

Ecole doctorale des sciences et vie de la santé

Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II)

FACULTE DES SCIENCES DE LUMINY



THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de la méditerranée

Spécialité : Immunologie

Signalisation lymphocytaire T : identification d'un nouveau médiateur lipidique, le phosphatidylinositol 5-phosphate (PtdIns5P).

Présentée par **Geoffrey GUITTARD**

Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM)

INSERM UMR 891

Soutenue le 17 Février 2010 devant le jury composé de :

Pr. Philippe NAQUET	Président
Dr. Frédérique MICHEL	Rapporteur
Pr. Christophe ERNEUX	Rapporteur
Pr. Bernard PAYRASTRE	Examineur
Dr. Jacques NUNES	Directeur de Thèse

Signalisation lymphocytaire T : identification d'un nouveau médiateur lipidique, le phosphatidylinositol 5-phosphate (PtdIns5P).

Introduction Générale	10
Partie I:.....	14
Activation lymphocytaire T	14
La signalisation du TCR.....	18
Signaux activateurs	20
Initiation de la réponse T : la phosphorylation des motifs ITAM	20
L'importance des Src-kinases dans l'activation du TCR.....	20
Structure de la famille des Src-kinases.....	20
Régulation des Src kinases	22
Rôle des Src kinases dans l'activation lymphocytaire T	23
Le signalosome LAT-SLP-76, complexe adaptateur de l'initiation du signal TCR	24
PI3K, un acteur méconnu de la signalisation du TCR.....	25
La voie PI3K lors de l'activation du TCR.....	25
Hypothèses sur le recrutement de la PI3K au niveau du TCR	27
Effecteurs de la PI3K.....	29
Signaux inhibiteurs	31
Régulations Proximales.....	31
Régulateurs négatifs des Srcs kinases	31

Les protéines adaptatrices Dok-1 et Dok-2	32
Régulations Tardives.....	33
Récepteurs inhibiteurs et recrutement de phosphatases	33
La voie HPK-1SLP-76-14-3-3.....	35
L'ubiquitinylation dans la régulation négative du signal TCR.....	36
Conclusion I.....	36
Partie II :	38
Les phosphoinositides	38
La famille des phosphoinositides.....	40
Métabolisme des phosphoinositides et dysfonctionnement	43
Les lipides Kinases	44
Phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K)	44
Classification	44
La PI4KII β dans le lymphocyte T	44
Phosphatidylinositol phosphate kinases (PIPKs)	45
Classification	45
Pathologies associées.....	45
Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)	47
Classification	47
Pathologies associées : Cancer et stratégies anticancéreuses	48
Les lipides phosphatases.....	51
Phosphoinositides 3-phosphatases	51

PTEN (Phosphatases et Tensin homolog deleted on chromosome 10).....	51
<i>Classification</i>	51
<i>Rôle dans le lymphocyte T : PTEN un régulateur négatif du système immunitaire</i>	52
<i>Pathologies associées : PTEN un suppresseur de tumeur</i>	52
La famille des myotubularines (MTMR).....	53
<i>Classification</i>	53
<i>Pathologies associées</i>	53
Les phosphoinositides 4-phosphatases	54
Les PtdIns(3,4)P ₂ 4-phosphatases.....	54
IpgD, le prototype bactérien de la PtdIns(4,5)P ₂ 4-phosphatase	55
Les PtdIns(4,5)P ₂ 4-phosphatases eucaryotes	55
Les phosphoinositides 5-Phosphatases	56
SHIP-1 et SHIP-2: SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase.....	57
<i>Classification</i>	57
<i>Rôle de SHIP dans le lymphocyte T</i>	58
<i>Pathologies associées</i>	59
Conclusions II.A	59
Rôle fonctionnel des phosphoinositides et localisation subcellulaires ...	61
Domaine de reconnaissance des phosphoinositides.....	61
Les domaines PH	62
Les phosphoinositides de la voie classique DAG/IP₃	65
Le PtdIns4P.....	65

