

Université de Sherbrooke

Caractérisation de la protéine Gimap5 chez les lymphocytes T

Alexandre Savard
Département de pédiatrie
Service d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en Immunologie

Membres du jury d'évaluation
Dre Sheela Ramanathan, Programme d'immunologie
Dr Subburaj Ilangumaran, Programme d'immunologie
Dre Claire Dubois, Programme d'immunologie
Dr Éric Massé, Programme de biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada
Janvier 2011

Alexandre Savard 2011



**Library and Archives
Canada**

**Published Heritage
Branch**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque et
Archives Canada**

**Direction du
Patrimoine de l'édition**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-83750-4**

**Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-83750-4**

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Caractérisation de la protéine Gimap5 chez les lymphocytes T

Par Alexandre Savard

Département de pédiatrie, service d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

en immunologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le diabète de Type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par la perte de production d'insuline par les îlots β du pancréas. Les causes menant à la destruction de ces îlots par les cellules T autoréactives sont méconnues. Certains événements tels qu'une infection virale ou des facteurs environnementaux peuvent déclencher cette auto-immunité. Chez le rat BB-DP qui développe un diabète de type 1 semblable à l'homme, une mutation qui affecte les cellules T a été découverte. La mutation nommée *lyp* amène une perte de survie des cellules T dans la périphérie malgré tous les facteurs de survie des cellules T présents chez l'animal. Cette mutation située sur le chromosome 4 affecte un gène de la famille GIMAP, plus particulièrement la protéine GIMAP5 qui se retrouve tronquée et non fonctionnelle. Des résultats du laboratoire ont démontré une implication de GIMAP5 dans la voie du calcium. La manière par laquelle GIMAP5 joue son rôle dans la survie des lymphocytes T n'est pas connue. Afin de comprendre ces fonctions, nous voulons identifier la localisation cellulaire de GIMAP5 ainsi que ses partenaires d'interaction.

Les lignées cellulaires transfectées avec le gène de GIMAP5 étiqueté ont été marquées en fluorescence à l'aide de marqueurs d'organelles et examinées en microscopie confocale afin de déterminer la localisation de GIMAP5. Une étude de double-hybride combinée avec des marquages fluorescents à l'aide d'anticorps fluorescents dirigés contre ces protéines et l'utilisation de la microscopie confocale permettent de vérifier les partenaires d'interaction de GIMAP5. Les cellules T de rats *gimap5^{lyp/lyp}* et sauvages ont été utilisées afin de faire des marquages au Rhod-2 (calcium mitochondrial) et de vérifier l'effet de la mutation sur la capacité des mitochondries à absorber le calcium.

Une localisation de GIMAP5 au niveau du RE a été identifiée dans les cellules HEK 293T surexprimant GIMAP5, mais n'as pu être vu chez les lignées de cellules T Jurkats. Les résultats de l'étude de double-hybride ont donné des partenaires d'interaction de faible affinité (avec une cote de D). Les essais de microscopie confocale n'ont pu démontrer cette interaction. Finalement, les mitochondries des cellules T de rats *gimap5^{lyp/lyp}* ont une vitesse d'incorporation du calcium plus lente et un retour à la normale plus lent que les mitochondries des cellules T de rats sauvages.

Chez le rat, GIMAP5 semble jouer un rôle au niveau de l'homéostasie du calcium et de l'intégrité des mitochondries, puisque la mutation *gimap5^{lyp/lyp}* apporte une baisse du potentiel membranaire des mitochondries et une baisse de l'accumulation du calcium par ces dernières. Le mécanisme par lequel GIMAP5 régule l'homéostasie du calcium reste encore à élucider.

Mots clé : GIMAP5, Lymphocytes T, Survie, Calcium, Homéostasie, Diabète de type 1, Auto-immunité

Table des matières

Table des matières	II
Liste des illustrations	IV
Liste des abréviations et symboles	VI
Résumé	
1. Introduction	1
1.1 Diabète de type 1	1
1.1.1 Modèles animaux du diabète de type 1	1
1.1.2 Le rat BB-DP	1
1.1.3 Phénotype du rat BB-DP.....	3
1.1.4 Lymphopénie vs auto-immunité	5
1.2 Facteurs régulant la survie des cellules T.....	7
1.2.1 Cytokines	7
1.2.2 Interaction TCR-CMH/peptide du soi	9
1.2.3 Activation du TCR par l'antigène.....	9
1.3 Mutation <i>lyp</i>	12
1.3.1 La mutation <i>lyp</i> résulte d'un décalage du cadre de lecture de GIMAP5	12
1.3.2 La mutation <i>lyp</i> affecte le potentiel membranaire des mitochondries	18
1.4 Homéostasie du calcium dans les cellules T	19
1.4.1 Rôle des mitochondries dans l'homéostasie du calcium.....	20
1.4.2 L'entrée du calcium externe est déficiente chez les rats <i>gimap5^{lyp/lyp}</i>	21
2. Hypothèse de recherche	24
2.1 Objectifs de recherche	24
3. Matériels et Méthodes	25
4. Résultats	30
4.1 Clonage de GIMAP5 humain	30
4.2 Localisation cellulaire de GIMAP5 humain.....	31
4.3 Partenaires d'interaction de GIMAP5 humain	34

4.3.1	Interaction de hGIMAP5 avec MACF1	35
4.3.2	Interaction entre LARG et hGIMAP5.....	37
4.3.3	Identification des partenaires d'interaction de hGIMAP5 par spectrométrie de masse	38
4.4	Implication de GIMAP5 dans la signalisation du calcium.....	40
5. Discussion	43
5.1	Clonage de GIMAP5 humain	43
5.2	Localisation cellulaire de GIMAP5 humain.....	43
5.3	Partenaires d'interaction de GIMAP5 humain	44
5.4	Implication de GIMAP5 humain dans la signalisation du calcium.....	45
Conclusion	48
Remerciements	50
Bibliographie	52

Liste des illustrations

Figures

Figure 1	Infiltration des îlots β par les cellules T	2
Figure 2	Le phénotype du thymus chez les rats sauvages et BB-DP	3
Figure 3	Le nombre relatif de cellules T et le phénotype de la périphérie chez les rats sauvages et BB-DP	5
Figure 4	Régulation de la survie des lymphocytes T dans les organes lymphatiques secondaires	7
Figure 5	Signalisation d'IL-7 pour le maintien de la survie des lymphocytes T	8
Figure 6	Signalisation du TCR	10
Figure 7	Expression de Bcl-2 et Bcl-XL chez le rat sauvage et BB-DP	12
Figure 8	Clonage positionnel du chromosome 4 du rat	13
Figure 9	La structure des protéines GIMAP	14
Figure 10	Localisation de Gimap5	16
Figure 11	Localisation cellulaire de la protéine GIMAP5 endogène	18
Figure 12	Perte du potentiel membranaire des mitochondries du rat <i>gimap5^{lyp/lyp}</i>	19
Figure 13	Les mitochondries contrôlent l'homéostasie du calcium	21
Figure 14	Flux calcique réduit dans les cellules T de rats <i>gimap5^{lyp/lyp}</i>	22
Figure 15	Entrée du calcium externe compromise dans les cellules T de rats <i>gimap5^{Lyp/Lyp}</i>	23
Figure 16	Expression de GIMAP5 dans les cellules HEK293T	30
Figure 17	hGIMAP5 ne co-localise pas avec les mitochondries, les points d'adhésion focale et les jonctions «gap»	32
Figure 18	Expression de hGIMAP5 dans le RE	32
Figure 19	hGIMAP5 n'est pas exprimé dans le RE, les mitochondries, la membrane plasmique ou les points d'adhésion focale dans les cellules Jurkats.	33
Figure 20	Représentation de la protéine MACF1	36
Figure 21	hGIMAP5 et MACF1 ne co-localisent pas dans les cellules HEK 293T	36
Figure 22	Représentation de la protéine LARG	37
Figure 23	Immunobuvardage de type western de la protéine LARG	37

Figure 24	Immunobuvardage de type western de LARG dans les compartiments de centrifugation différentielle.....	37
Figure 25	hGIMAP5 et LARG ne co-localisent pas dans les cellules HEK 293T	38
Figure 26	Spectrométrie de masse des échantillons P100.....	39
Figure 27	Résultats des pointages de peptides	30
Figure 28	Incorporation du calcium vu par Rhod-2 dans les cellules T CD4 ⁺ de rats <i>gimap5^{+/+}</i>	41
Figure 29	Incorporation du calcium vu par Rhod-2 dans les cellules T CD4 ⁺ de rats <i>gimap5^{Lyp/Lyp}</i>	42

Tableaux

Tableau 1	Les thymectomies avant l'insulte.....	6
Tableau 2	Caractéristiques et fonctions des protéines de la famille GIMAP	15
Tableau 3	Amorces pour <i>Gimap5</i>	25
Tableau 4	Programmation du cycle PCR.....	25
Tableau 5	Protéines ayant interagit avec GIMAP5 lors de l'étude double-hybride	35

Liste des abréviations et symboles

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIG	<i>Avirulence induced gene</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BB-DP	<i>BioBreeding-Diabetes Prone</i>
BB-DR	<i>BioBreeding-Diabetes Resistant</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
CaMKII	<i>Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase 2</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CRAC	<i>Calcium release activated calcium channel</i>
DAG	Diacylglycérol
DN	Double négatif
DP	Double positif
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	<i>Guanosine exchange factor</i>
GIMAP	<i>GTPase of immunity-associated nucleotide binding protein</i>
GTP	Guanosine triphosphate
IAN	<i>Immunity-associated nucleotide binding protein</i>
Iddm	<i>Insulin-dependent diabetes mellitus</i>
Il	Interleukine
IP ₃	Inositol triphosphate
IP ₃ R	Inositol triphosphate récepteur
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
LARG	<i>Leukemia associated rho GEF</i>
LETL	<i>Long evans tokushima lean</i>
MACF1	<i>Microtubule-actin crosslinking factor 1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cell</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor κ B</i>
NK	<i>Natural killer cell</i>
NKT	<i>Natural Killer T cell</i>
NOD	<i>Non-obese diabetes</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4, 5 diphosphate
PKC	Phosphokinase C
PLCγ	Phospholipase C γ
Rag	<i>Recombination activating gene</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RTE	<i>Recent thymic emigrant</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency syndrome</i>
SERCA	<i>Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
SP	Simple positif
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription protein</i>
STIM1	<i>Stromal interaction molecule 1</i>

T1D	<i>Type 1 diabetes</i>
TCR	Récepteur des cellules T
TMRE	<i>Tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate</i>
WF	Wistar-Furth

1. Introduction

1.1 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune définie par la diminution ou l'arrêt de production d'insuline par les cellules β du pancréas, ce qui empêche la régulation du glucose sanguin (Eckman, 2010). La destruction des îlots β par les cellules T autoréactives amène un arrêt de production de l'insuline. Le diabète de type 1 (ou insuline dépendent) peut débuter à n'importe quel âge, mais est surtout diagnostiqué chez les enfants, les adolescents et les jeunes adultes (Eckman, 2010). Le développement du diabète de type 1 est régulé par plusieurs facteurs environnementaux et génétiques (Eckman, 2010).

1.1.1 Modèles animaux du diabète de type 1

Afin de mieux comprendre les principes qui régulent la maladie, plusieurs modèles d'animaux qui développent spontanément le diabète de type 1 ont été utilisés (Rees et Alcolado, 2005). Les modèles animaux les plus utilisés sont : la souris NOD (Non-obese diabetic) et le rat BB-DP (BioBreeding Diabetes-Prone). Ces modèles ont été utilisés de manière intensive par les chercheurs afin de mieux comprendre les processus immunologiques qui régulent la maladie. Les autres modèles animaux sont : le rat LETL (Long Evans Tokushima lean), le hamster chinois, le lapin blanc de Nouvelle-Zélande, le chien Keeshond et le macaque noir à crête (Rees et Alcolado, 2005).

1.1.2 Le rat BB-DP

Le rat BioBreeding Diabetes-Prone (BB-DP) développe spontanément un diabète auto-immun de type 1 dépendent de l'insuline semblable à l'homme (Colle et al., 1981). Le diabète de type 1 chez ces rats est caractérisé par l'infiltration des îlots β (de Langerhans) par les cellules T CD4 et CD8 (Figure 1) (Colle et al., 1981, Poussier et al., 1982). Cette infiltration cause une destruction des îlots et l'arrêt de production de l'insuline (Colle et al., 1981, Poussier et al., 1982). Au niveau génétique, plusieurs loci sont susceptibles d'être la cause de ce diabète spontané. De ces régions, les deux plus importantes sont : Iddm1, qui

est lié au CMH de classe II RT1u et Iddm2, qui est lié au locus *lyp* et identifié sur le chromosome 4 du rat (Colle et al., 1981, Poussier et al., 1982, Jacob et al., 1992). Cette mutation apporte plusieurs conséquences fonctionnelles telles qu'une lymphopénie sévère dans les organes lymphatiques secondaires (Poussier et al., 1982), une faible réponse à l'antigène de la part des cellules T (Van Rees et al., 1988), une faible réponse cytotoxique allo-spécifique (Woda et al., 1986), aucun rejet d'allogreffes (Yale et al., 1985), une augmentation des risques d'infections (Francfort et al., 1985), une plus haute incidence de lymphomes à cellules B (Meehan et al., 1993) et, sous une souche de rat PVG.RT1u^{lyp/lyp}, une augmentation des gastro-entérites éosinophiliques (Cousins et al., 2006).

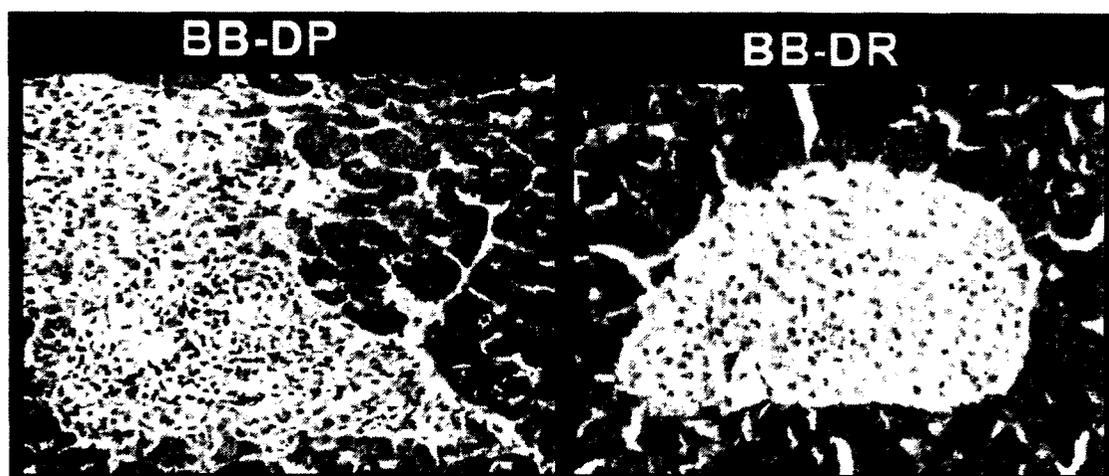


Figure 1 : Infiltration des îlots β par les cellules T. Une fois les cellules T infiltrées, il y a destruction et perte de fonction des îlots β (à gauche) (adapté de Colle et al., 1981).

1.1.3 Phénotype de la lymphopénie chez le rat BB-DP

Chez le rat BB-DP, le développement des cellules T est normal au niveau du thymus et le nombre de thymocytes est semblable à celui des rats sauvages (Figure 2) (Ramanathan et al., 1998). Les thymocytes subissent trois stades de développement dans le thymus (Jondal et al, 2004, Michie et Zúñiga-Pflücker, 2002). Le premier est le stade double négatif (DN), où les cellules n'expriment pas les protéines de co-stimulation CD8 et CD4 et subissent un réarrangement du TCR. Le stage double négatif peut être divisé en quatre sous-stades, 1, 2,

3 et 4. À chaque sous-stade, les thymocytes ont un phénotype différent. Stade DN1, CD44⁺CD117⁺CD25⁻, stade DN2, CD44⁺CD117⁺CD25⁺, stage DN3, CD44⁻CD25⁺ et stade DN4, CD44⁻CD25⁻ (Jondal et al., 2004, Michie et Zúñiga-Pflücker, 2002). Le second stade de développement est le stade double positif (DP). À ce stade, les thymocytes expriment le TCR et les protéines de co-stimulation CD4 et CD8. C'est à ce stade que la sélection positive s'effectue (Jondal et al., 2004, Michie et Zúñiga-Pflücker, 2002). C'est-à-dire que les cellules qui sont capables de reconnaître les antigènes présentés par les molécules de CMH en collaboration avec les molécules de co-stimulation sont sélectionnées. Au dernier stade de développement, les cellules T régulent à la baisse le récepteur qui n'est pas impliqué (soit CD4 ou CD8) dans la restriction, ce qui mène à la génération de thymocytes simples positifs. À ce stade, les thymocytes qui expriment un TCR de haute affinité contre les antigènes du soi sont éliminés par sélection négative. Ce mécanisme assure que les cellules T ne puissent pas interagir avec les antigènes du soi (Jondal et al., 2004, Michie et Zúñiga-Pflücker, 2002).

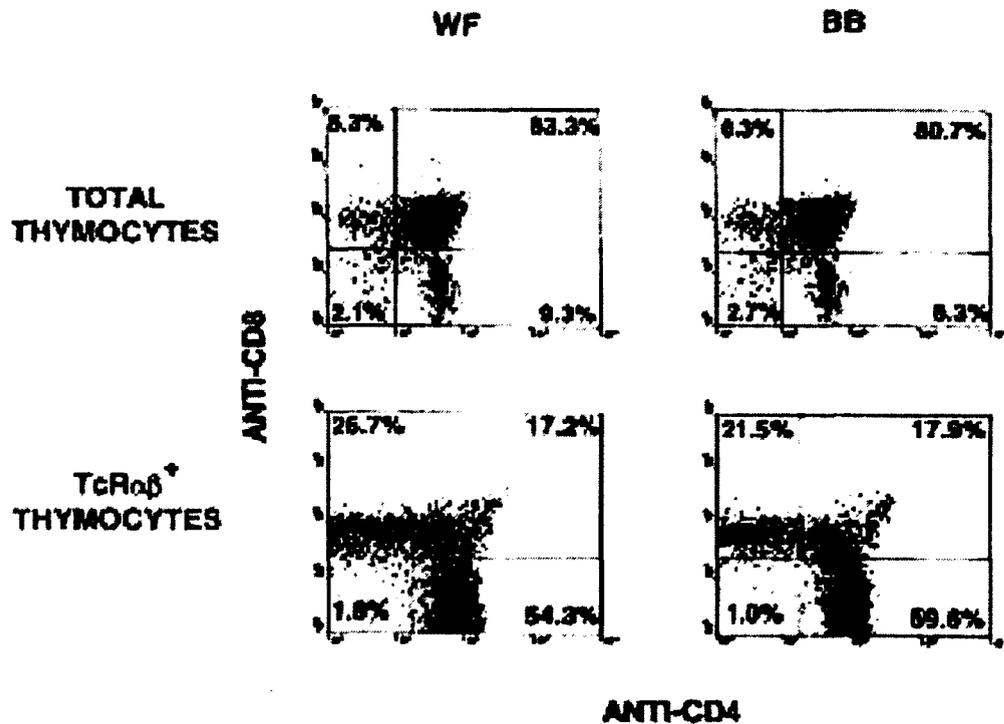


Figure 2 : Le phénotype du thymus chez les rats sauvages et BB-DP. Le développement thymique se fait normalement chez les rats BB-DP (adapté de Ramanathan et Poussier, 2001).