Le PtdIns(4,5)P ₂	65
Les D3 phosphoinositides	67
Le PtdIns3P.....	67
Le PtdIns(3,4)P ₂	67
Le PtdIns(3,5)P ₂	68
PtdIns(3,4,5)P ₃	68
Le PtdIns5P	70
Généralités	70
Technique de détection du PtdIns5P : Dosage en masse	70
Variation des taux de PtdIns5P dans divers modèles cellulaires	71
Régulation cytosolique positive de PtdIns5P	71
Régulation cytosolique négative du PtdIns5P	73
Régulation nucléaire	74
Métabolisme du PtdIns5P.....	74
Les lipides Kinases	74
<i>Les PtdIns5P 4-kinases (PIPK II).....</i>	<i>74</i>
<i>PIPK III ou PIKfyve.....</i>	<i>75</i>
Les lipides phosphatases.....	76
<i>MTM1.....</i>	<i>76</i>
<i>la PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases : IpgD.....</i>	<i>76</i>
<i>Les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases eucaryotes.....</i>	<i>77</i>
Ligands du PtdIns5P.....	77
Le Domaine PHD des protéines ING-2 et ATX-1	78

Les domaines PH liant le PtdIns5P.....	79
Fonctions du PtdIn5P.....	80
Rôle dans la voie de survie PI3K/AKT	80
Rôle dans l'organisation du cytosquelette.....	81
Rôle dans le trafic vésiculaire.....	82
Rôle dans l'oncogenèse ?	84
PtdIns5P nucléaire	85
<i>Apoptose en réponse au stress</i>	<i>85</i>
<i>Ubiquitinylation et dégradation protéique</i>	<i>85</i>
<i>Régulateur de l'expression génique.....</i>	<i>87</i>
Conclusions II.B	87
Partie III :.....	90
Les membres de la famille Dok.....	90
Structure des membres de la famille Dok	92
Dok-4 et Dok-5.....	94
Dok-1 et Dok-2.....	96
Le domaine PH De Dok-1 et Dok-2.....	96
Les domaines PTB de Dok-1 et Dok-2	98
Partie carboxy-terminale et fonctions de Dok-1 et Dok-2	99
Régulation négative de la voie Ras/MAPK.....	99
Régulation de protéines Tyrosine Kinases	101
Régulation du cytosquelette.....	101

Régulation du métabolisme lipidique et de la calcémie	102
Dok-1 et Dok-2, molécules suppresseurs de tumeurs ?	102
Fonctions de Dok-1 et Dok-2 dans le lymphocyte T	104
Résultats Expérimentaux	106
Article 1 :.....	108
Régulation des protéines Dok-1 et Dok-2 par le PtdIns5P durant l'activation lymphocytaire T.....	108
Introduction	108
Discussion et résultats complémentaires	112
Recrutement de Dok-1 et Dok-2 au niveau de la membrane plasmique en présence de PtdIns5P	112
Dosage en masse de PtdIns5P dans les cellules DWT6.11+/-.....	115
Conclusion, perspectives :	117
Article 2 :.....	118
Le PtdIns5P, un acteur des voies de transduction activatrices durant la stimulation lymphocytaire T	118
Introduction	118
Discussion et résultats complémentaires	138
Localisation du PH de Dok-5	138
Phosphorylations dépendantes de l'augmentation du PtdIns5P dans le lymphocyte T	142
Conclusion, perspectives :	143
Travaux du laboratoire sur la Famille Dok	145
Article 3 :.....	146

Etude comparative et développementale de l'expression des gènes <i>dok</i> durant l'activation lymphocytaire T	146
Discussion générale et perspectives	150
Modèle d'activation des molécules Doks par le PtdIns5P	152
Nature des PTKs impliquées dans la phosphorylation des protéines Dok	153
Enzymes responsables de la production de PtdIns5P suite à l'engagement du TCR	154
Le PtdIns5P, un inducteur des voies de transduction cellulaire T	155
Localisation des phosphoinositides et recherche d'outils	158
Manipulation des taux de PIs dans la cellule à la recherche de la meilleure alternative	161
Conclusion générale	164
Annexes.....	166
Table des abréviations	168
Article 4: Dok-4 is a novel negative regulator of T cell activation.....	170
Bibliographie.....	172

Introduction Générale

Les phosphoinositides (PIs) sont connus pour avoir un rôle régulateur important dans la physiologie de la cellule. Leur tête polaire constituée d'un cycle inositol peut être phosphorylé de façon réversible et permet de générer sept espèces allant du phosphatidylinositol (PtdIns) aux phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃). Grâce aux interactions induites par cette partie hydrophile, les PIs membranaires jouent un rôle fondamental dans le contrôle de l'interface membrane - cytosol et par conséquent dans l'établissement du signal intracellulaire. Vers la fin des années 70, le phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) a fait l'objet de nombreuses études. Notamment en 1984, Berridge et al. démontrent que la stimulation par des facteurs de croissance sur des fibroblastes murins cause une baisse significative du PtdIns(4,5)P₂ due à son clivage par l'enzyme phospholipase C (PLC) (Berridge, 1986, 1987; Berridge et al., 1984). Cette dernière réaction engendre la production de deux seconds messagers centraux des voies de signalisations cellulaires à savoir : le composé soluble inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) conduisant à la libération d'ions calcium (Ca²⁺) à partir des compartiments intracytoplasmiques tels que le réticulum endoplasmique (RE), ainsi que le composé membranaire diacylglycerol (DAG) qui pourra activer en retour des protéines kinases C (PKC) et des activateurs des petites protéines GTPases, Ras (RasGRP). L'ensemble de ces deux événements aboutit à une réponse intracellulaire rapide et intense, associée à une entrée massive d'ions Ca²⁺ extracellulaires.

Ainsi les produits de clivage du PtdIns(4,5)P₂ sont les composants de deux voies de signalisations majeures des cellules eucaryotes. Le PtdIns(4,5)P₂ est alors à la base de l'un des paradigmes emblématique de la biologie cellulaire. Ce fut la première observation, certes indirecte, d'un phosphoinositide en tant que second messenger. Plus récemment, la découverte des PtdIns3P et PtdIns(3,4,5)P₃ produits de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Whitman et al., 1988) a caractérisé plus en avant l'importance autrefois présumée de la famille des phosphoinositides, étant notamment une voie majeure étudiée de nos jours en cancérogenèse (Vivanco and Sawyers, 2002). Il y a seulement une dizaine d'années, fut caractérisé un nouveau phosphoinositide, le phosphatidylinositol 5-phosphate (PtdIns5P) (Rameh et al., 1997b), ce dernier a fait l'objet d'étude de ma thèse. Deux études successives identifient l'enzyme bactérienne 4-phosphatase IpgD de *Shigella flexnerii* comme la première enzyme capable de génère exclusivement du PtdIns5P à partir du PtdIns(4,5)P₂ (Niebuhr et al., 2002; Pendaries et al., 2006). En 2003, le domaine PHD de la protéine ING2 (PHD : plant homeo domain) est identifié comme le premier ligand du PtdIns5P (Gozani et al., 2003). Ces outils ont été utilisés pour que l'augmentation intracellulaire de PtdIns5P dans les cellules épithéliales, favorise la phosphorylation d'AKT, une protéine Ser/Thr

kinase PI3K-dépendante (Pendaries et al., 2006). Cette dernière observation suggère largement pour la première fois une importance de ce PtdIns5P en tant que véritable second messenger des voies de signalisation dans les cellules eucaryotes (Coronas et al., 2007).

Notre laboratoire étudie depuis de nombreuses années les voies de signalisation induites lors de l'activation lymphocytaire T et notamment les signaux intracellulaires PI3K-dépendants (Fos et al., 2008; Pages et al., 1994; Yang et al., 2001). L'étude des signaux de transduction passe évidemment par l'analyse des molécules permettant la propagation de ces signaux, en l'occurrence des protéines contenant une activité catalytique ou servant d'adaptateurs entre deux molécules. Parmi ces molécules adaptatrices, le laboratoire a travaillé sur les molécules de la famille Dok (Downstream of Kinase) lors de l'activation lymphocytaire T (Favre et al., 2003; Gerard et al., 2004).