Dans quelques lignées de rats, il y a une réduction de la fréquence de cellules matures CD8⁺ SP (Plamondon et al., 1990, et Hernández-Hoyos et al., 1999). Dans les organes lymphatiques secondaires, le nombre et la fréquence de cellules T sont diminués chez les rats BB-DP (Figure 3). On observe une baisse de presque 10 fois le nombre de cellules par rapport aux rats sauvages (Poussier et al., 1982). Les cellules T CD8⁺ sont plus susceptibles à la mutation, puisque le ratio CD8/CD4 est de beaucoup diminué dans la périphérie chez les mutants (Figure 3) (Ramanathan et al., 1998, Ramanathan et Poussier, 2001). Lors de la première semaine suivant la sortie du thymus, les *recent thymic emigrants* (RTE) subissent d'autres développements qui peuvent être suivis par l'expression de quelques molécules spécifiques de leur surface (Hosseinzadeh et Goldschneider, 1993). Durant la première semaine, l'expression de Thy-1 diminue tandis que l'expression de CD45RC et de RT6 augmente. Chez les rats BB-DP, les cellules T qui expriment Thy-1 sont diminuées et les cellules T RT6⁺CD45RC⁺ sont absentes des organes lymphatiques secondaires (Zadeh et al., 1996). Ces observations nous mènent vers un rendement thymique diminué et une mort prématurée des RTE (Zadeh et al., 1996). D'autres expériences menées par Zadeh et al. ont démontré cette diminution du rendement thymique et une durée de vie de moins d'une semaine des RTE (Zadeh et al., 1996).

Chez les animaux sauvages, le bassin de lymphocytes T circulant atteint son maximum après la puberté. Le thymus s'atrophie et le rendement thymique diminue beaucoup. Le bassin de cellules T périphériques est maintenu par le renouvellement des cellules T matures (Modigliani et al., 1994, Tough et Sprent, 1994). Le renouvellement mitotique des cellules T naïves est conduit par la reconnaissance de l'antigène par le TCR et par la présence de cytokines, telle l'IL-7 (Tanchot et al., 1997, Marrack et al., 2000). Le nombre de cellules présentes dans la périphérie est sous contrôle homéostatique (Marrack et al., 2000). Lorsque la population de lymphocytes baisse dans la périphérie, les cellules T naïves se divisent afin de combler le manque de cellules T. Cette division est contrôlée par l'interaction du TCR de la cellule avec le complexe CMH sur lequel la cellule a été sélectionnée (Marrack et al., 2000).

Chez le rat BB-DP, puisque que la majorité des cellules T meurent dans la périphérie, il y a une baisse de cellules T naïves dans les organes lymphatiques secondaires (Poussier et al.,

1982, Zadeh et al., 1996). Cependant, seules quelques cellules dont le TCR reconnaît des antigènes du soi survivent et passent en prolifération homéostatique. Cette prolifération homéostatique augmente le nombre de cellules T, mais le pool de TCR spécifique est restreint aux antigènes du soi (Ramanathan et al., 1998, Zadeh et al., 1996).

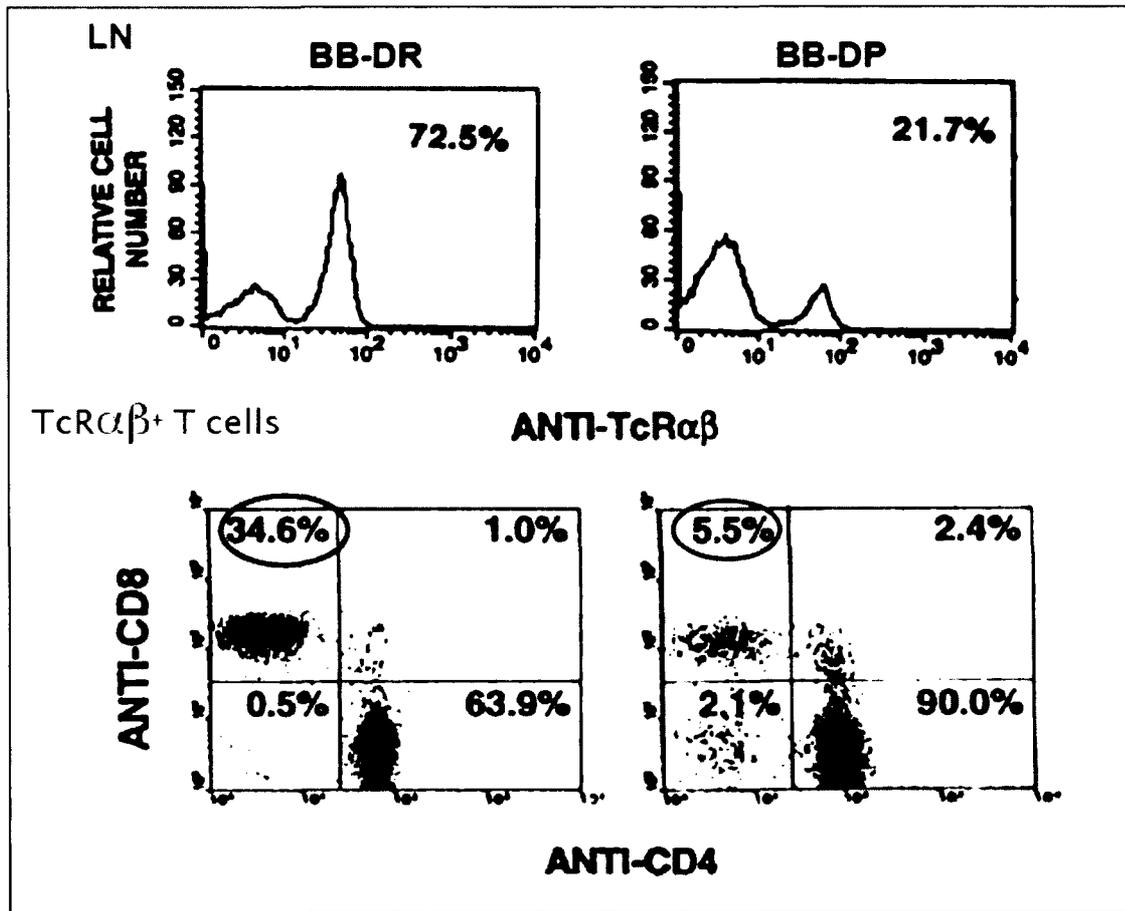


Figure 3 : Le nombre relatif de cellules T et le phénotype de la périphérie chez les rats sauvages et BB-DP. Chez le rat BB-DP, les lymphocytes T se retrouvent diminués dans la périphérie et le ratio CD8⁺/CD4⁺ est lui aussi diminué (adapté de Ramanathan et Poussier, 2001).

1.1.4 Lymphopénie vs auto-immunité

Les rats BB-DP développent une lymphopénie sévère au niveau de la périphérie et un diabète de type 1 qui est dépendant des lymphocytes T, il y a donc un paradoxe entourant le

manque de cellule T et le développement de la maladie dépendant des cellules T. La reconnaissance de l'antigène par le TCR des lymphocytes T naïfs permet l'augmentation de l'activité mitotique de ces cellules et ainsi permet le sauvetage des ces cellules (Ramanathan et al., 1998). Les expériences effectuées par Ramanathan et al. suggèrent que le sauvetage de ces cellules doit se faire dans les premiers jours suivants la sortie des RTE, puisque ceux-ci ont une durée de vie très courte (moins d'une semaine) (Ramanathan et al., 1998). Des cellules T de rats BB et WF (Wistar-Furth) (qui ont le même génotype que les rats BB-DP par contre, ils expriment un allèle différent de la molécule CD45) croisés (F1) ont été utilisées comme source d'antigène. Les cellules F1 sont tolérantes aux antigènes des deux parents. Les rats BB-DP ont été ensuite immunisés avec ces cellules. Une fois les cellules devenues indétectables, environ trois semaines plus tard, les rats ont été thymectomisés ou ont subi une chirurgie simulant la thymectomie. Les rats ont ensuite été mis en contact une seconde fois avec les cellules T F1. La disparition des cellules T F1 s'est faite en moins d'une semaine. Ceci démontre que, malgré une durée de vie courte, les cellules T du rat BB-DP peuvent générer des cellules mémoires longue durée lorsque celles-ci sont activées par l'antigène (Ramanathan et al., 1998). Par contre, si les rats sont thymectomisés avant l'immunisation, il n'y a pas de rejet de cellules injectées, car les TCR spécifiques des cellules F1 sont éliminés. Ceci peut expliquer le paradoxe chez le rat BB-DP (Ramanathan et al., 1998). Lorsque les rats sont thymectomisés avant le développement de l'insulite, il n'y a pas de manifestation auto-immune. Par contre, si les rats sont thymectomisés après l'insulite, les rats développent un diabète malgré la perte de cellules T dans la périphérie (Tableau 1) (Like et al., 1982, Ramanathan et Poussier, 2001).

Tableau 1 : Les thymectomies avant l'insulite. Les thymectomies diminuent l'incidence du diabète. TX=thymectomies, Sham=chirurgie contrôle (adapté de Like et al., 1982 et Ramanathan et Poussier, 2001).

Âge à la chirurgie	Chirurgie	Incidence du diabète
30 jours	Sham	8/9 (88%)
	TX	1/28 (3%)
60 jours	Sham	4/5 (80%)
	TX	9/13 (68%)

1.2 Facteurs régulant la survie des cellules T

Une fois dans la périphérie, les lymphocytes T ont besoin de plusieurs facteurs leur permettant de survivre sur une longue durée (Figure 4). Les deux facteurs principaux obligatoires pour les lymphocytes T naïfs sont l'interaction avec le TCR et les cytokines (Jameson, 2002, Marrack et al., 2000, Surh et Sprent, 2008).

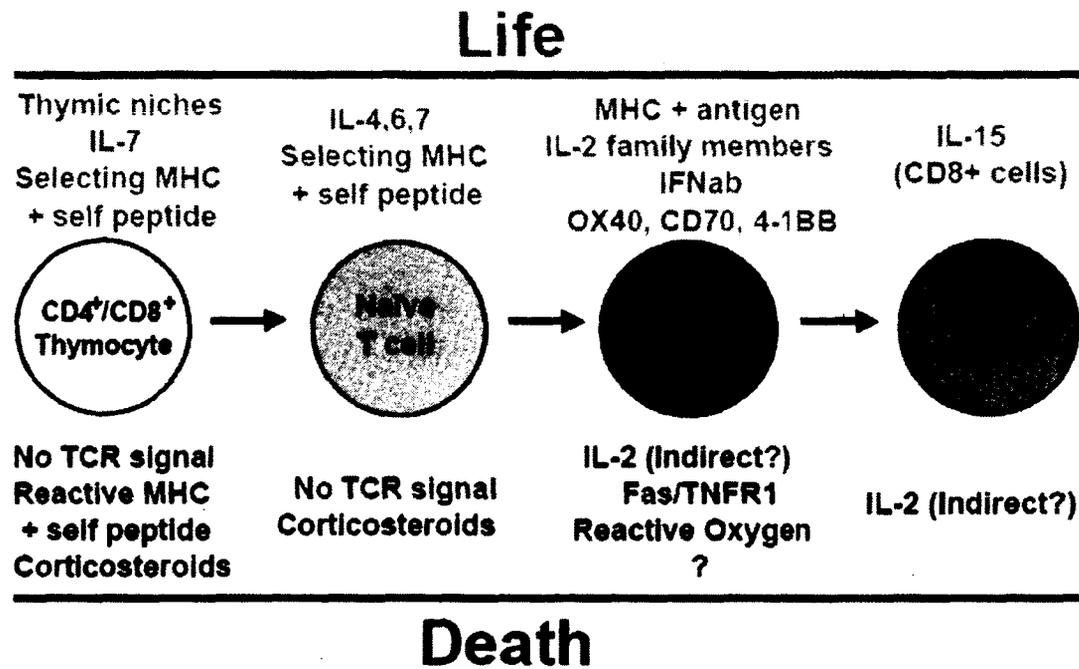


Figure 4 : Régulation de la survie des lymphocytes T dans les organes lymphatiques secondaires. Les cytokines de la famille γ telles que l'IL-7 et l'IL-15 et l'interaction TCR et CMH/peptide sont très importantes pour la survie des lymphocytes T peut importe le stade de développement (adapté de Marrack et al., 2000).

1.2.1 Cytokines

Au niveau des cytokines, l'IL-7 est identifiée comme la cytokine importante pour la survie des lymphocytes T naïfs (Surh et Sprent, 2008). L'IL-7 fait partie de la famille des cytokines γ (puisque leur récepteur s'associe avec la chaîne γ) (Jameson, 2002). Ces cytokines sont l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21. Les cytokines de la famille des γ sont des cytokines qui promeuvent la survie des lymphocytes T et inhibent leur apoptose (Benczik et Gaffen, 2004). La signalisation de l'IL-7 se fait via JAK3, kinase qui est

activée via la chaîne γc (Figure 5). La signalisation via l'IL-7 régule à la hausse l'expression des protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 (Jameson, 2002). L'IL-7 joue aussi un rôle au niveau du maintien de l'activité métabolique de la cellule. Ce maintien est toutefois effectué via la PI3K, indépendamment de la voie JAK-STAT nécessaire à l'activation de Bcl-2 (Jameson, 2002).

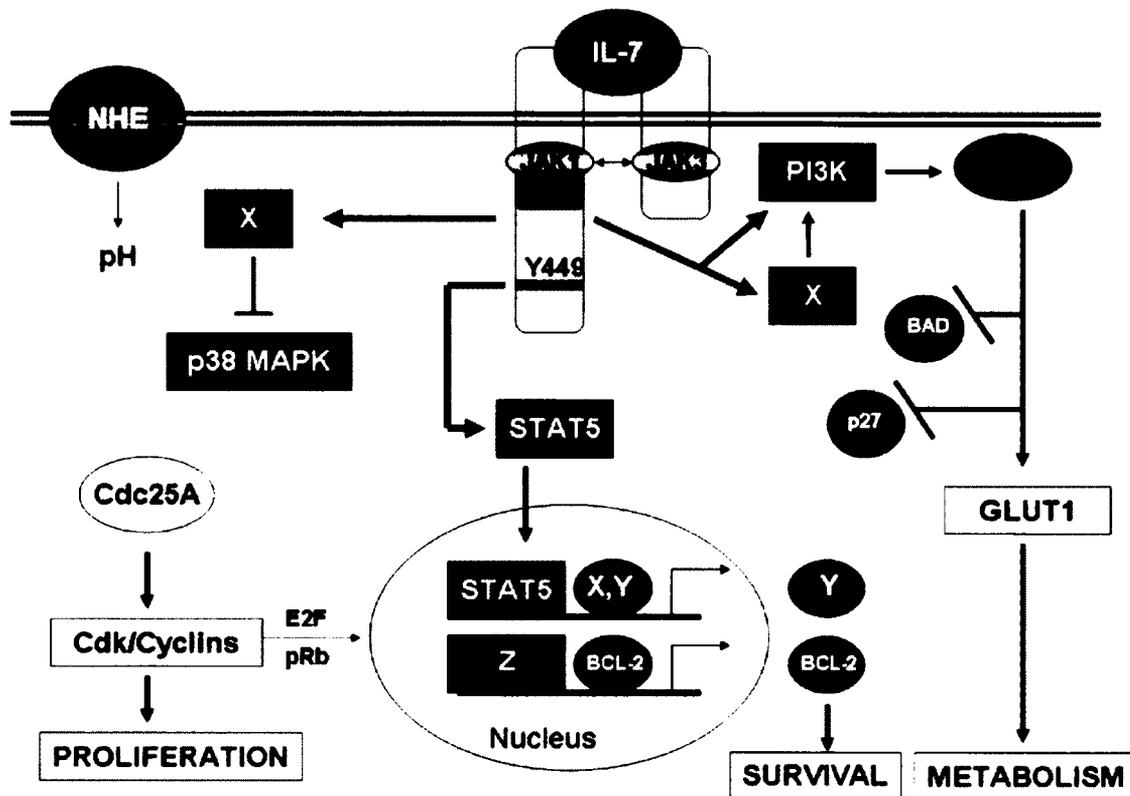


Figure 5 : Signalisation d'IL-7 pour le maintien de la survie des lymphocytes T. La liaison de l'IL-7 à son récepteur médie la phosphorylation de JAK1 et JAK3. Les JAK1-3 activent STAT5 qui dimérise et transloque au noyau pour initier la transcription des protéines facilitant l'activité de Bcl-2 et la survie des lymphocytes T. Une voie indépendante des JAK, la voie PI3K, active AKT, ce qui active le métabolisme de la cellule (adapté de Kittipatarin et Khaled, 2007).

Bcl-2 est requise afin de maintenir la survie des cellules T naïves dans la périphérie (Jameson, 2002 et Surh et Sprent, 2008). Les souris dont le gène Bcl-2 a été délété (Knock-out) ont une plus grande sensibilité aux stimuli apoptotiques et une perte rapide des cellules immunitaires après la naissance (Roset et al., 2007). L'importance de l'IL-7 dans le

développement et la survie des cellules T est soulignée par l'observation chez les souris Il-7 ou IL-7R knock-out d'une baisse de la concentration cellulaire dans le thymus et une absence quasi totale des cellules T et B en périphérie (Kittipatarin et Khaled, 2007 et Capitini et al., 2009).

1.2.2 Interaction TCR-CMH/peptide du soi

En plus de la signalisation de l'IL-7, la survie des cellules T en périphérie est dépendante de l'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide du soi (Jameson 2002, Surh et Sprent, 2008). Les travaux effectués par Tanchot et al. démontrent l'importance de l'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide du soi pour le maintien de la survie des lymphocytes T. Une population de cellules T CD8⁺ de souris transgéniques pour l'antigène HY et restreintes au CMH de classe 1 H-2D^b avec un knock-out pour Rag2 a été utilisée comme source monoclonale de cellules T naïves. Ces cellules T ont été injectées dans différentes souris irradiées qui expriment le CMH de classe 1 H-2D^b ou non, avec l'antigène HY ou non. Seulement les cellules T injectées dans l'animal avec le CMH de classe 1 H-2D^b et l'antigène HY ont pu proliférer et survivre dans les organes lymphatiques secondaires (Tanchot et al., 1997). Des expériences semblables ont été faites avec les cellules CD4⁺ et les résultats sont les mêmes (Le Champion et al., 2002). De ces expériences, les chercheurs ont proposés que le peptide présenté par le CMH se doit d'être le même que celui utilisé lors de la sélection positive dans le thymus (Jameson, 2002, Surh et Sprent, 2008). Cette stimulation mène à une activation partielle du TCR, une activation sous-mitogénique (Boyman et al., 2009, Davis et Distelhorst, 2006).

1.2.3 Activation du TCR par l'antigène

Lors de l'activation du TCR (Figure 6), les domaines ITAM du CD3 sont phosphorylés ce qui amène le recrutement et la phosphorylation de la protéine Zap-70 (Smith-Garvin et al., 2009). Ceci amène le recrutement et la phosphorylation d'une panoplie d'autres protéines, dont la PLC γ . La PLC γ activée clive le PIP₂ en IP₃ et en DAG. L'IP₃ se rend au niveau du réticulum endoplasmique et permet la libération du calcium via son récepteur (IP₃R) (Smith-Garvin et al., 2009). La déplétion du calcium du RE promeut l'entrée du calcium externe qui est requis afin d'activer plusieurs facteurs de transcription dont le NFAT et le

NF- κ B. Ces facteurs sont impliqués dans la transduction de gènes codant pour des protéines impliquées dans la prolifération des lymphocytes T (Smith-Garvin et al., 2009).

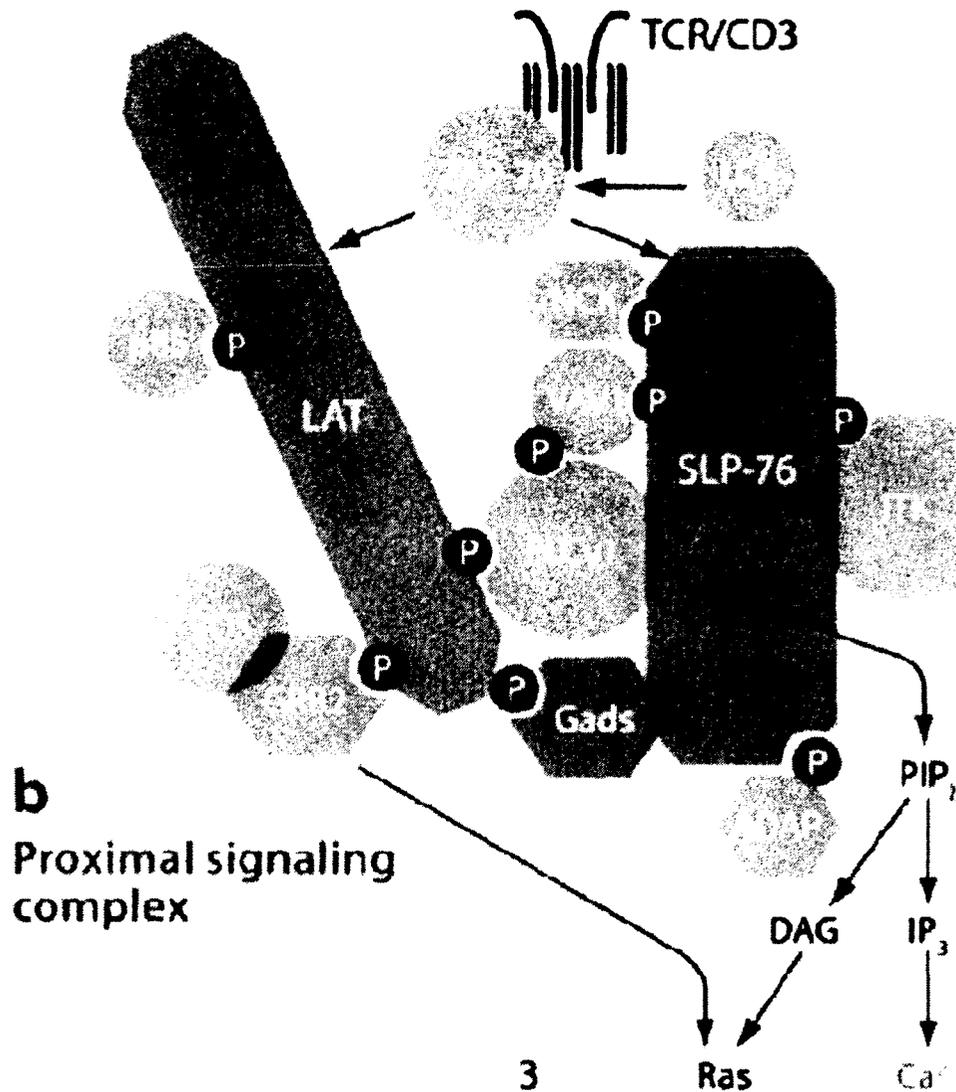


Figure 6 : Signalisation du TCR. L'activation de la signalisation du TCR amène le recrutement de ZAP-70 et la phosphorylation de LAT. LAT agit comme protéine d'échafaudage et permet le recrutement et la phosphorylation de plusieurs protéines, dont la PLC γ . Cette dernière clive le PIP₂ en DAG et IP₃. Ce dernier active la voie du calcium (adapté de Smith-Garvin et al., 2009).

En absence des deux signaux (présence de l'IL-7 et interaction TCR/peptide/CMH), la cellule va en apoptose via l'apoptosome et l'activation des caspases effectrices (Jameson, 2002, Surh et Sprent, 2008). Dans le thymus, la survie des lymphocytes est sous la régulation de plusieurs facteurs (Jondal et al., 2004). Lors du stade double négatif, les thymocytes sont sous la régulation de l'IL-7 et de c-kit (CD117), deux facteurs qui promeuvent la prolifération et l'expansion des précurseurs des cellules T (Jondal et al., 2004). Dans le stade double positif, l'activation du TCR lors de la sélection positive mène à l'activation de facteurs de survie et à l'inhibition de facteurs apoptotiques tels que p53 (Michie et Zúñiga-Pflücker, 2002). Lors de la sélection négative, les thymocytes qui reconnaissent l'antigène du soi sont éliminés par des facteurs externes tels que les hormones glucocorticoïdes (Jondal et al., 2004). Chez le rat BB-DP, le développement des cellules T dans le thymus est normal. Par contre, une susceptibilité à l'apoptose est évidente lorsqu'on regarde les cellules du stade SP (Ramanathan et Poussier, 2001). Cependant, cette susceptibilité à la mort cellulaire n'est pas causée par une dérégulation des protéines de la famille Bcl-2, puisque l'expression de ces protéines est normale (Figure 7), ou de l'activation des caspases effectrices, puisque les inhibiteurs de caspases n'ont aucun effet sur la survie des lymphocytes T (Ramanathan et al., 1998).

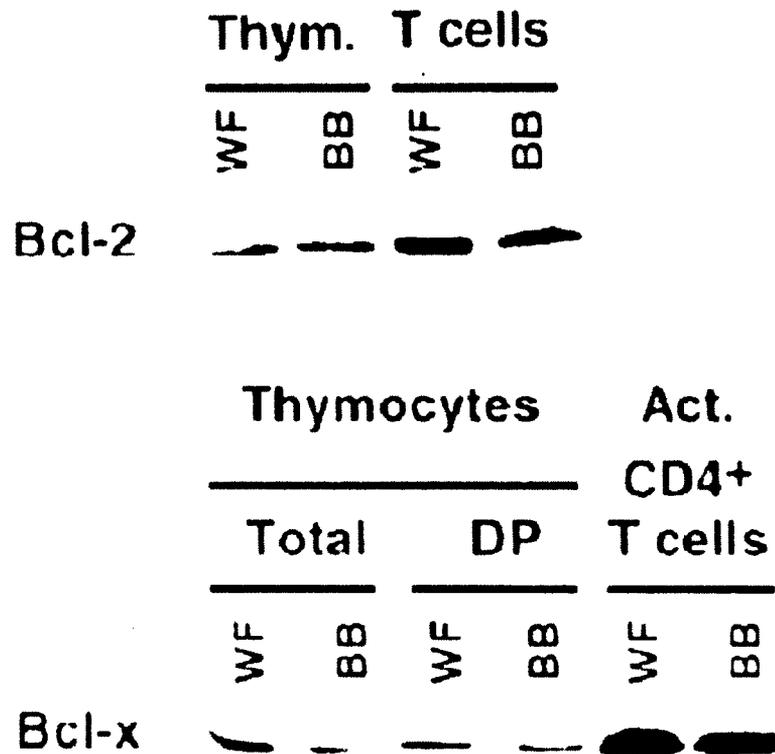


Figure 7 : Expression de Bcl-2 et Bcl-xL chez le rat sauvage et BB-DP. Immunobuvardage de type western de Bcl-2 et Bcl-xL. L'expression de ces deux protéines antiapoptotique est normale chez les rats BB-DP (adapté de Ramanathan et al., 1998).

1.3 Mutation *lyp*

1.3.1 La mutation *lyp* résulte d'un décalage du cadre de lecture de GIMAP5

La mutation *lyp* se retrouvant sur le chromosome 4 du rat, deux équipes ont effectué un clonage positionnel du chromosome 4 (Figure 8) et y ont trouvé une famille de gènes, la famille GIMAP (GTPase of immunity-associated nucleotide binding protein) (Hornum et al., 2002, MacMurray et al., 2002).

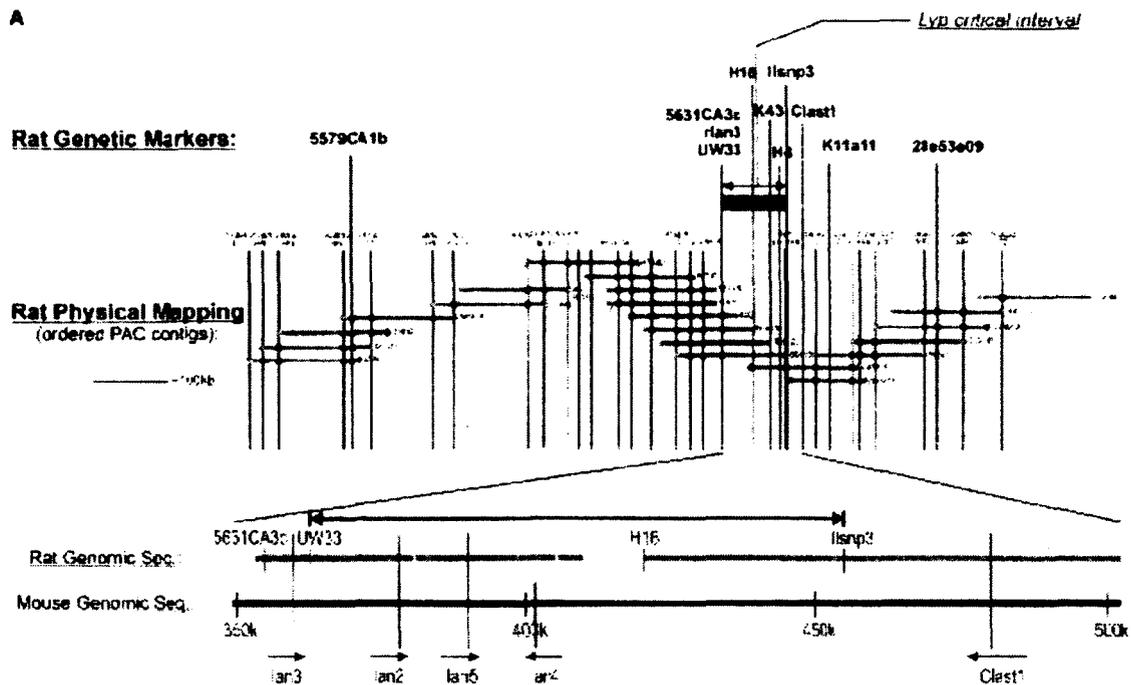


Figure 8 : Clonage positionnel du chromosome 4 du rat. La découverte de la mutation *lyp* sur le chromosome 4 a mené à la découverte d'une famille de gène appelée GIMAP dans laquelle la mutation *lyp* se fait. Plus particulièrement au niveau du gène de la protéine GIMAP5 (adapté de MacMurray et al., 2002, Hornum et al., 2002).

Cette mutation apporte un décalage du cadre de lecture ouverte et tronque la protéine GIMAP5 (Hornum et al., 2002, MacMurray et al., 2002). L'insertion d'une base a pour résultat une protéine tronquée après 121 a.a. avec l'addition de 19 a.a.. Ceci résulte en une protéine non fonctionnelle ayant perdu son domaine C-terminal (Hornum et al., 2002, MacMurray et al., 2002). Cette famille, auparavant appelée IAN (Immunity-associated nucleotide binding protein), démontre une homologie avec les protéines AIG découvertes par Reuber et Ausubel en 1996. Ces protéines sont induites suite à une infection au *Pseudomonas syringae* chez les plantes (Reuber et Ausubel, 1996). Les protéines de la famille GIMAP contiennent un domaine N-terminal conservé contenant un domaine AIG (avirulence induced gene) qui est un domaine GTPase (Figure 9) (Krücken et al., 2004).

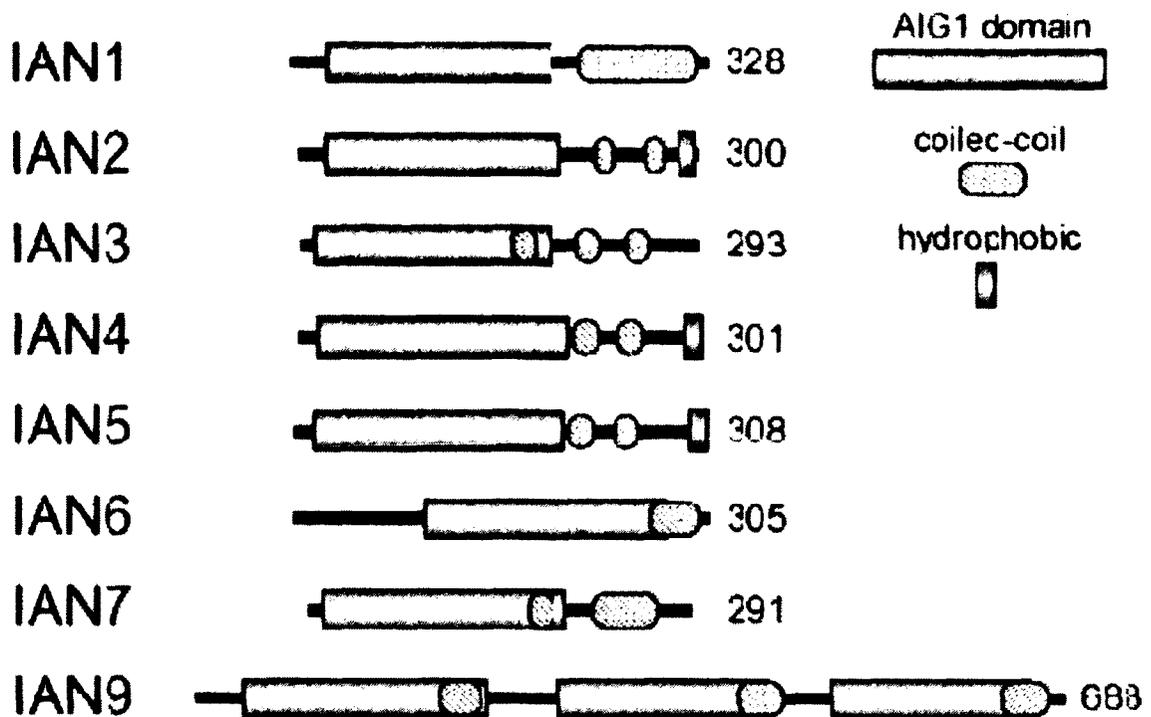


Figure 9 : La structure des protéines GIMAP. Le domaine N-Terminal de ces protéines est très semblable entre chaque membre. Il y a une différence notable au niveau du domaine C-Terminal où certains membres possèdent un domaine transmembranaire, dont GIMAP5. Les nombres correspondent au nombre d'acides aminés. La correspondance IAN et GIMAP est expliquée dans le tableau 2 (adapté de Nitta et Takahama, 2007).

Ces protéines ont un mécanisme d'action peu connu (Tableau 2). La protéine Gimap5 fait partie des protéines les plus étudiées de cette famille. Elle contient un domaine transmembranaire en C-terminal et est exprimée seulement chez les lymphocytes T (krücken et al., 2004). GIMAP5 est une protéine de 35 kDa et possède plus de 70% d'homologie entre le rat, la souris et l'homme (Hornum et al., 2002, MacMurray et al., 2002).

Tableau 2 : Caractéristiques et fonctions des protéines de la famille GIMAP (adapté de Krücken et al., 2004)

GIMAP	Caractéristiques	Fonctions
GIMAP4 (IAN1)	Liaison et hydrolisation du GTP Liaison à Bax Liaison à la calmoduline Phosphorylation par PKC Localisation : RE, Golgi, Cytoplasme	Accélération de l'apoptose Régulation du cycle cellulaire
GIMAP1 (IAN2)	Liaison au GTP (souris) Pas de liaison au GTP (Humain) Localisation : RE	Inconnue
GIMAP9 (IAN3)	Absent chez l'humain	Inconnue
GIMAP3 (IAN4)	Liaison au GTP Liaison aux protéines de la famille Bcl-2 Localisation : RE, Golgi, mitochondries Pseudogène chez l'humain Absent chez le rat	Sélection positive des cellules T
GIMAP5 (IAN5)	Liaison aux protéines de la famille Bcl-2 Localisation : RE, Golgi, Mitochondrie, Centrosome	Inhibition de l'apoptose Génération de thymocytes DP Régulation de la signalisation du TCR
GIMAP6 (IAN6)	Inconnue	Inconnue
GIMAP7 (IAN7)	Localisation : RE, Golgi	Inconnue
GIMAP10-ps (IAN8-pseudo)	Pseudogène chez la souris Absent chez l'humain et le rat	Inconnue
GIMAP8 (IAN9)	Localisation : RE, Golgi, Mitochondrie	Inhibition de l'apoptose
GIMAP2 (IAN12)	Absent chez la souris et le rat	Inconnue

Chez la souris, le knock-out pour *Gimap5* amène une déficience dans le développement des lymphocytes T et des cellules NK et NKT ainsi qu'une lymphopénie sévère dans la périphérie (Schulteis et al., 2008). Le foie est gravement atteint et se détériore rapidement. Ces souris ne vivent que pendant 10 à 20 semaines dû aux complications et à la détérioration de leur condition (Schulteis et al., 2008). Cette différence drastique dans le phénotype peut être causée par l'absence totale de protéine chez la souris, tandis que, chez le rat, la protéine est toujours présente, mais de façon non fonctionnelle. Des études chez la souris mutante sphinx (*gimap5^{sph/sph}*) démontre un phénotype semblable à la souris

GIMAP5 KO avec des particularités semblables au rat *gimap5^{lyp/lyp}* (Barnes et al., 2010). Plusieurs autres études ont été menées afin de mieux comprendre les fonctions de GIMAP5. Ces études ont démontré que la protéine GIMAP5 surexprimée se trouve dans le réticulum endoplasmique (RE), les mitochondries, l'appareil du Golgi ou au centrosome (Figure 10) (Sandal et al., 2003, Zenz et al., 2004).

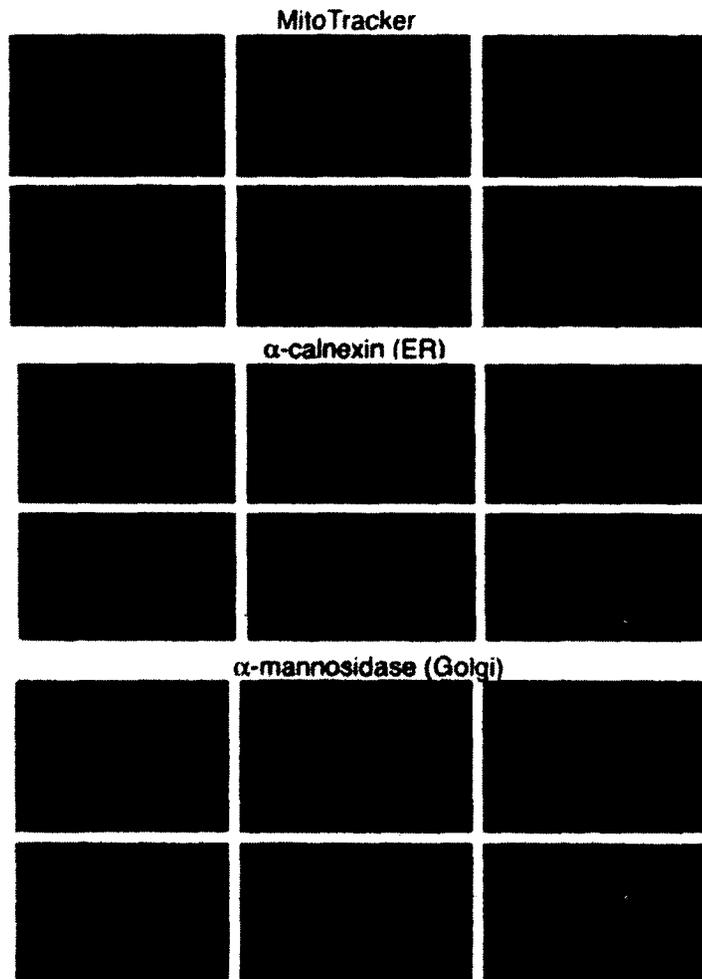


Figure 10 : Localisation de Gimap5. Les études effectuées avec une étiquette GFP en C-terminal démontrent la localisation de GIMAP5 au niveau des mitochondries, du RE et du Golgi. Cellules HEK 293T transfectées avec Gimap5-GFP humain. Gimap5 en vert, organelle en rouge. À droite, superposition des images (adapté de Sandal et al., 2003).