Ainsi le but de ma thèse a été dans un premier temps d'affiner l'étude des protéines adaptatrices Dok-1 et Dok-2 durant l'activation lymphocytaire T. Plus précisément, nous nous sommes focalisés sur le rôle de leur domaine pleckstrin homology (PH) dans leur fonction inhibitrice durant l'activation lymphocytaire T. De manière intéressante, nous avons pu caractériser le PtdIns5P comme un ligand potentiel des domaines PH de Dok-1 et Dok-2 engendrant leur phosphorylation et donc leur activation. Des dosages de PtdIns5P effectués après une stimulation du récepteur des cellules T (TCR) nous ont permis d'observer une augmentation de PtdIns5P suite à cette activation cellulaire. Ces données permettaient d'envisager un rôle en tant que second messenger du PtdIns5P dans les voies de signalisation lymphocytaire T.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à définir les caractéristiques d'interactions des domaines PH des autres membres de la famille Dok exprimés dans les lymphocytes T, Dok-4 et Dok-5. De manière intéressante, nous avons pu identifier le domaine PH de Dok-5 comme un interacteur sélectif du PtdIns5P. Par la suite, nous avons décidé de caractériser plus précisément l'impact du PtdIns5P sur les voies de signalisation du lymphocyte T en utilisant IpgD comme un outil pour augmenter les taux intracellulaires de PtdIns5P, ainsi que le domaine PH de Dok-5 comme sequestrateur de PtdIns5P. Cette étude nous a permis de mettre en évidence deux nouveaux « effecteurs » du PtdIns5P dans le lymphocyte T à savoir les Src kinases et comme observé dans les cellules épithéliales, nous avons pu identifier AKT phosphorylé suite à une augmentation de PtdIns5P. Ces données montrent que le PtdIns5P est un second messenger dans l'encodage du signal induit par le récepteur à l'antigène (TCR) du lymphocyte T. Ces travaux confirment que ce lipide peut réguler cette voie de signalisation PI3K/AKT qui peut être dérégulée lors de processus de cancérogenèse. L'étude de ce PtdIns5P mérite une attention toute particulière dans le domaine de la signalisation dans les cellules tumorales.

Partie I:

Activation lymphocytaire T

L'analyse de la modulation de la communication intracellulaire au sein des lymphocytes T représente un modèle extrêmement sensible pour évaluer l'impact des événements de signalisation sur les fonctions cellulaires. Le développement, la survie et la mort des lymphocytes T, ainsi que la différenciation en cellules effectrices ou mémoires en réponse à des antigènes, sont toujours le résultat d'une sélection d'événements contrôlés initialement par le récepteur à l'antigène (TCR) suite à la reconnaissance des complexes CMH/peptide. Le rôle central de cette interaction TCR-CMH/peptide reflète l'objectif fondamental du système immunitaire adaptatif à sélectionner le répertoire TCR le plus large possible, assurant ainsi des réponses spécifiques à pratiquement n'importe quel antigène et permettant l'élimination ou la neutralisation des cellules T auto-réactives. Les capacités modulables de reconnaissance des TCR en fonction de leur affinité pour les complexes CMH/peptide et de leur concentration, déterminent en grande partie les fonctions lymphocytaires T. Cette situation, inhabituelle chez les récepteurs biologiques, permet un ajustement précis des signaux intracellulaires induits par cette reconnaissance et au final d'orienter des choix cellulaires fondamentaux comme la survie, la différenciation cellulaire ou la mort cellulaire.

Le TCR appartient à la famille des immuno-récepteurs à chaînes multiples qui comprend également le récepteur des lymphocytes B (BCR) et les récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines (FcR) (Call and Wucherpfennig, 2007). Tous ces récepteurs partagent la propriété d'être constitués de plusieurs chaînes transmembranaires dotées de fonctions de reconnaissance des ligands et de signalisation spatialement dissociées. Cette famille de récepteurs est également caractérisée par l'absence d'activité enzymatique intrinsèque et donc par l'existence d'activités protéine tyrosine kinases associées (PTKs) appartenant aux familles Src, Syk, Tec et Csk (Call and Wucherpfennig, 2007). Une fois activées, ces PTKs ont la capacité d'initier un ensemble de programmes fonctionnels propres aux lymphocytes T.