Plusieurs de ces études ont été faites dans les cellules 293T (Zenz et al., 2004, Nitta et al., 2006). Ces cellules sont faciles à utiliser, mais ne représentent pas la réalité puisqu'elles ne sont pas des cellules du système immunitaire et qu'il est possible que GIMAP5 n'affecte

pas la physiologie de ces cellules. Les autres groupes ont utilisé les cellules Jurkat, une lignée tirée d'un lymphome à cellules T. De plus, ces études utilisent une étiquette en C-terminal, où se trouve le domaine transmembranaire. D'autres groupes ont aussi démontré une interaction entre GIMAP5 et les protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL (Nitta et al., 2006). L'équipe de Sandal a aussi démontré une fonction antiapoptotique à GIMAP5. Les cellules Jurkat qui surexpriment GIMAP5 sont protégées contre l'exposition aux radiations gamma et à l'acide okadaïque. La surexpression de GIMAP5 empêche l'apoptose induite par ces deux stimuli. Cependant, un autre groupe a démontré que la surexpression de GIMAP5 sauvage ainsi que la protéine GIMAP5 tronquée induisent la mort cellulaire dans les cellules Jurkat (Dalberg et al., 2007). De plus, les cellules T de rats *gimap5^{lyp/lyp}* ne sont pas plus sensibles aux radiations gamma que les cellules T de rats sauvages (Dion et al., 2005). Afin de vérifier ces résultats, un étudiant de notre laboratoire a effectué des centrifugations différentielles avec des lysats de cellules de rat et de souris. (Figure 11) (Keita et al., 2007). Les cellules ont été lysées par cavitation à l'azote et centrifugée une première fois à 1000xg, une deuxième fois à 10000xg et une troisième fois à 100000xg (voir matériel et méthode). Les culots de chaque centrifugation ont été analysés par immunobuvardage de type western. Les marqueurs de mitochondries (Cytochrome C) et du RE (KDEL) ont été utilisés afin de vérifier l'emplacement de GIMAP5. Les résultats démontrent la présence du cytochrome C et de KDEL dans les culots des centrifugations à 10000xg (p10) et la présence de GIMAP5 dans les culots des centrifugations à 100000xg (p100) des lymphocytes T (Keita et al., 2007), suggérant que GIMAP5 ne co-localise pas avec ces organelles.

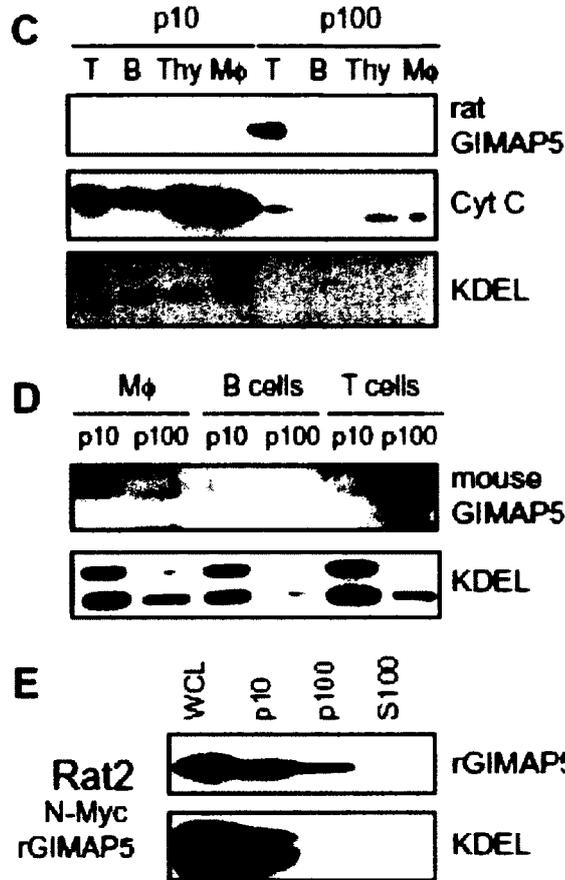


Figure 11 : Localisation cellulaire de la protéine GIMAP5 endogène. Essai de centrifugation différentielle. Les différents culots et surnageants ont été analysés par immunobuvardage de type western. La protéine GIMAP5 endogène se retrouve dans le compartiment p100, dans le culot où les échantillons ont été centrifugés à 100000xg pendant 1h30. Les mitochondries et le RE se retrouvent eux dans le compartiment p10, dans le culot des échantillons centrifugés à 10000xg pendant 10 minutes (adapté de Keita et al., 2007).

1.3.2 La mutation *lyp* affecte le potentiel membranaire des mitochondries

Les résultats de notre laboratoire n'ont pu démontrer une quelconque localisation de GIMAP5 avec les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou une interaction avec Bcl-2 cependant, en absence de GIMAP5, les cellules T provenant de rats *gimap5^{lyp/lyp}* montrent une perte précoce du potentiel membranaire des mitochondries (Figure 12) (Keita et al., 2007). Les mitochondries saines retiennent le colorant TMRE (Tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate), tandis que, suite à une perte du potentiel membranaire des

mitochondries, le TMRE n'est plus retenu par ces dernières. Chez le rat $\text{gimap5}^{\text{lyp/lyp}}$, il y a une augmentation du nombre de mitochondries ne retenant pas le TMRE par rapport au rat sauvage (Keita et al., 2007). Ceci mène à la conclusion que GIMAP5 est nécessaire au maintien du potentiel membranaire des mitochondries chez les lymphocytes T de rat (Keita et al., 2007).

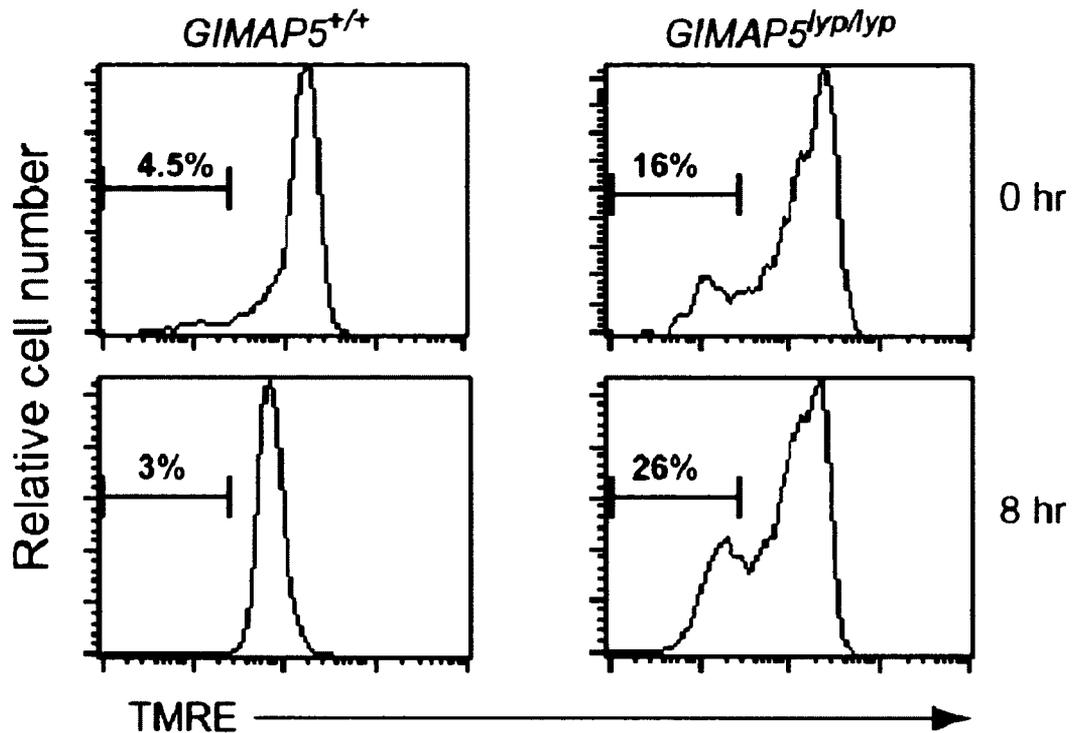


Figure 12 : Perte du potentiel membranaire des mitochondries du rat $\text{gimap5}^{\text{lyp/lyp}}$. Analyse par cytométrie de flux des lymphocytes T purifiés de ganglions de rats incubés avec le TMRE. Les mitochondries de rats $\text{gimap5}^{\text{lyp/lyp}}$ retiennent moins le TMRE, ce qui suggère une baisse du potentiel membranaire des mitochondries en l'absence de la protéine GIMAP5 fonctionnelle (adapté de Keita et al., 2007).

1.4 Homéostasie du calcium dans les cellules T

Lors de l'activation des cellules T, il y a activation de plusieurs protéines qui mènent à la relâche du calcium par le réticulum endoplasmique (Smith-Garvin et al., 2009). Une fois le PIP_2 clivé en IP_3 et DAG, l' IP_3 migre vers le RE et se lie à son récepteur. Une fois lié au récepteur, le calcium est libéré du RE. Après cette relâche du calcium par le réticulum, il y

a oligomérisation de la protéine STIM1 et cette dernière migre vers la membrane plasmique afin d'activer les CRAC (Calcium release activated calcium channels) qui permettent l'entrée du calcium extracellulaire (Smith-Garvin et al., 2009). Le calcium nouvellement entré permet la signalisation de plusieurs voies (Smith-Garvin et al., 2009). Aussi, ce calcium nouvellement entré se doit de retourner à l'état d'équilibre. Le réticulum endoplasmique est le principal endroit de stockage du calcium dans la cellule, cependant les mitochondries sont reconnues comme étant un tampon du calcium dans la cellule (Carafoli, 2002). Lorsqu'il y a trop de calcium, les mitochondries peuvent en stocker une partie afin de permettre l'homéostasie du calcium.

1.4.1 Rôle des mitochondries dans l'homéostasie du calcium

En plus de produire l'ATP, les mitochondries jouent un rôle important au niveau de l'homéostasie du calcium (Rizzuto et al., 1994). Les mitochondries sont des tampons du calcium intracellulaire (Figure 13) (Carafoli, 2002). Lors de l'entrée du calcium via les CRAC, le calcium forme des «hotspots» (concentration plus élevée de calcium à cet endroit) et les mitochondries se dirigent à cet endroit afin d'absorber le calcium et réduire la concentration dans le cytoplasme (Carafoli, 2002). La même chose se produit lors de la libération du calcium par le réticulum endoplasmique (Carafoli, 2002). Cette absorption rapide du calcium par les mitochondries a pour but de maintenir l'homéostasie du calcium dans le cytoplasme et active le mécanisme des mitochondries (Carafoli, 2002). Le calcium étant le principal messenger secondaire à l'intérieur de la cellule, il est important de bien le réguler.

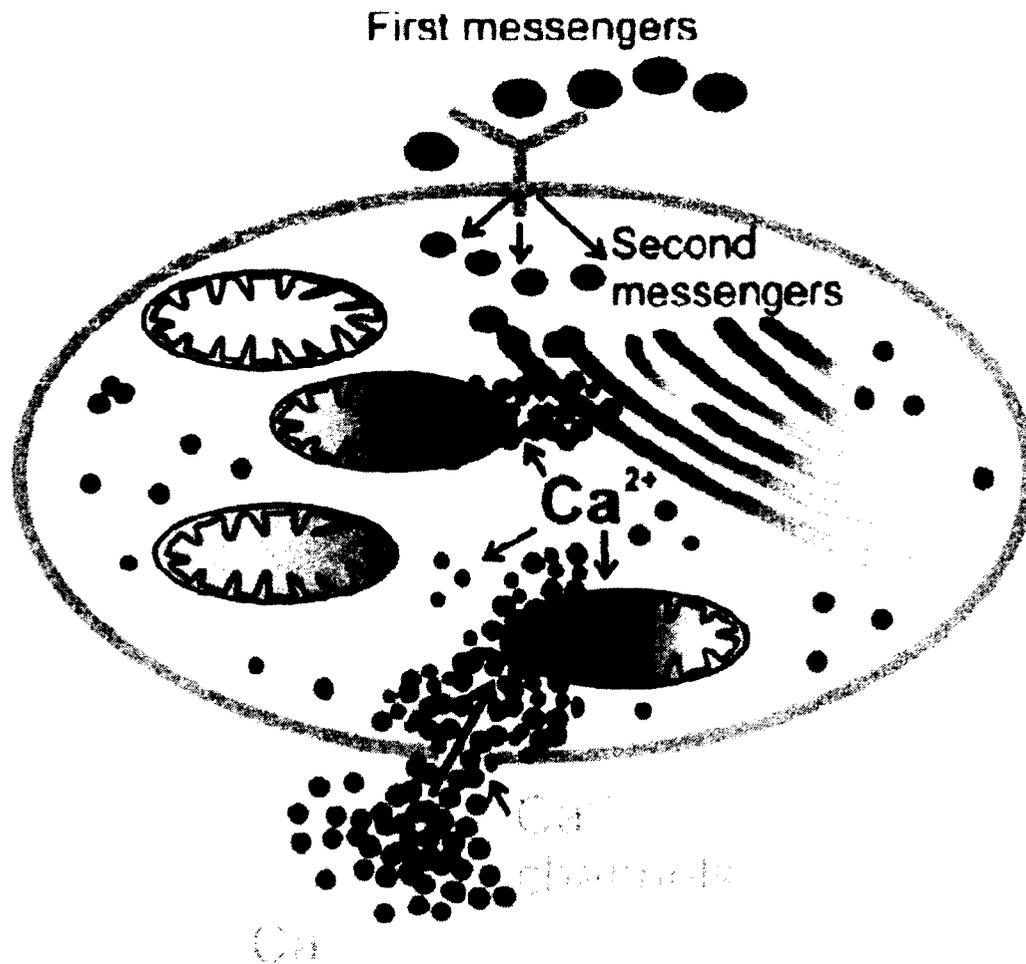


Figure 13 : Les mitochondries contrôlent l'homéostasie du calcium. Lors de la libération de calcium par le RE ou lors de l'entrée du calcium par les canaux calciques, le calcium s'accumule en «Hot Spots». Les mitochondries permettent une régulation de la concentration calcique en absorbant le calcium afin de rétablir l'homéostasie (adapté de Carafoli, 2002).

1.4.2 L'entrée du calcium externe est déficiente chez les rats $gimap5^{lyp/lyp}$

Des résultats récents du laboratoire ont démontré un défaut lors de l'entrée du calcium à l'intérieur de la cellule et une faible réponse calcique lors de l'activation du TCR pour ce qui est des rats $gimap5^{lyp/lyp}$ (Figure 14) (Ilangumaran et al., 2009). Les cellules primaires de rat ont été incubées avec un marqueur de calcium intracellulaire, Fura Red et Fluo-4 et stimulées avec la thapsigargin, une drogue qui permet le vidage des stocks de calcium du

réticulum endoplasmique et prévient le retour à la normale en inhibant les pompes calciques du réticulum (SERCA) (Calbiochem). Ce vidage des stocks amène une variation du flux calcique. Chez les rats *gimap5^{lyp/lyp}*, cette variation du flux calcique est significativement diminuée par rapport aux rats sauvages. Cette étude a aussi été effectuée avec une stimulation du TCR en utilisant un anticorps contre le TCR et le résultat est le même (Ilangumaran et al., 2009). Une autre expérience menée chez les cellules primaires de rats avec le marqueur de calcium interne Fura2/AM a été effectuée. Les cellules ont été stimulées avec la thapsigargin dans un milieu sans calcium afin de vider le RE. Le milieu a ensuite été changé pour du milieu contenant du calcium, et l'entrée du calcium dans la cellule a été mesurée. Les cellules de rats *gimap5^{lyp/lyp}* démontrent une diminution de l'entrée du calcium externe (Ilangumaran et al., 2009). Ce défaut est détecté pendant les stades de développement des lymphocytes T qui démontrent une augmentation de l'apoptose, soit les thymocytes SP et les lymphocytes T périphériques (Ilangumaran et al., 2009).

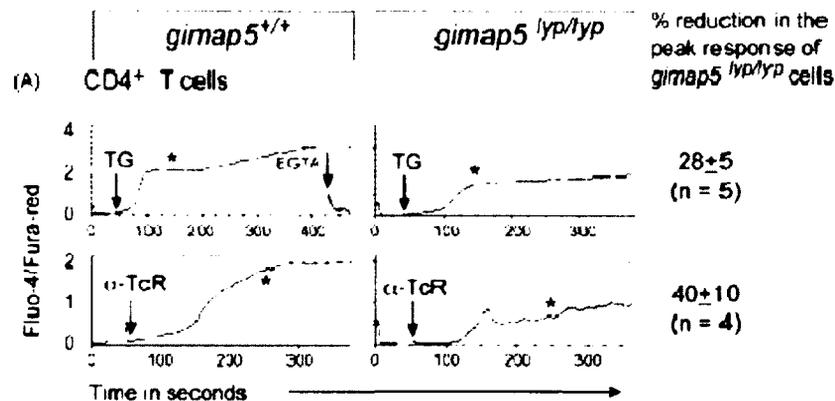


Figure 14 : Flux calcique réduit dans les cellules T de rats *gimap5^{lyp/lyp}*. Analyse en cytométrie de flux des lymphocytes T purifiés activés par stimulation du TCR ou par vidage des stocks de Ca^{2+} du RE. La réponse calcique suite à une activation du TCR ou au vidage des stocks du RE est diminué chez les cellules T de rats *gimap5^{lyp/lyp}* (adapté de Ilangumaran et al., 2009).

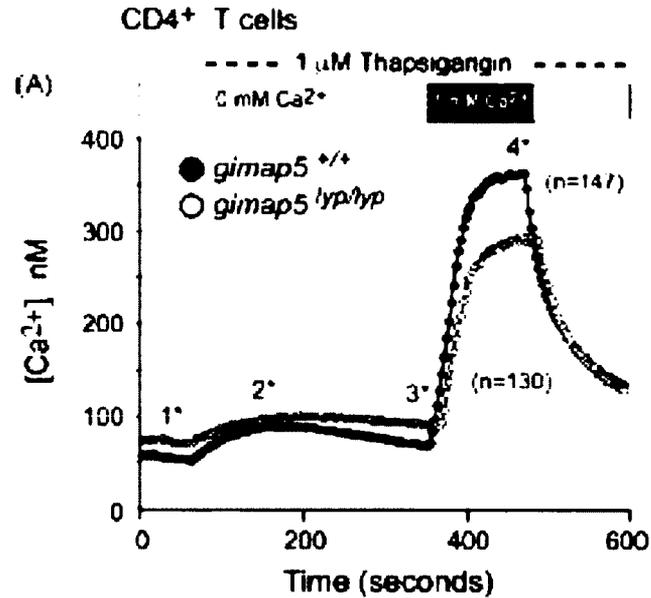


Figure 15 : Entrée du calcium externe compromise dans les cellules T de rats *gimap5*^{lyp/lyp}. Analyse par vidéomicroscopie calcique de lymphocytes T purifiés et stimulés par vidage des stocks de Ca²⁺ du RE. Le vidage des stocks de calcium du RE par la thapsigargin amène une entrée du calcium externe. Une baisse de cette entrée du calcium est observée chez les cellules T des animaux *gimap5*^{lyp/lyp} (adapté de Ilangumaran et al., 2009).

La libération du calcium par le RE suite à une stimulation par la thapsigargin n'est pas affectée chez les lymphocytes T *gimap5*^{lyp/lyp}. Ceci démontre que la réduction du flux calcique à l'intérieur de ces cellules n'est due qu'au défaut lors de l'entrée externe du calcium (Ilangumaran et al., 2009).

2. Hypothèse de recherche

Suites aux découvertes impliquant l'interaction entre GIMAP5 et l'intégrité des mitochondries chez le rat $gimap5^{lyp/lyp}$ et aux découvertes impliquant GIMAP5 et le flux calcique des lymphocytes, nous nous sommes intéressés à la possibilité que GIMAP5 pourrait être impliquée dans l'homéostasie du calcium. Mon hypothèse de recherche est que la protéine GIMAP5 régule la survie des lymphocytes T en agissant sur la signalisation et l'homéostasie du calcium dans les lymphocytes T.

2.1 Objectifs de recherche

Afin de répondre à mon hypothèse de recherche, je me suis fixé 4 objectifs :

- Cloner la protéine GIMAP5
- Identifier la localisation cellulaire de GIMAP5
- Identifier les partenaires d'interaction de GIMAP5
- Identifier la voie de signalisation de GIMAP5

3. Matériels et Méthodes

Clonage

Le clonage du gène de GIMAP5 humain a été fait à partir du vecteur pOBT7 contenant le gène. La polymérase ADN Taq Phusion de haute fidélité (Finnzymes, Espoo, Finlande) a été utilisée. Des amorces (IDT, Coralville, IA) ont été dessinées afin d'incorporer un site de restriction (BamH1 ou EcoR1), d'insérer une séquence Kozak en amont afin de permettre une meilleure liaison des ribosomes, et une étiquette Myc en N-terminal. L'étiquette a été placée en N-terminal afin de s'assurer qu'elle n'interfère pas avec le domaine transmembranaire situé en C-terminal de GIMAP5.

Tableau 3 : Amorces pour Gimap5 (BamH1, EcoR1, Kozak, Tag Myc)

Amorce sens	Amorce anti-sens
5'-GCTCGGATCCACC ATGGAACAAAACTTATTTCTGAA GAAGATCTGGGCGGCTTTCAG-3'	5'-CTGCAGAATTCAA TATAATGAAAAATAAACAG-3'

Tableau 4 : Programmation du cycle PCR

Température (°C)	Temps	Cycles
98	2 min	-
98	45 sec	30
60	30 sec	
72	1 min	
72	5 min	-

Une fois amplifié, le gène a été inséré dans le vecteur pcDNA3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) par digestion avec les enzymes de restriction BamH1 et EcoR1 (New England Biolab,

Ipswich, MA) 2h à 37°C. L'insert a ensuite été ligué à l'aide de la ligase ADN T4 (New England Biolab, Ipswich, MA) 4h à 16°C.

Transformation bactérienne

Des bactéries compétentes DH5α ont été transformées avec le vecteur contenant le gène de GIMAP5 afin d'amplifier la construction. Les bactéries ont été transformées par choc thermique. En présence du plasmide, les bactéries ont été incubées 30 min sur glace, 45 sec à 42°C et 2 min sur glace. Elles ont été placées à 37°C dans du milieu LB pendant 1h30. Les bactéries ont ensuite été placées sur un milieu LB contenant de l'agar et de l'ampicilline pendant 24h à 37°C.

Préparation d'ADN

Les colonies ayant poussé ont été lysées et leur ADN a été extrait en utilisant le tampon de lyse LiCl et du lysozyme. Le tout a été bouilli 1 min et incubé sur glace 5 min. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 9600 x g 10 min. Le culot (protéines) a été enlevé à l'aide d'un cure-dent stérile. De l'isopropanol a été ajouté et le tout a été centrifugé à 9600 x g 15 min. Le milieu a été retiré et de l'éthanol 70% a été ajouté. Une autre centrifugation 9600 x g 10 min a été effectuée. L'éthanol a été enlevé et le culot a été séché à l'air. De l'eau contenant de la RNase a été ajoutée afin de dissoudre l'ADN. L'ADN a ensuite été digéré par les enzymes de restriction BamH1 et EcoR1. Les colonies contenant l'insert ont ensuite été utilisées afin de faire une préparation maxi d'ADN à l'aide du kit H.P. Purelink Maxiprep (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Rats

Les rats utilisés sont des rats AcI.1u (*gimap5^{+/+}*) et des rats AcI.1u^{*lyp/lyp*} (*gimap5^{lyp/lyp}*) (Dr P. Poussier, Université de Toronto, ON). Les rats AcI.1u^{*lyp/lyp*}, qui possèdent la même mutation du locus *lyp* que les rats BB-DP, sont utilisés afin d'éviter les complications dues au diabète, puisqu'ils ne développent pas cette maladie. Les AcI.1u sont utilisés comme contrôles.

Cultures cellulaires

Les cellules HEK 293T ont été gardées en culture dans du milieu DMEM complet avec 10% FCS. Les cellules Jurkat ont été gardées en culture dans du milieu RPMI complet avec 10% FCS.

Prélèvement de cellules primaires

Les rats (AcI.1u et AcI.1u^{lyp/lyp}) ont été euthanasiés par CO₂ selon les lignes directrices du comité d'éthique de l'Université de Sherbrooke. Après l'euthanasie, les ganglions inguinaux, axillaires, brachiaux, mésentériques et cervicaux ont été prélevés. Les ganglions ont ensuite été broyés et les cellules ont été conservées dans du PBS 5% FCS. Une fois prélevées, les cellules T CD4⁺ ont été purifiées de manière négative en incubant ces cellules avec des anticorps anti-CD8 (OX8) et anti-cellules B (MK1). Ces cellules ont ensuite été incubées avec des billes magnétiques anti-IgG Dynal (Invitrogen, Carlsbad, CA). Les cellules ont été placées sur une colonne magnétique et les cellules T CD4⁺ ont été récupérées dans le liquide passant au travers de la colonne. Les CD4⁺ ont été ensuite utilisées pour d'autres expériences.

Transfections

Les cellules HEK 293T ont été transfectées avec le plasmide Gimap5-pcDNA3.0 à l'aide de polyfect (Qiagen, Mississauga, ON). Les cellules Jurkat ont été transfectées avec Gimap5-pcDNA3.0 à l'aide de TransIT-Jurkat (Mirus, Madison, WI).

Cavitation à l'azote

Les cellules transfectées et les cellules primaires ont été placées dans un tampon de sucrose contenant des inhibiteurs de protéases et placées sous 150 psi d'azote (lignées cellulaires) ou 300 psi d'azote (cellules primaires) pendant 15 min. Les lysats ont été centrifugés à 1000xg 2 min. Les noyaux se retrouvent dans le culot et les surnageants ont été centrifugés à nouveau à 10000xg 10 min. Les mitochondries et le réticulum endoplasmique se retrouvent dans le culot et les surnageants ont été centrifugés à 100000xg 1h30. Les protéines membranaires se retrouvent dans le culot. Les culots ont été solubilisés dans du tampon d'échantillon afin d'être analysés par immunobuvardage de type western.

Immunoprécipitation

Les cellules transfectées ont été lysées avec le tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases. Les lysats ont été centrifugés à 15000xg 15 min afin de retirer les noyaux. Les surnageants ont été incubés avec un anticorps dirigé contre une protéine d'intérêt et des billes de sépharose protéine G (General Electric Healthcare, Fairfield, CT). Le tout a ensuite été centrifugé à 1000xg afin de recueillir les complexes. Les complexes ont été solubilisés dans le tampon d'échantillon afin d'être analysés par immunobuvardage de type western.

Immunobuvardage de type western

Les échantillons ont été placés sur un gel d'acrylamide et migrés pendant 1h45 à 120 volts. Le gel a été placé sur une membrane de PVDF et le transfert a été effectué à 100 volts pendant 1h10. La membrane a ensuite été lavée avec du TBS 0.1% Tween (TBST) et bloquée dans du TBST 5% lait 1h. La membrane a été incubée avec l'anticorps primaire O/N à 4°C. Ensuite, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP 1h à T.P. La membrane a été révélée avec de l'ECLplus en utilisant le Versadoc (Bio-Rad, Hercules, CA).

Marquages immunofluorescents

Les cellules (lignées ou primaires) ont été fixées sur lamelles de 15mm avec 2% PFA. Elles ont ensuite été perméabilisées avec du PBS 0.2% Triton X. Elles ont été ensuite bloquées avec du PBS 2% lait. Elles ont été incubées avec l'anticorps primaire O/N à 4°C dans une chambre humide. Elles ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore après lavage. Les cellules ont été incubées avec DAPI afin de marquer les noyaux (Invitrogen, Carlsbad, CA) et fixées sur lame de microscopes avec Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) et du verni à ongle pour sceller la lamelle. Pour certaines expériences, les cellules ont été préincubées avec un colorant fluorescent spécifique pour les mitochondries. Ce colorant diffuse passivement par la membrane plasmique et s'accumule dans les mitochondries vivantes.

Microscopie

La microscopie a été effectuée à l'aide d'un microscope confocal FV1000 à balayage spectral (Olympus, Markham, ON) et du logiciel FluoView (Olympus, Markham, ON).

Anticorps et Réactifs

Les anticorps dirigés contre Bip/GRP78, Paxillin, Connexin-43 et Bcl-2 ont été achetés chez BD Pharmingen Biosciences (Palo Alto, CA). Le marqueur de mitochondries MitoTracker et le marqueur de calcium mitochondrial Rhod-2, la sous-unité B de la toxine du cholera couplée à AlexaFluor 647 (radeaux lipidiques) ainsi que les anticorps secondaires couplés aux Alexafluor (488, 545, 633) ont été achetés chez Invitrogen (Carlsbad, CA). La thapsigargin a été achetée chez Calbiochem (Gibbstown, NJ). Les anticorps contre l'étiquette Myc, LARG et MACF1 proviennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Les anticorps secondaires couplés à la HRP ont été achetés chez Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

4. Résultats

4.1 Clonage de GIMAP5 humain

Le gène humain de GIMAP5 a été utilisé afin d'identifier les protéines d'interaction. GIMAP5 humain est reconnu pour sa surexpression dans les lymphomes de cellules B et les cellules de cancer pulmonaire, où GIMAP5 humain confère un avantage au niveau de la survie de ces cellules (Zenz et al., 2004). De plus, il n'existe aucune librairie d'ADN d'origine lymphoïde de rat qui nous permet d'effectuer une étude double-hybride (voir la section partenaire d'interaction de GIMAP5 humain). Le gène humain de GIMAP5 a été cloné en ajoutant une étiquette Myc, afin de permettre une meilleure identification par anticorps, à l'intérieur du vecteur pcDNA3.0. Ce vecteur contient une origine de réplication eucaryotique qui permet l'expression du gène à l'intérieur de cellules eucaryotes. Les cellules HEK293T ont été transfectées avec différents isolats du clone hGIMAP5-pcDNA3.0. L'expression de hGIMAP5 a ensuite été vérifiée par immunobuvardage de type western à l'aide d'un anticorps anti-Myc qui est l'étiquette de hGIMAP5 (Figure 16). Parmi les cinq différents clones de hGIMAP5-pcDNA3.0, seul les clones 4 et 5 expriment la protéine à haut niveau. Le clone 4 a été choisi pour effectuer les expériences suivantes. La séquence de la protéine a été vérifiée par séquençage.

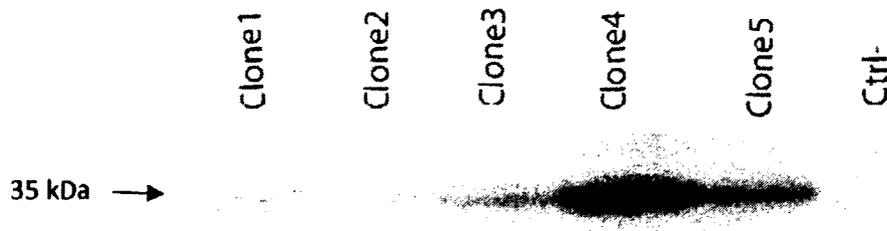
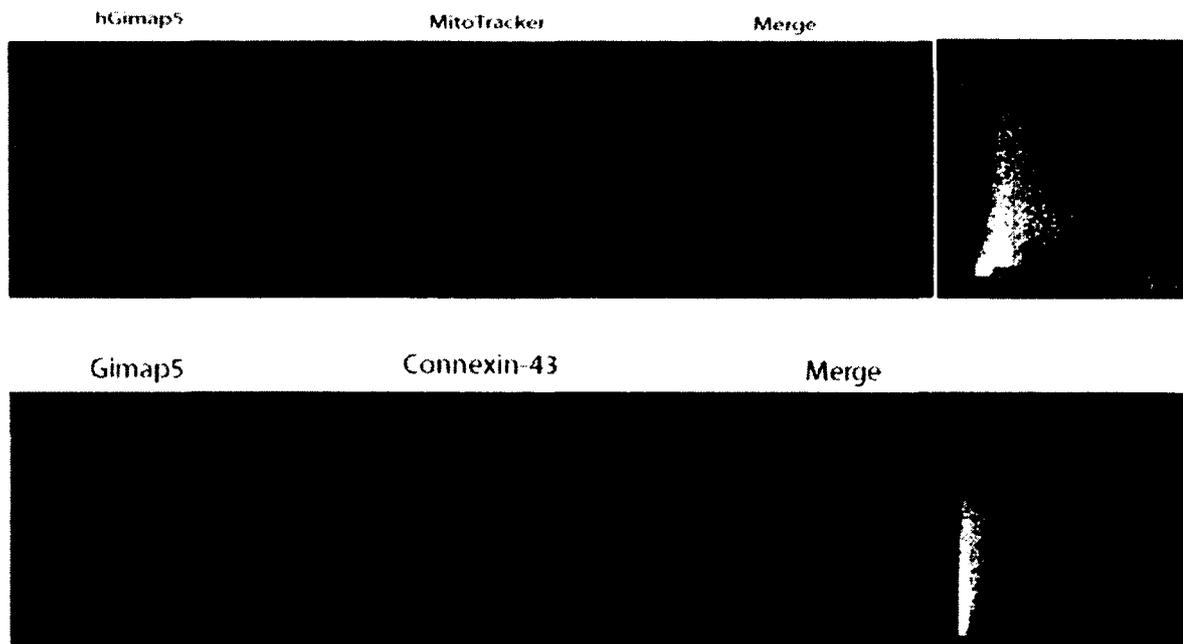


Figure 16 : Expression de GIMAP5 dans les cellules HEK293T

4.2 Localisation cellulaire de GIMAP5 humain

Il a été démontré par Keita et al. en 2007 que GIMAP5 de rat possède une localisation cellulaire distincte du réticulum endoplasmique (RE), des mitochondries, du Golgi et du noyau. L'équipe de Sandal (Sandal et al., 2003) a démontré une localisation de GIMAP5 dans le RE, les mitochondries et le Golgi. L'équipe de Zenz (Zenz et al., 2004) a, quant à elle, démontré la localisation de GIMAP5 dans les mitochondries. En utilisant l'étiquette en N-terminal, ce qui n'interfère pas avec le domaine transmembranaire en C-terminal et n'interfère pas avec le ciblage de la localisation de la protéine, nous avons déterminé la localisation de GIMAP5 humain. Les cellules HEK293T et Jurkat ont été fixées et marquées pour GIMAP5 humain (anti-Myc) et avec des anticorps fluorescents spécifiques aux organelles. Le marquage a ensuite été vérifié par microscopie confocale. Chez les 293T, la protéine GIMAP5 humaine ne co-localise pas avec les mitochondries, les points d'adhésion focaux, les lysosomes ou les jonctions gap (Figure 17). Cependant, la protéine hGIMAP5 semble être exprimée également dans le réticulum endoplasmique (Figure 18). Cette co-localisation peut être expliquée par la surexpression de la protéine à l'intérieur de la cellule, puisque les protéines nouvellement synthétisées passent par le réticulum endoplasmique avant de se retrouver dans le cytoplasme.



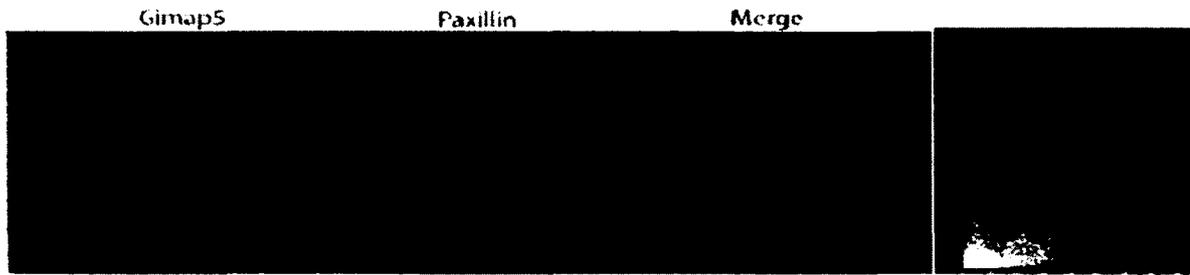


Figure 17 : hGIMAP5 ne co-localise pas avec les mitochondries, les points d'adhésion focaux et les jonctions «gap». Microscopie confocale de hGIMAP5 avec différentes organelles dans les cellules HEK 293T. À gauche, GIMAP5 est marqué par un anticorps dirigé contre son étiquette (c-Myc). Au centre, les organelles Paxillin et Connexin-43 sont marquées avec un anticorps contre eux et Mitotracker est un marqueur fluorescent qui diffuse passivement dans les mitochondries. À droite, superposition des images et cytofluorogramme. Les cytofluorogrammes nous démontrent l'absence de co-localisation. Barre=5 μ m. n=3 par expérience.

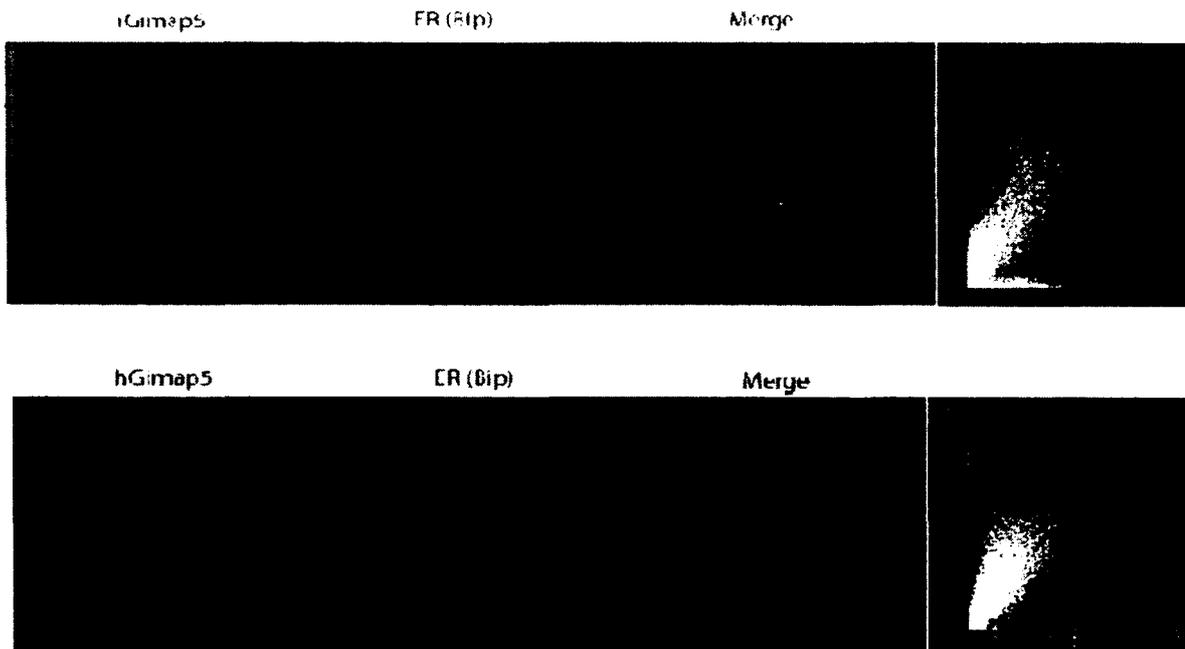
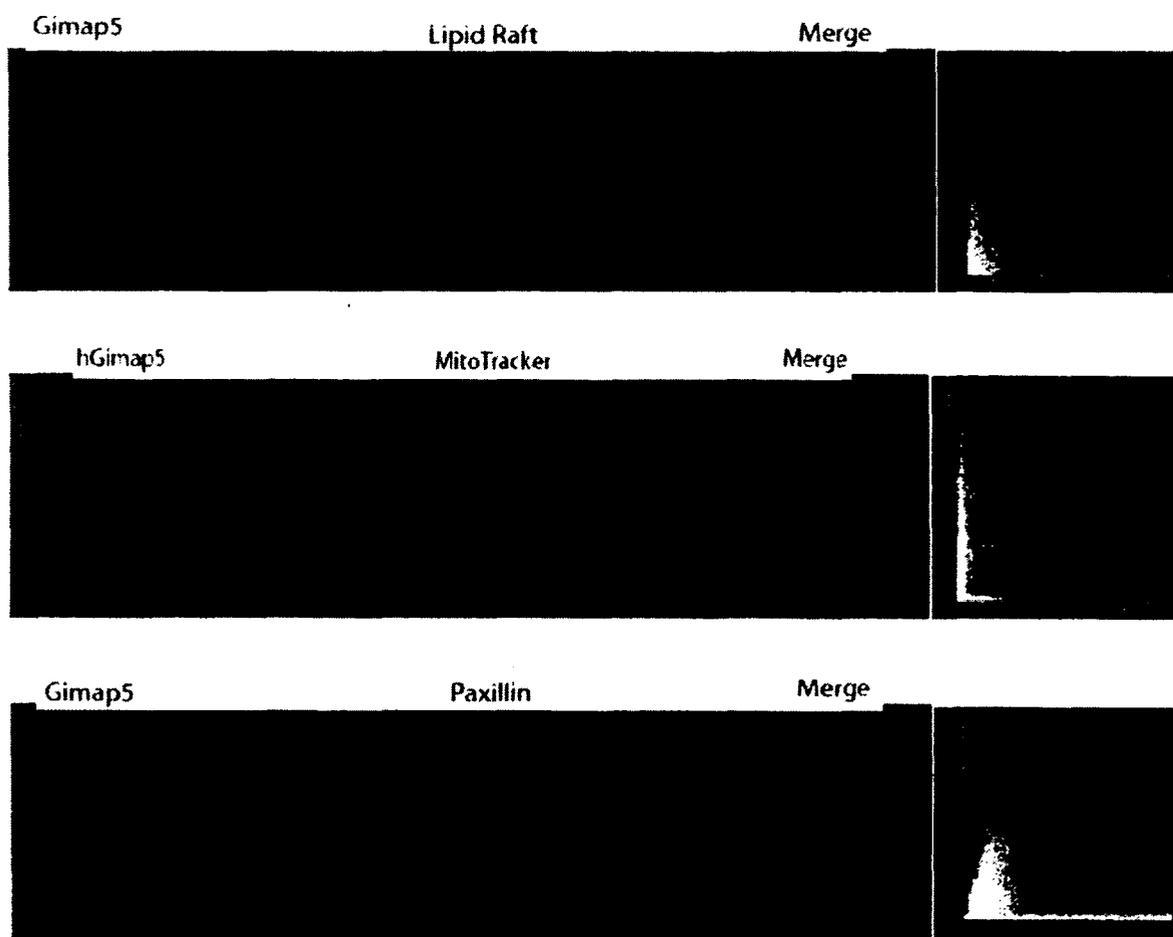


Figure 18 : Expression de hGIMAP5 dans le RE. Microscopie confocale de hGIMAP5 avec la protéine Bip (protéine chaperonne du RE) dans les cellules HEK 293T. À gauche, GIMAP5 est marquée avec un anticorps contre son étiquette (c-Myc). Au centre, le RE est marqué avec un anticorps contre Bip. À droite, superposition des images et cytofluorogramme. Barre=5 μ m. n=3.