Divers mécanismes vont réguler positivement ou négativement cette activation cellulaire induite par le TCR, un déséquilibre de ces modules de régulation peut affecter l'efficacité de la réponse immunitaire ou induire des phénomènes d'auto-immunité (Goodnow, 2007).

Cette initiation du signal intracellulaire est induit par un regroupement membranaire (clustering) des molécules de TCR qui s'accompagne d'un réarrangement caractéristique en surface de la cellule T pour former une structure circulaire concentrique au niveau de la zone de contact entre la cellule T et APC appelée synapse immunologique (SI)(Fig.1).

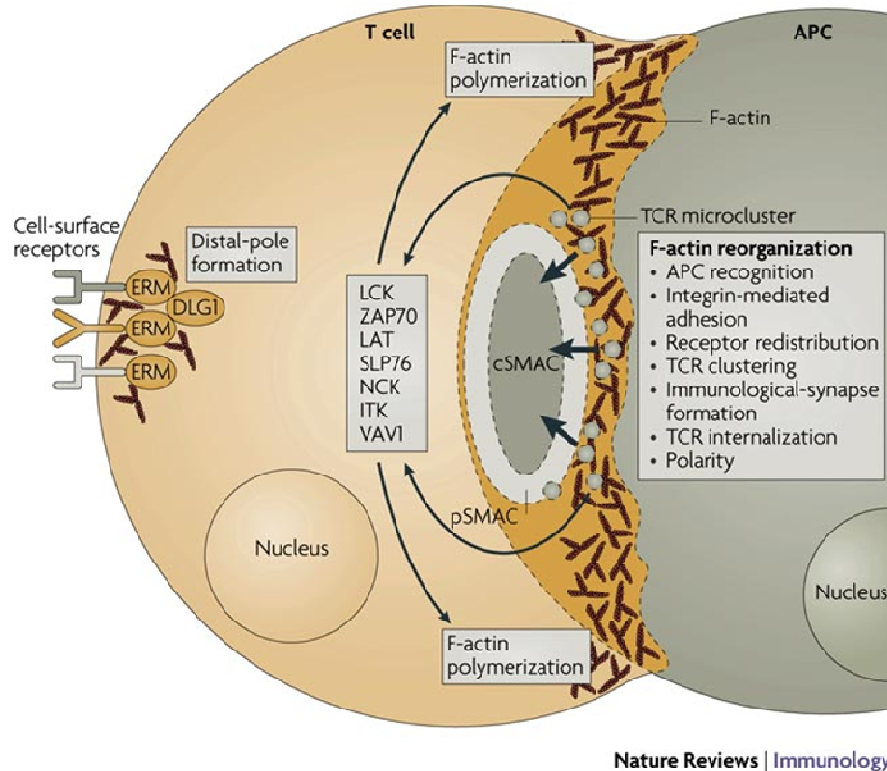


Fig.1. Représentation de la synapse immunologique.

Suite à la reconnaissance du peptide antigénique (présenté par la CPA) par les molécules de TCR, va s'en suivre un remaniement important au niveau du cytosquelette de la cellule T aboutissant à la formation de la synapse immunitaire. Les molécules de TCR s'accumulent (clustering) au niveau d'une zone centrale appelée cluster supramoléculaire central d'activation (cSMAC). Ce clustering du TCR engendre le recrutement de molécules essentielles de signalisation telles que LCK, ZAP-70 et LAT. Une zone périphérique correspond à l'assemblage de molécules associées à l'adhérence telles que les intégrines, LFA-1 ou les protéines intracellulaires, taline formant une zone circulaire concentrique entourant le cSMAC, appelée cluster supramoléculaire périphérique d'activation (pSMAC), qui aura pour but essentiel de stabiliser l'interaction entre la cellule T et la CPA.