Puisque la protéine GIMAP5 humaine n'est exprimée que chez les cellules d'origine hématopoïétique, il est possible que les protéines qui interagissent avec GIMAP5 ne soient pas présentes dans les cellules HEK 293T. C'est pourquoi nous avons effectué les tests de localisation cellulaire chez les cellules leucémiques T Jurkat. Chez ces cellules, hGIMAP5 ne co-localise pas avec les mitochondries, les points d'adhésion focaux, les lysosomes ou les radeaux lipidiques (membrane plasmique). L'expression de hGIMAP5 dans le réticulum endoplasmique n'a pu être vue dans les cellules Jurkat (Figure 19).



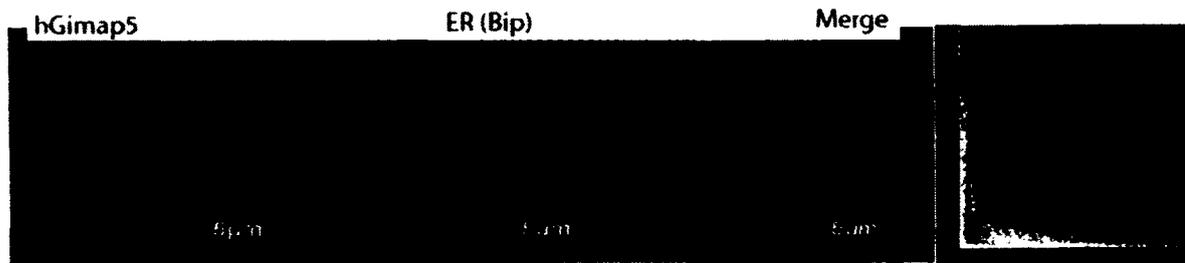


Figure 19 : hGIMAP5 n'est pas exprimé dans le RE, les mitochondries, la membrane plasmique ou les points d'adhésion focaux dans les cellules Jurkats. À gauche, GIMAP5 est marqué avec un anticorps contre son étiquette (c-Myc). Au centre, marquage des organelles avec des anticorps (Paxillin et Bip) ou avec un marqueur fluorescent (Mitochondries et radeaux lipidiques). À droite, superposition des images et cytofluorogramme. Cellules Jurkat. Barre=5μm. n=3 par expérience.

4.3 Partenaires d'interaction de GIMAP5 humain

Puisque nous n'avons pu identifier la localisation cellulaire de hGIMAP5 par microscopie confocale, nous avons utilisé une approche différente, soit la technique de double-hybride. Celle-ci utilise un gène rapporteur qui est traduit et exprimé lorsqu'il y a interaction entre les deux protéines. La première protéine est appelée appât. Elle est exprimée dans un vecteur et celle-ci est liée à un domaine de liaison à l'ADN. La protéine hGIMAP5 a été utilisée comme appât, cependant, une protéine hGIMAP5 tronquée à 285 a.a. a été utilisée afin d'éliminer le domaine transmembranaire. La deuxième protéine est appelée prédateur. Cette protéine est exprimée par un vecteur et est liée à un domaine de transcription de l'ADN. S'il y a une interaction entre l'appât et le prédateur, le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transcription sont réunis et il y a transcription et expression du gène rapporteur. Afin de déterminer les partenaires possibles d'interaction de GIMAP5 humain, le laboratoire a fait faire une étude de double-hybride sur une banque d'ADN de lymphocytes humain par une compagnie de biotechnologie française appelée Hybrigenics. Quelques protéines sont ressorties (Tableau 5) avec des pointages faibles (cote de D). Les interactions sont cotées de A à F, A étant une interaction forte et F un faux positif. Nous avons choisi d'utiliser la protéine MACF1, qui est une protéine du cytosquelette qui effectue le lien entre les microtubules et les filaments d'actine, puisqu'elle est ressortie à plusieurs reprises. L'autre protéine utilisée est LARG, qui est une protéine du cytoplasme

échangeuse de GTP qui est impliquée dans les leucémies. TTC3 n'a pas été utilisée, puisque cette protéine est surtout exprimée au niveau des neurones.

Tableau 5 : Protéines ayant interagit avec GIMAP5 lors de l'étude double-hybride. Les six protéines principalement ressorties de l'étude sont Ankyrin Repeat Domain 17 (ANKRD17), CD97, Leukemia associated Rho GEF (LARG), Microtubule and Actin Crosslinking Factor 1 (MACF1), Taline 1 (TLN1) et Tetratricopeptide repeat domain 3 (TTC3).

Clone Name	Type Seq	Gene Name (Best Match)	Start Stop	Frame	Sens	% Id 5p	% Id 3p	DBS	
p829_A-6	5p/3p	Homo sapiens - ANKRD17	2430..2858	IF		93.2	99.8	☐	
p829_A-1	5p/3p	Homo sapiens - ANKRD17	2430..2858	IF		85.8	99.5	☐	
p829_A-9	3p	Homo sapiens - CD97	..799	??			100.0	☐	
p829_A-22	5p/3p	Homo sapiens - CD97	87..802	IF		99.4	99.7	☐	
p829_A-12	5p/3p	Homo sapiens - FBXL11	1296..1980	IF		99.6	98.8		
p829_A-25	5p/3p	Homo sapiens - FBXL11	1296..1980	IF		99.9	99.5		
p829_A-2	5p/3p	Homo sapiens - FBXL11	1296..1980	IF		98.8	98.9		
p829_A-17	5p/3p	Homo sapiens - KIAA0355	5434..5049	☐	??	N	95.9	99.7	N/A
p829_A-4	5p/3p	Homo sapiens - LARG	1869..2674	IF		99.6	99.2	☐	
p829_A-21	5p/3p	Homo sapiens - LARG	1869..2674	IF		99.9	99.5	☐	
p829_A-3	5p/3p	Homo sapiens - MACF1	12771..13579	IF		99.4	99.8	☐	
p829_A-10	5p/3p	Homo sapiens - MACF1	12771..13579	IF		99.1	99.4	☐	
p829_A-13	5p/3p	Homo sapiens - MACF1	12771..13579	IF		98.7	99.1	☐	
p829_A-20	5p/3p	Homo sapiens - MACF1	12771..13579	IF		86.2	98.5	☐	
p829_A-24	5p/3p	Homo sapiens - MACF1	12771..13579	IF		99.4	99.8	☐	
p829_A-15	5p/3p	Homo sapiens - SGTB	261..996	☒	IF	80.2	82.0	☐	
p829_A-7	5p/3p	Homo sapiens - TLN1	5670..6055	IF		99.2	99.2	☐	
p829_A-8	5p/3p	Homo sapiens - TLN1	5670..6055	IF		99.0	100.0	☐	
p829_A-11	5p/3p	Homo sapiens - TTC3	4452..4827	IF		94.7	100.0	☐	
p829_A-16	5p/3p	Homo sapiens - TTC3	4452..4827	IF		95.4	99.5	☐	
p829_A-14	5p/3p	Homo sapiens - TTC3	4452..4827	IF		100.0	100.0	☐	
p829_A-23	5p/3p	Homo sapiens - TTC3	4452..4827	IF		100.0	100.0	☐	

Symbols	Means
≠	The fragment contains the full length CDS
☐	Fragment is fully in 5' UTR
☐	Fragment is fully in 3' UTR
☒	Fragment contains at least one In Frame STOP codon
[NR]	Fragment was found to be non relevant (poor quality, high N density)
IF OOF1 OOF2	With regard to the theoretical frame of each corresponding CDS (GeneBank), fragments are cloned in frame (IF) if they are in the same frame as GalAAD. In general, polypeptides synthesized from OOF fragments are not considered of biological interest, unless found together with another frame. However, some of the proteins expressed from an OOF fragment can be translated in the correct frame, due to the existence of natural frame-shift events during translation in yeast.
??	Unidentified frame when : - The clone sequence is antisense - The 5p sequence is missing
N	Antisense

4.3.1 Interaction de hGIMAP5 avec MACF1

La protéine MACF1 (Figure 20) pour *Microtubule and actin crosslinking factor 1* est une protéine du cytosquelette de 650 kDa de la famille des spectraplakins qui, comme son nom l'indique, permet la liaison entre les microtubules et les filaments d'actine (Wu et al., 2008).

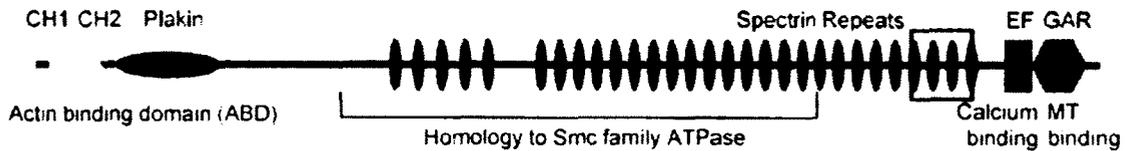


Figure 20 : Représentation de la protéine MACF1. (Wu et al., 2008).

Afin de vérifier l'interaction de MACF1 avec hGIMAP5, nous avons premièrement voulu vérifier la présence de MACF1 dans différents lysats cellulaires. Nous avons ensuite voulu vérifier, par immunoprécipitation de hGIMAP5, la présence de MACF1 dans les précipités. Finalement, à l'aide de la technique de centrifugation différentielle, nous avons voulu vérifier la présence de MACF1 dans les différents compartiments de centrifugation différentielle. La protéine MACF1 n'a pu être vue sur aucun immunobuvardage de type western, ceci pouvant être dû à son haut poids moléculaire (650 kDa).

Ne pouvant voir la protéine MACF1 par immunobuvardage de type western, nous avons utilisé un marquage fluorescent et la technique de microscopie confocale afin de déterminer si GIMAP5 humain et MACF1 sont exprimées dans un patron semblable d'expression (Figure 21). La protéine MACF1 est exprimée dans les cellules HEK 293T et les cellules Jurkat, mais il n'y a pas de co-localisation entre MACF1 et hGIMAP5 dans ces cellules.



Figure 21 : hGIMAP5 et MACF1 ne co-localisent pas dans les cellules HEK 293T. Microscopie confocale de hGIMAP5 et MACF1. À gauche, MACF1 a été marqué avec un anticorps contre lui. Au centre, GIMAP5 a été marqué avec un anticorps contre son étiquette (c-Myc). À droite, superposition des images et cytofluorogramme. Le même résultat a été observé dans les cellules Jurkat. Barre=5µm. n=6.

4.3.2 Interaction entre LARG et hGIMAP5

Leukemia-associated Rho Guanine exchange factor (LARG) (figure 22) est une protéine du cytoplasme de 220 kDa dans la famille des GEF (Guanine exchange factor) dont la fonction est d'échanger un GDP pour un GTP sur la petite protéine G Rho (Suzuki et al., 2008).

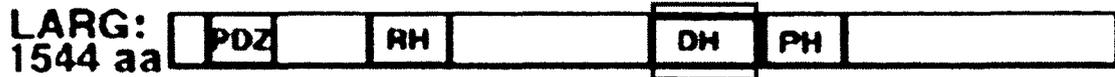


Figure 22 : Représentation de la protéine LARG. (Suzuki et al., 2008).

Comme pour la protéine MACF1, nous avons effectué plusieurs tests afin de déterminer l'interaction de LARG avec hGIMAP5. Premièrement, nous avons effectué un immunobuvardage de type western sur différents lysats cellulaires (Figure 23).

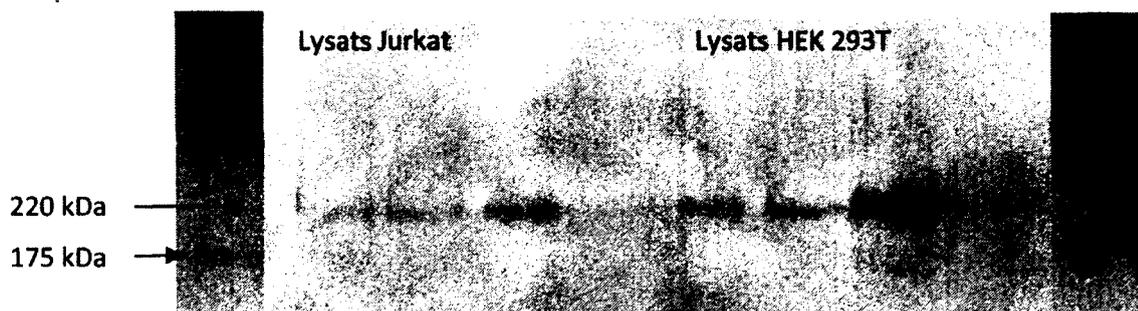


Figure 23 : Immunobuvardage de type western de la protéine LARG. La protéine LARG est présente dans les lysats cellulaires des cellules HEK 293T et Jurkat.

Nous avons ensuite voulu vérifier la présence de LARG dans les immunoprécipitations de hGIMAP5 où la protéine n'a pu être identifiée par immunobuvardage de type western. Finalement, nous avons vérifié la présence de LARG dans les différents compartiments de centrifugation différentielle (Figure 24). La protéine LARG se retrouve dans le surnageant de la centrifugation à 100000xg (S100) tandis que GIMAP5 se retrouve dans le culot de cette centrifugation (P100).

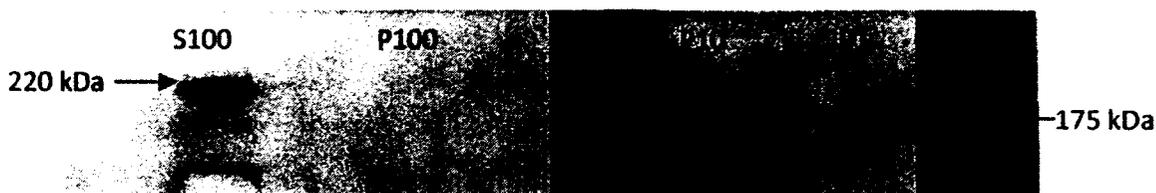


Figure 24 : Immunobuvardage de type western de LARG dans les compartiments de centrifugation différentielle. La protéine LARG se retrouve dans le surnageant final (S100).

Nous avons ensuite effectué des marquages fluorescents que nous avons analysés par microscopie confocale afin de déterminer le patron d'expression de LARG avec hGIMAP5 (Figure 25). La co-localisation de LARG avec hGIMAP5 n'a pu être vu dans les cellules HEK 293T et les cellules Jurkat.

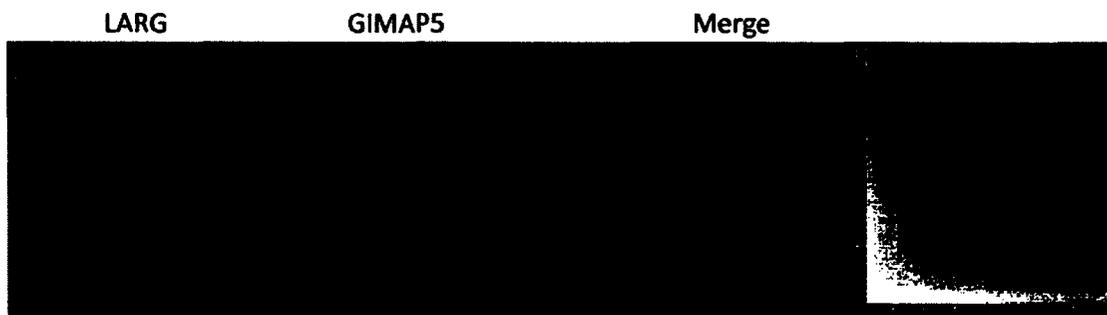


Figure 25 : hGIMAP5 et LARG ne co-localisent pas dans les cellules HEK 293T. Microscopie confocale de LARG avec hGIMAP5 dans les cellules HEK 293T. À gauche, la protéine LARG a été marquée avec un anticorps contre elle. Au centre, GIMAP5 a été marquée avec un anticorps contre son étiquette (c-Myc). À droite, superposition des images et cytofluorogramme. Le même résultat a été observé dans les cellules Jurkats. Barre=5µm. n=6.

4.3.3 Identification des partenaires d'interaction de hGIMAP5 par spectrométrie de masse

Dans une autre approche, nous avons voulu identifier les autres protéines pouvant interagir avec hGIMAP5. Nous avons donc pris les culots de centrifugation à 100000xg (P100) qui contiennent hGIMAP5 et une analyse de spectrométrie de masse a été effectuée en collaboration avec le laboratoire du Dr Klaus Klarskov au département de pharmacologie.

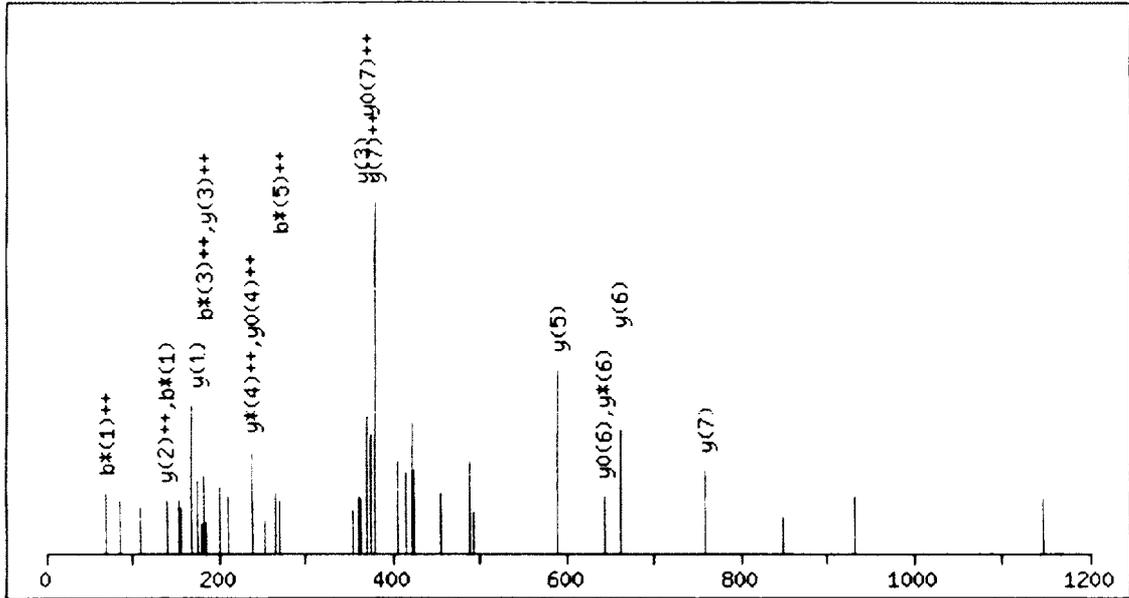


Figure 26 : Spectrométrie de masse des échantillons P100. Les échantillons P100 ont été trypsinisés et analysés par LC/MS/MS dans le laboratoire du Dr Klaus Klarskov. Ceci est une représentation des poids des différents peptides détectés.

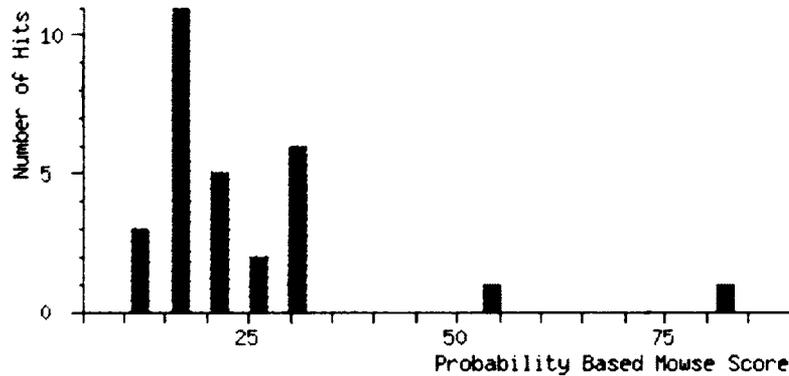


Figure 27 : Résultats des pointages de peptides. Les différents peptides identifiés ont été analysés par le logiciel Mascot. Les pointages de plus de 42 sont considérés comme étant significatif.

Plusieurs protéines ont été identifiées, mais les protéines étaient présentes en faible quantité et les pointages d'identification étaient trop bas, ce qui nous empêche de confirmer une interaction spécifique. Les deux pointages de plus de 42 ont été identifiés comme étant de la kératine, ce qui signifie une possible contamination avec des cellules de la peau.

4.4 Implication de GIMAP5 dans la signalisation du calcium

Les résultats précédemment publiés par notre laboratoire démontrent un déficit lors de l'entrée du calcium externe dans les lymphocytes T de rats $gimap5^{lyp/lyp}$. Il a aussi été démontré que ces cellules ont un défaut membranaire au niveau des mitochondries, vu par la perte du potentiel membranaire des mitochondries chez les lymphocytes T $gimap5^{lyp/lyp}$ (Keita et al., 2007). De par ces observations, nous avons conclu qu'il pourrait y avoir un défaut dans l'accumulation du calcium par les mitochondries des lymphocytes T des rats $gimap5^{lyp/lyp}$. Nous avons donc vérifié l'accumulation du calcium dans les mitochondries après la stimulation de cellules T CD4⁺ primaires de rats $gimap5^{+/+}$ et de rat $gimap5^{lyp/lyp}$. Les cellules ont été pré incubées avec le marqueur Rhod-2, qui marque le calcium intramitochondrial. Ces cellules ont ensuite été stimulées à différents temps, 0, 15, 30, 45, 60, 75 et 90 minutes, avec la thapsigargin, qui vide les stocks de calcium du RE et permet une entrée du calcium extracellulaire, et ont été fixées et marquées par fluorescence afin d'être analysées en microscopie à fluorescence. Les cellules T CD4⁺ primaires de rats $gimap5^{+/+}$ ont un recrutement du calcium dans les mitochondries à 30 minutes avec un maximum à 45 minutes et une perte de signal à 60 minutes (Figure 26). Les cellules T CD4⁺ primaires de rats $gimap5^{lyp/lyp}$ ont un recrutement du calcium dans les mitochondries à 60 minutes qui est continu jusqu'à 90 minutes (Figure 27). Il y a donc un retardement dans le recrutement du calcium par les mitochondries chez les rats mutants. La mutation *lyp* amène aussi un retard dans le retour à la normale dans les cellules T CD4⁺.

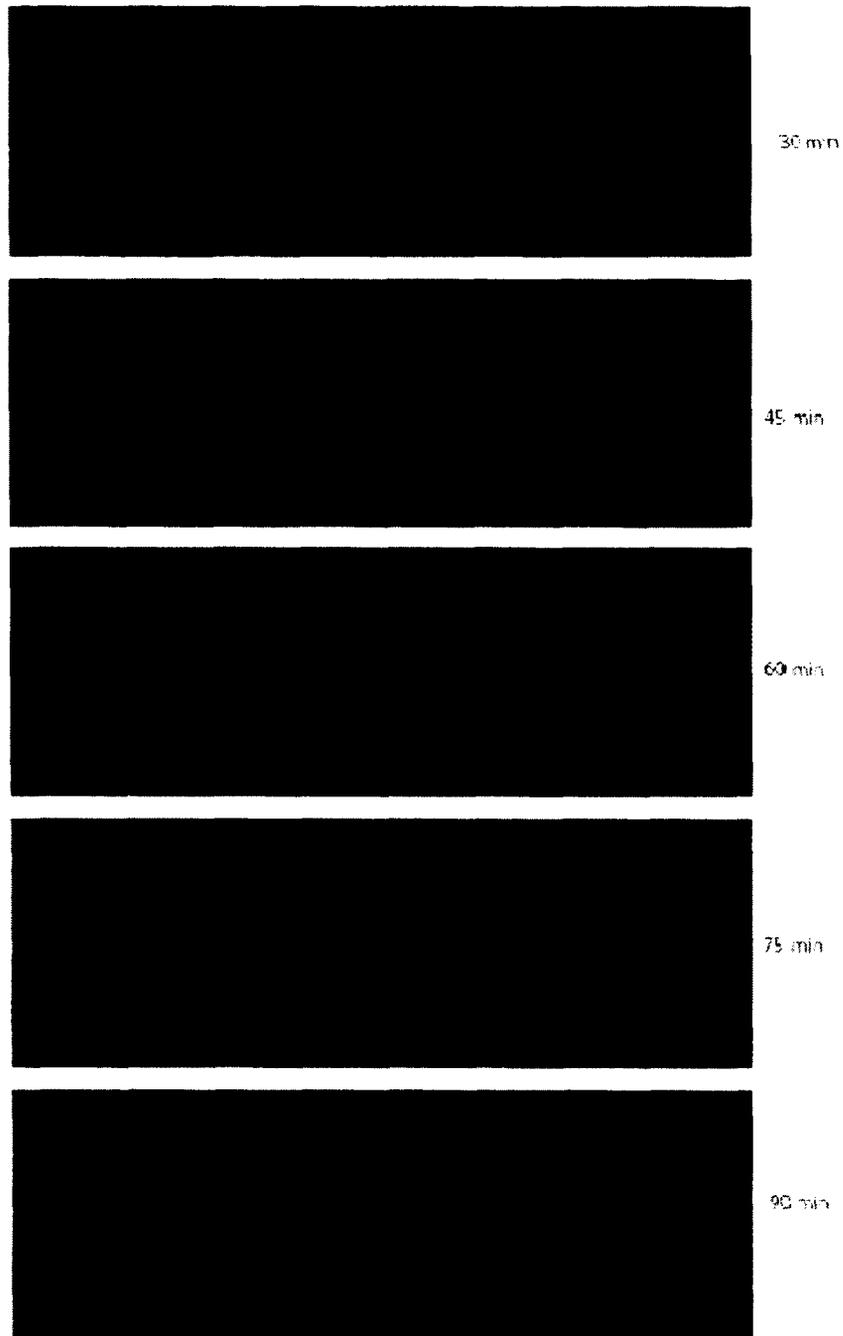


Figure 28 : Incorporation du calcium vu par Rhod-2 dans les cellules T CD4⁺ de rats *gimap5^{+/+}*. Les noyaux en bleu (DAPI) et l'incorporation du calcium en rouge (Rhod-2). L'incorporation débute à 30 min et a un maximum à 45 min. Le tout revient à la normale après 60 min. Barre=5μm

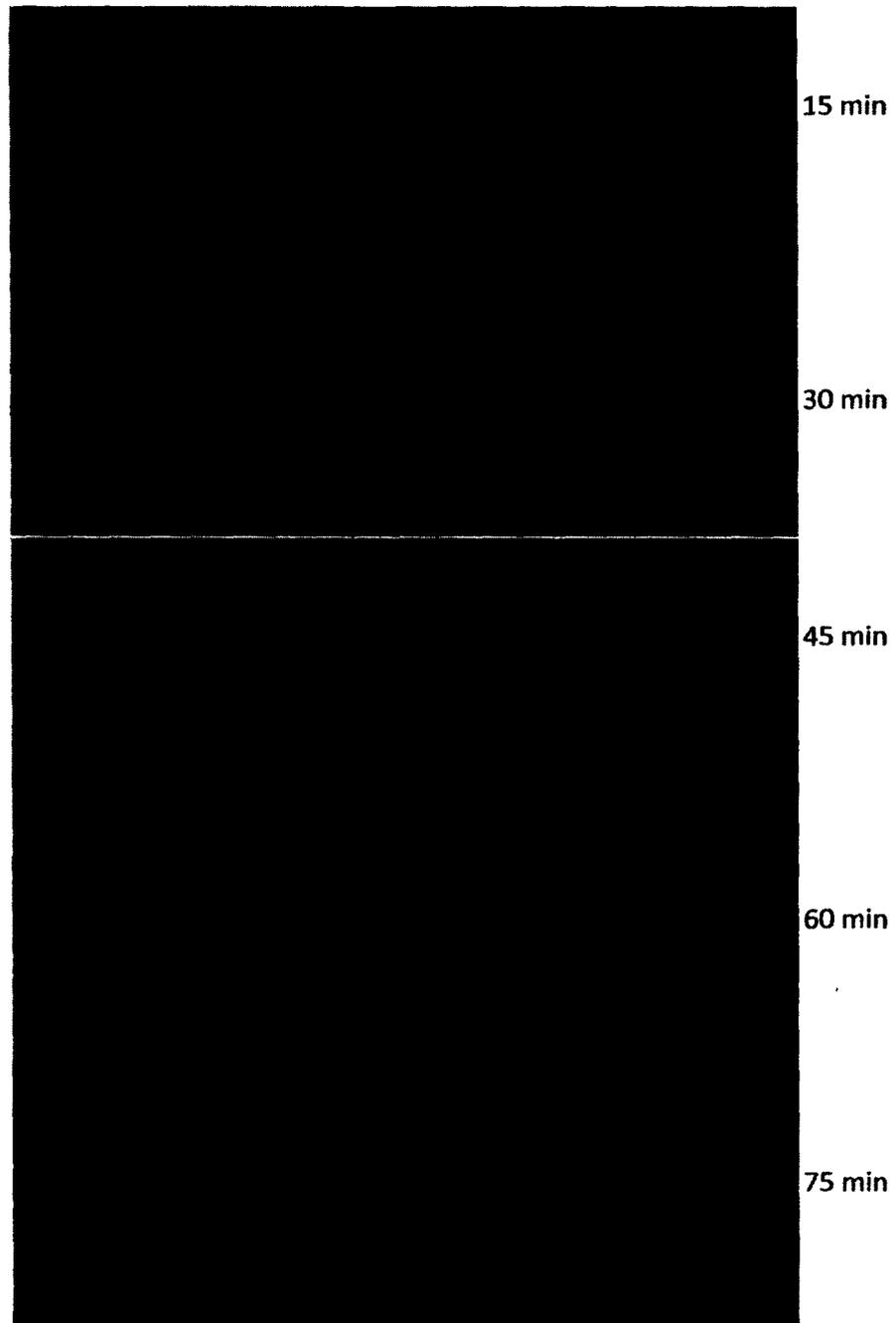


Figure 29 : Incorporation du calcium vu par Rhod-2 dans les cellules T CD4⁺ de rats *gimap5^{Lyp/Lyp}*. Les noyaux en bleu (DAPI) et le calcium en rouge (Rhod-2). L'incorporation est retardée par rapport aux cellules de rats *gimap5^{+/+}* à 45 min et le retour à la normale est, lui aussi, retardé. Barre=5µm

5. Discussion

5.1 Clonage de GIMAP5 humain

L'instauration d'une lignée stable de cellules exprimant hGIMAP5 aurait pu nous aider à vérifier les effets à long terme de l'expression de la protéine hGIMAP5 chez ces cellules (HEK 293T et Jurkat). Il est connu dans la littérature que la surexpression de hGIMAP5 dans les lignées cellulaires de cellules T, comme la lignée Jurkat, induit l'apoptose de ces cellules (Dalberg et al., 2007). L'instauration d'une lignée stable aurait pu nous permettre de vérifier l'impact réel de la surexpression de hGIMAP5 sur des lignées autres que les lignées de cellules T. Puisque la surexpression de GIMAP5 est mortelle pour les lignées de cellules T, GIMAP5 n'a pas été exprimée sous promoteur inductible puisque nous voulions une expression continue, mais à court terme.

5.2 Localisation cellulaire de GIMAP5 humain

La localisation de hGIMAP5 est controversée, puisque différents articles la localisent à différents endroits. Cependant, la majorité de ces articles utilisent une étiquette ou une protéine GFP en C-terminal de hGIMAP5. Ceci peut interférer avec le domaine transmembranaire de hGIMAP5 et affecter sa distribution à l'intérieur de la cellule. L'utilisation d'une étiquette en N-terminal par notre laboratoire peut être une raison pour laquelle il nous est impossible de reproduire les résultats de localisation des autres laboratoires. Des tests avec les étiquettes en N et C-terminal et avec une délétion du domaine N ou C-terminal pourraient nous donner une idée sur l'influence de l'étiquette sur la localisation de la protéine. De plus, un article paru dans Cell en 2008 par Koenig et al., y décrit la structure des protéines transmembranaires Toc33/Toc34. Ces GTPases servent de transporteurs transmembranaires au niveau des chloroplastes. Leur structure est très similaire à celle de GIMAP5 (Koenig et al., 2008). Ceci pourrait expliquer l'importance du domaine transmembranaire de GIMAP5 et nous donner un indice sur la localisation et la fonction de GIMAP5.

5.3 Partenaires d'interaction de GIMAP5 humain

L'étude de double hybride effectuée par la compagnie française Hybrigenics n'a pas donné les résultats attendus. Seulement sept protéines ont été identifiées avec un score coté D. Ceci peut être un faux positif puisque cette cote est la plus basse. L'étude de double-hybride se fait dans des conditions idéales, puisque les deux protéines qui interagissent ensemble sont surexprimées. Il est aussi possible que ces protéines ne se situent pas dans le même compartiment à l'intérieur de la cellule et l'interaction est donc peu probable puisque ces protéines ne seront jamais à proximité. Des essais de clonage et d'immunoprécipitation ont été effectués avec d'autres protéines résultantes de l'étude, mais sans succès. Les domaines d'interaction des protéines de l'étude ont été clonés et co-transfectés avec hGIMAP5 et des immunoprécipitations ont été effectuées. Les complexes immuns ont été analysés par spectrométrie de masse, mais seule la protéine GIMAP5 a été identifiée. Nous devrions nous concentrer plus sur la spectrométrie de masse. Cette méthode permet d'identifier les protéines présentes dans un extrait cellulaire sans savoir quelles protéines sont présentes et sans avoir recours aux anticorps et à l'immunobuvardage de type western (technique qui nécessite de connaître la protéine). Malgré un essai infructueux, cela semble être la meilleure option afin de découvrir les partenaires potentiels d'interaction de hGIMAP5. En augmentant la quantité de protéines analysées, nous aurions plus de chance de découvrir une protéine pouvant interagir avec GIMAP5.

De plus, il est possible que la forme inactive de hGIMAP5 n'interagisse pas suffisamment avec ces partenaires cibles. Il n'est pas encore connu si le domaine GTPase de hGIMAP5 peut lier le GTP ou hydrolyser le GTP en GDP. Si seulement la forme GTP active de hGIMAP5 est fonctionnelle, il serait nécessaire de vérifier les deux formes en effectuant des tests avec un mutant de hGIMAP5 liant de manière constitutive le GTP. Cependant, avant de pouvoir le faire, le site de liaison au GTP doit être identifié sur hGIMAP5. Ces expériences sont en cours dans le laboratoire en collaboration avec le Dr J. H. Weiden (University of Lethbridge, AB).

5.4 Implication de GIMAP5 dans la signalisation du calcium

Le rôle de GIMAP5 dans la signalisation du calcium amène une nouvelle voie de recherche dans ce projet. Un défaut lors de la signalisation du calcium lors de l'activation du TCR, dans les rats $gimap5^{lyp/lyp}$, démontre que le calcium est impliqué dans la signalisation, en aval de l'activation basale et homéostatique du TCR, qui est importante pour la survie des cellules T naïves (Ilangumaran et al., 2009). Ce défaut survient au moment de l'expression du complexe fonctionnel du TCR par les lymphocytes T, soit au niveau du stade des thymocytes SP $CD4^+$ ou $CD8^+$ (Ilangumaran et al., 2009). Cette observation est en accord avec les observations de Schwarz et al. en 2007 qui démontrent l'importance de l'augmentation du flux calcique pour la survie des cellules T. Malgré une diminution du flux calcique dans les cellules T $gimap5^{lyp/lyp}$ par rapport aux cellules T $gimap5^{+/+}$, l'augmentation à l'intérieur des cellules en réponse aux mitogènes pour les expériences *in vitro* et à l'antigène *in vivo* semble être suffisante pour permettre la survie des cellules T $gimap5^{lyp/lyp}$ (Ilangumaran et al., 2009). Chez le rat BB-DP, l'interaction TCR-CMH/peptide du soi provoquerait un flux calcique trop faible pour maintenir la survie des cellules T, tandis que l'autoantigène des îlots β du pancréas provoquerait un flux calcique suffisant, ce qui amènerait vers une expansion des cellules T autoréactives et une destruction du pancréas (Ilangumaran et al., 2009). La libération du calcium du RE engendre l'oligomérisation de la protéine STIM1 et sa migration vers la membrane plasmique afin d'y activer les CRAC et de permettre l'entrée du calcium externe (Smith-Garvin et al., 2009). Une hypothèse serait que GIMAP5 serait important dans le regroupement ou la migration de la protéine STIM1. Ceci pourrait expliquer le défaut lors de l'entrée externe du calcium sans effet sur la relâche du calcium au niveau du RE. Ce défaut d'entrée du calcium dans la cellule se fait plus ressentir lors de l'activation du TCR par le complexe CMH/peptide du soi pour la survie des lymphocytes T. En effet, cette activation sous mitogénique engendre une plus faible réponse du flux calcique que lors de l'activation du TCR par l'antigène. Ceci pourrait expliquer l'apoptose des cellules T naïves des rats $gimap5^{lyp/lyp}$ dans la périphérie tout en provoquant une expansion des cellules T autoréactives. La vérification de l'expression et du regroupement de STIM1 chez les cellules $gimap5^{lyp/lyp}$ est à faire afin de vérifier cette hypothèse.

Une autre voie possible est celle de l'interaction de CaMKII avec GIMAP5 pour l'accumulation du calcium dans les mitochondries. Calcium/calmoduline dependant kinase II (CaMKII) sont des kinases qui sont activées lors de variations du flux calcique à l'intérieur de la cellule et permettent l'activation de facteur de transcription et augmentent le métabolisme de la cellule. Ceci n'a pas encore été démontré dans notre laboratoire, mais plusieurs résultats nous donnent une bonne piste à suivre afin de découvrir si cette protéine a bel et bien un effet sur la signalisation de GIMAP5 au niveau de la voie calcique. Lors de la stimulation de cellules T CD4⁺ de rats *gimap5^{lyp/lyp}* ou *gimap5^{+/+}*, un retard a été observé dans les cellules T CD4⁺ des rats *gimap5^{lyp/lyp}* lors de l'accumulation du calcium dans les mitochondries. Des études récentes ont démontré que l'accumulation de calcium dans les mitochondries peut dépendre de CaMKII (Timmins et al., 2009). Des essais effectués dans les macrophages ont démontrés que l'accumulation du calcium dans les mitochondries lors de stress est dépendant de CaMKII, puisque lors de stimulations avec un inhibiteur de CaMKII (KN93) il y avait une baisse significative de cette accumulation (Timmins et al., 2009). Cette accumulation de calcium dans les mitochondries se produit lors du stress du RE et mène vers l'apoptose, puisque CaMKII est considérée comme étant pro-apoptotique (Timmins et al., 2009). Une autre étude avait aussi démontrée l'implication de GIMAP5 dans le stress du RE (Pino et al., 2009). L'absence de GIMAP5 chez les rats BB-DP mène à la production de la protéine CHOP (C/EBP-homologous protein), qui est un facteur de transcription activé lors du stress du RE, qui déclenche l'apoptose induite par le stress du RE dans les cellules T (Pino et al., 2009). Cette voie pourrait amener des explications sur l'utilité et la fonction de GIMAP5. L'absence de GIMAP5 dans les cellules T de rats *gimap5^{lyp/lyp}* pourrait amener un défaut lors de l'accumulation du calcium dans les mitochondries et ainsi provoquer une perte du potentiel membranaire des mitochondries. Cette perte du potentiel membranaire pourrait avoir des effets sur la concentration du calcium dans la cellule et ainsi provoquer un stress du RE et même l'apoptose des cellules T induite par le stress du RE. Ceci concorde avec l'hypothèse de l'induction d'un flux calcique insuffisant dans les cellules T des rats *gimap5^{lyp/lyp}* lors de l'interaction TCR-CMH/peptide du soi, ce qui amène la perte de survie des cellules T dans la périphérie de ces rats (Ilangumaran et al., 2009). Des essais d'immunobuvardage de la protéine CaMKII phosphorylée chez les rats *gimap5^{+/+}* et *gimap5^{lyp/lyp}* et des essais d'immunoprécipitation

chez les lignées surexprimants hGIMAP5 sont à faire afin de déterminer l'implication de ces deux protéines dans la survie des cellules T. L'utilisation de cellules T CD4⁺ est justifiée par la mort rapide des cellules T CD8⁺ dans la périphérie chez les rats *gimap5^{lyp/lyp}*. Il est donc très difficile d'isoler ces cellules en quantité suffisante.

Conclusion

La surexpression de hGIMAP5 par transfection dans les lignées cellulaires nous a permis d'étudier la localisation de hGIMAP5 à l'intérieur de la cellule. En utilisant le marquage par immunofluorescence et la microscopie confocale, il a été impossible de confirmer la localisation cellulaire de hGIMAP5 dans les cellules Jurkat. À l'intérieur de cellules HEK 293T, la localisation de hGIMAP5 semble se faire au niveau du RE. Il a été impossible de reproduire les résultats obtenus par les autres études de localisations faites par les autres laboratoires (Sandal et al., 2003, Zenz et al., 2004, Dalberg et al., 2007).

Après avoir fait faire une étude de double-hybride par une compagnie externe (Hybrigenics), les protéines résultantes de l'étude ont été utilisées afin de confirmer le partenariat cellulaire de hGIMAP5 avec ces dernières. Des tests d'immunoprécipitation avec hGIMAP5 ont été effectués sur des cellules de rat *gimap5^{+/+}* afin de vérifier, par immunobuvardage de type western, la présence de ces protéines. Les résultats étant négatifs, l'utilisation de marquages en immunofluorescence et de microscopie confocale fut nécessaire afin de vérifier une seconde fois la co-localisation des protéines. Une fois de plus, les résultats se sont avérés négatifs.

Les résultats de partenariat de hGIMAP5 s'avérant négatifs, la voie de signalisation du calcium semblait une bonne voie d'étude. Après avoir vu une corrélation entre l'absence de GIMAP5 et un défaut dans la signalisation du calcium (Ilagumaran et al., 2009) et une baisse du potentiel membranaire des mitochondries en l'absence de la protéine fonctionnelle (Keita et al., 2007), un marqueur de calcium intramitochondrial a été utilisé afin de déterminer l'incorporation du calcium par les mitochondries chez les cellules T CD4⁺ de rats *gimap5^{lyp/lyp}*. Les rats *gimap5^{+/+}* ont des mitochondries qui incorporent le calcium à partir de 30 min après la stimulation par thapsigargin, avec un maximum à 45 min. Le tout revient à la normale après 60 min. Chez les rats *gimap5^{lyp/lyp}*, on observe une incorporation retardée à 45 min avec un très long retour à la normale (plus de 90 min). Lors de transfections dans les lignées cellulaires, la surexpression de *gimap5* inhibe, peu importe le temps, l'incorporation du calcium par les mitochondries. Plusieurs expériences restent

encore à faire afin de déterminer la voie par laquelle GIMAP5 procède afin de réguler l'homéostasie du calcium intracellulaire, mais la voie de CaMKII semble la plus prometteuse.

Remerciement

Premièrement, j'aimerais remercier ma directrice de recherche Dre Sheela Ramanathan, qui a cru en moi et m'a accueilli dans son laboratoire. Son expertise sur le sujet et son aide personnelle m'ont permis de développer une expertise en laboratoire et un esprit critique. Il est difficile d'être présent pour tous lorsque le laboratoire fourmille d'étudiant cependant, chaque rencontre avec Dre Ramanathan était constructive. Dre Ramanathan a un grand dévouement pour la recherche et le développement de la science, ce qu'elle transmet à ces étudiants.

J'aimerais aussi remercier le Dr Subburaj Ilangumaran, conjoint du Dre Ramanathan et mon co-directeur de recherche. Comme sa conjointe, il nous transmet son dévouement pour la science qui est sans équivoque, ce qui nous amène à nous dépasser à chaque jour. Cette passion est aussi transmise lors de discussions scientifiques que nous avons eues, ce qui m'a permis de me développer en tant que scientifique.

J'aimerais remercier les membres passés du laboratoire, Mélissa Forand-Boulerice et Philippe Rocheleau. Ils m'ont beaucoup aidé lors de ma première année de maîtrise dans le laboratoire. Avec eux, j'ai pu mettre au point des techniques qui m'ont été très utiles tout au long de ma maîtrise. Nos différentes discussions, tant scientifiques que générales, ont été très enrichissantes pour moi.

Un autre merci aux membres présents du laboratoire du Dre Ramanathan et du Dr Ilangumaran, Medhi Yeganeh, Yirui Gui, Xi Lin Chen, Stéphanie Dubois, Chantale Leblanc, Christopher Lamontagne-Blouin, Sridhar Korasikha, Fatima Zeba et Daniel Serrano. Leur aide technique ainsi que les nombreux échanges ont permis de détendre l'atmosphère de résoudre certains problèmes. Un merci particulier à Chantale Leblanc, notre assistante de recherche qui était toujours disponible au niveau technique et personnel.

Merci au Dr Klaus Klarskov pour son aide avec la spectrométrie de masse et au Dr Léonide Volkov pour son aide avec la microscopie confocale.

Enfin, je voudrais remercier ma famille et mes amis pour leur aide personnelle et leur support lors des moments difficiles. Entreprendre des études supérieures demande un certain niveau d'engagement et de sacrifices. Il est parfois difficile de voir la fin et le support des proches est très important. Un merci particulier à ma compagne de vie Jessica qui, dans la dernière année, a su m'encourager, me reconforter et a toujours cru en moi.

Bibliographie

- Barnes, M. J., Aksoylar, H., Krebs, P., Bourdeau, T., Arnold, C. N., Xia, Y., Khovananth, K., Engel, I., Sovath, S., Lampe, K., Laws, E., Saunders, A., Butcher, G. W., Kronenberg, M., Steinbrecher, K., Hildeman, D., Grimes, H. L., Beutler, B. & Hoebe, K. (2010) : Loss of T cell and B cell quiescence precedes the onset of microbial flora-dependent wasting disease and intestinal inflammation in Gimap5-deficient mice. *J Immunol*, 184(7) : 3743-3754.
- Benczik, M., & Gaffen, S. L. (2004) : The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol Invest*, 33(2) : 109-142.
- Boyman, O., Létourneau, S., Krieg, C. & Sprent, J. (2009) : Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur J Immunol*, 39(8) : 2088-2094.
- Cantley, L. C. (2002) : The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573) : 1655-1657.
- Capitini, C. M., Christi, A. A. & Mackall, C. L. (2009) : Modulating T-cell homeostasis with IL-7: preclinical and clinical studies. *J Intern Med*, 266(2) : 141-153.
- Carafoli, E. (2002) : Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(3) : 1115-1122.
- Colle, E., Guttman, R. D. & Seemayer, T. (1981) : Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. I. Association with the major histocompatibility complex. *J Exp Med*, 154(4) : 1237-1242.
- Cousins, L., Graham, M., Tooze, R., Carter, C., Miller, J. R., Powrie, F. M., Macpherson, J. J. & Butcher, G. W. (2006) : Eosinophilic bowel disease controlled by the BB rat-derived lymphopenia/Gimap5 gene. *Gastroenterology*, 131(5) : 1475-1485.
- Dalberg, U., Markholst, H. & Hornum, L. (2007) : Both Gimap5 and the diabetogenic BBDP allele of Gimap5 induce apoptosis in T cells. *Int Immunol*, 19(4) : 447-453.
- Davis, M. C. & Distelhorst, C. W. (2006) : Live free or die: an immature T cell decision encoded in distinct Bcl-2 sensitive and insensitive Ca²⁺ signals. *Cell Cycle*, 5(11) : 1171-1174.
- Dion, C., Carter, C., Hepburn, L., Coadwell, W. J., Morgan, G., Graham, M., Pugh, N., Anderson, G., Butcher, G. W. & Miller, J. R. (2005) : Expression of the Ian family of

putative GTPases during T cell development and description of an I α n with three sets of GTP/GDP-binding motifs. *Int Immunol*, 17(9) : 1257-1268.

Eckman, A. S. (2010) : Type 1 Diabetes. *Medline Plus*, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000305.htm>.

Francfort, J. W., Naji, A., Silvers, W. K. & Barker, C. F. (1985) : The influence of T-lymphocyte precursor cells and thymus grafts on the cellular immunodeficiencies of the BB rat. *Diabetes*, 34(11) : 1134-1138.

Hernández-Hoyos, G., Joseph, S., Miller, N. G. A. & Butcher, G. W. (1999) : The lymphopenia mutation of the BB rat causes inappropriate apoptosis of mature thymocytes. *Eur J Immunol*, 29: 1832-1841.

Hornum, L., Rømer, J. & Markholst, H. (2002) : The diabetes-prone BB rat carries a frameshift mutation in I α n4, a positional candidate of Iddm1. *Diabetes*, 51(6) : 1972-1979.

Hosseinzadeh, H. & Goldschneider, I. (1993) : Recent thymic emigrants in the rat express a unique antigenic phenotype and undergo post-thymic maturation in peripheral lymphoid tissues. *J Immunol*, 150(5) : 1670-1679.

Ilangumaran, S., Forand-Boulerice, M., Bousquet, S. M., Savard, A., Rocheleau, P., Chen, X. L., Dupuis, G., Poussier, P., Boulay, G. & Ramanathan, S. (2009) : Loss of GIMAP5 (GTPase of immunity-associated nucleotide binding protein 5) impairs calcium signaling in rat T lymphocytes. *Mol Immunol*, 46(6) : 1256-1259.

Jacob, H. J., Pettersson, A., Wilson, D., Mao, Y., Lernmark, A. & Lander, E. S. (1992) : Genetic dissection of autoimmune type I diabetes in the BB rat. *Nat Genet*, 2(1) : 56-60.

Jameson, S. C. (2002) : Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2(8) : 547-556.

Jondal, M., Pazirandeh, A. & Okret, S. (2004) : Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol*, 25(11) : 595-600.

Keita, M., Leblanc, C., Andrews, D. & Ramanathan, S. (2007) : GIMAP5 regulates mitochondrial integrity from a distinct subcellular compartment. *Biochem Biophys Res Commun*, 361(2) : 481-486.

Kittipatarin, C. & Khaled, A. R. (2007) : Interlinking interleukin-7. *Cytokine*, 39(1) : 75-83.

Koenig, P., Oreb, M., Höfle, A., Kaltofen, S., Rippe, K., Sinning, I., Schleiff, E. & Tews, I. (2008) : The GTPase cycle of the chloroplast import receptors Toc33/Toc34: implications from monomeric and dimeric structures. *Structure*, 16(4) : 585-596.

Krücken, J., Schroetel, R. M., Müller, I. U., Saïdani, N., Marinovski, P., Benten, W. P., Stamm, O. & Wunderlich, F. (2004) : Comparative analysis of the human gimap gene cluster encoding a novel GTPase family. *Gene*, 341 : 291-304.

Le Champion, A., Bourgeois, C., Lambalez, F., Martin, B., Léaument, S., Dautigny, N., Tanchot, C., Pénit, C. & Lucas, B. (2002) : Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(7) : 4538-4543.

Like, A. A., Kislauskis, E., Williams, R. R. & Rossini, A. A. (1982) : Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. *Science*, 216(4546) : 644-646.

MacMurray, A. J., Moralejo, D. H., Kwitek, A. E., Rutledge, E. A., Van Yserloo, B., Gohlke, P., Speros, S J., Snyder, B., Schaefer, J., Bieg, S., Jiang, J., Ettinger, R. A., Fuller, J., Daniels, T. L., Pettersson, A., Orlebeke, K., Birren, B., Jacob, H. J., Lander, E. S. & Lernmark, A. (2002) : Lymphopenia in the BB rat model of type 1 diabetes is due to a mutation in a novel immune-associated nucleotide (Ian)-related gene. *Genome Res*, 12(7) : 1029-1039.

Marrack, P., Bender, J., Hildeman, D., Jordan, M., Mitchell, T., Murakami, M., Sakamoto, A., Schaefer, B. C., Swanson, B. & Kappler, J. (2000) : Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nat Immunol*, 1(2) : 107-111.

Meehan, C. J., Krajewski, A. S., Butcher, G. W., Smith, W. & Baird, J. D. (1993) : Lymphoma in the BB/E rat: c-myc translocation identified. *J Pathol*, 170(1) : 87-93.

Michie, A. M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2002) : Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin Immunol*, 14(5) : 311-323.

Modigliani, Y., Coutinho, G., Burlen-Defranoux, O., Coutinho, A. & Bandeira, A. (1994) : Differential contribution of thymic outputs and peripheral expansion in the development of peripheral T cell pools. *Eur J Immunol*, 24(5) : 1223-1227.

Nitta, T., Nasreen, M., Seike, T., Goji, A., Ohigashi, I., Miyazaki, T., Ohta, T., Kanno, M. & Takahama, Y. (2006) : IAN family critically regulates survival and development of T lymphocytes. *PLoS Biol*, 4(4) : e103.

Nitta, T. & Takahama, Y. (2007) : The lymphocyte guard-IANs: regulation of lymphocyte survival by IAN/GIMAP family proteins. *Trends Immunol*, 28(2) : 58-65.

Pino, S. C., O'Sullivan-Murphy, B., Lidstone, E. A., Yang, C., Lipson, K. L., Jurczyk, A., diIorio, P., Brehm, M. A., Mordes, J. P., Greiner, D. L., Rossini, A. A. & Bortell, R. (2009) : CHOP mediates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in Gimap5-deficient T cells. *PLoS One*, 4(5) : e5468.

- Plamondon, C., Kottis, V., Brideau, C., Métroz-Dayer, M. D. & Poussier, P. (1990) : Abnormal thymocyte maturation in spontaneously diabetic BB rats involves the deletion of CD4-8+ cells. *J Immunol*, 144(3) : 923-928.
- Poussier, P., Nakhooda, A. F., Falk, J. A., Lee, C. & Marliss, E. B. (1982) : Lymphopenia and abnormal lymphocyte subsets in the "BB" rat: relationship to the diabetic syndrome. *Endocrinology*, 110(5) : 1825-1827.
- Ramanathan, S., Norwich, K. & Poussier, P. (1998) : Antigen activation rescues recent thymic emigrants from programmed cell death in the BB rat. *J Immunol*, 160(12) : 5757-5764.
- Ramanathan, S. & Poussier, P. (2001) : BB rat lyp mutation and Type 1 diabetes. *Immunol Rev*, 184 : 161-171.
- Rees, D. A. & Alcolado, J. C. (2005) : Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*, 22(4) : 359-370.
- Reuber, T. L. & Ausubel, F. M. (1996) : Isolation of arabidopsis genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM7 disease resistance genes. *J Immunol*, 8 : 241-249.
- Rizzuto, R., Bastianutto, C., Brini, M., Murgia, M. & Pozzan, T. (1994) : Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in intact cells. *J Cell Biol*, 126(5) : 1183-1194.
- Roset, R., Ortet, L. & Gil-Gomez, G. (2007) : Role of Bcl-2 family members on apoptosis: what we have learned from knock-out mice. *Front Biosci*, 12 : 4722-4730.
- Sandal, T., Aumo, L., Hedin, L., Gjertsen, B. T. & Døskeland, S. O. (2003) : Irod/Ian5: an inhibitor of gamma-radiation- and okadaic acid-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*, 14(8) : 3292-3304.
- Schulteis, R. D., Chu, H., Dai, X., Chen, Y., Edwards, B., Haribhai, D., Williams, C. B., Malarkannan, S., Hessner, M. J., Glisic-Milosavljevic, S., Jana, S., Kerschen, E. J., Ghosh, S., Wang, D., Kwitek, A. E., Lernmark, A., Gorski, J. & Weiler, H. (2008) : Impaired survival of peripheral T cells, disrupted NK/NKT cell development, and liver failure in mice lacking Gimap5. *Blood*, 112(13) : 4905-4914.
- Schwarz, E. C., Kummerow, C., Wenning, A. S., Wagner, K., Sappok, A., Wagershauser, K., Griesemer, D., Strauss, B., Wolfs, M. J., Quintana, A. & Hoth, M. (2007) : Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *Eur J Immunol*, 37 : 2723-2733.
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. (2009) : T cell activation. *Ann Rev Immunol*, 27 : 591-619.

- Surh, C. D. & Sprent, J. (2008) : Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*, 29(6) : 848-862.
- Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Pérarnau, B., Freitas, A. A. & Rocha, B. (1997) : Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science*, 276(5321) : 2057-2062.
- Timmins, J. M., Ozcan, L., Seimon, T. A., Li, G., Malagelada, C., Backs, J., Backs, T., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., Anderson, M.E. & Tabas, I. (2009) : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest*, 119(10) : 2925-2941.
- Tough, D. F. & Sprent, J. (1994) : Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med*, 179(4) : 1127-1135.
- Van Rees, E. P., Voorbij, H. A. & Dijkstra, C. D. (1988) : Neonatal development of lymphoid organs and specific immune responses in situ in diabetes-prone BB rats. *Immunology*, 65(3) : 465-472.
- Woda, B. A., Like, A. A., Padden, C. & McFadden, M. L. (1986) : Deficiency of phenotypic cytotoxic-suppressor T lymphocytes in the BB/W rat. *J Immunol*, 136(3) : 856-859.
- Yale, J. F., Grose, M. & Marliss, E. B. (1985) : Time course of the lymphopenia in BB rats. Relation to the onset of diabetes. *Diabetes*, 34(10) : 955-959.
- Zadeh, H. H., Greiner, D. L., Wu, D. Y., Tausche, F. & Goldschneider, I. (1996) : Abnormalities in the export and fate of recent thymic emigrants in diabetes-prone BB/W rats. *Autoimmunity*, 24(1) : 35-46.
- Zenz, T., Roessner, A., Thomas, A., Fröhling, S., Döhner, H., Calabretta, B. & Dahéron, L. (2004) : hIan5: the human ortholog to the rat *Ian4/Iddm1/lyp* is a new member of the *Ian* family that is overexpressed in B-cell lymphoid malignancies. *Genes Immun*, 5(2) : 109-116.