Daniel D. Billadeau, Jeffrey C. Nolz and Timothy S. Gomez
(*Nature Reviews Immunology*, 2007)

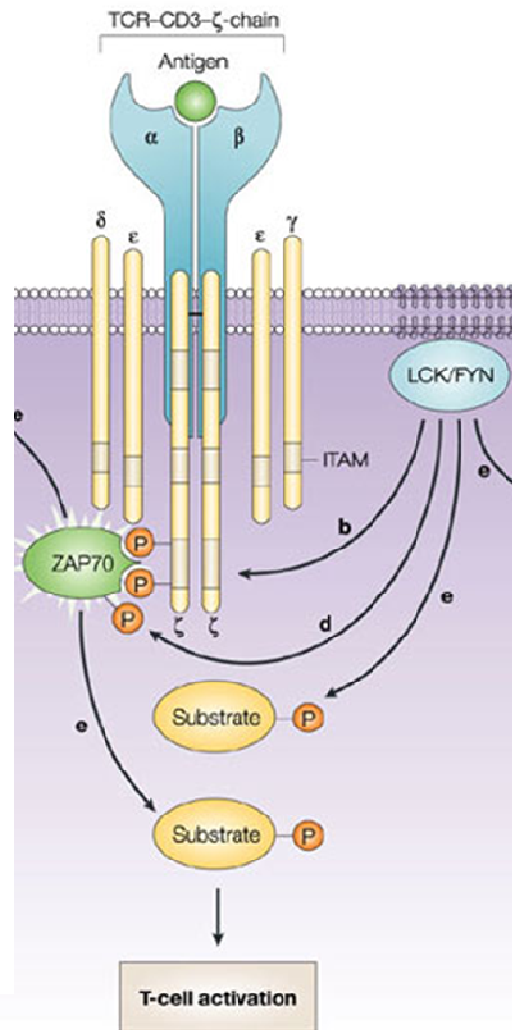
Le clustering du TCR a été tout d'abord décrit comme une redistribution globale du TCR au site de contact cellule T-APC (Kupfer et al., 1987). Cet enrichissement de TCR suite au premier contact avec l'APC ne va pas seulement coïncider avec la polarisation du cytosquelette (Geiger et al., 1982; Ryser et al., 1982), mais aussi avec une ségrégation spatiale et un regroupement d'autres récepteurs et de protéines intracellulaires, en domaines distincts au niveau de cette jonction cellule T-APC (Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998). La synapse immunologique fut ainsi caractérisée avec un domaine central enrichi en complexe TCR-pMHC et des molécules de signalisation telles que PKC et Lck, qui sont entourés par un anneau de molécules associées à l'adhérence incluant

notamment LFA-1 et Talin, ce dernier anneau stabilisant la synapse immunologique. Ces deux zones concentriques de la synapse furent baptisés cluster d'activation supramoléculaire central (riche en TCR) ou périphérique (riche en intégrines), respectivement cSMAC et pSMAC (Monks et al., 1998)(Fig.1).

Suite à de nombreuses études biochimiques, il était déjà connu que la liaison du TCR pendant la formation de la SI engendrait l'activation rapide de PTKs, mais aussi l'assemblage de complexes protéiques de signalisation (Mempel et al., 2004). C'est sur cette deuxième phase de signalisation que nous nous sommes plus précisément intéressés lors de mon travail de thèse. Il est reconnu que des mécanismes d'amplification du signal activateur induit par le TCR sont représentés par l'engagement des molécules de co-stimulation en particulier la molécule d'adhérence CD28. D'autres récepteurs de la famille CD28, CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) ou PD-1 (Programmed Death 1) sont quant à eux impliqués dans un signal de répression (Riley and June, 2005). Dans la suite de cette introduction sur l'activation lymphocytaire T, je focaliserai volontairement mon attention sur la signalisation induite par le TCR, que j'ai tout particulièrement utilisée lors de mon travail expérimental.

La signalisation du TCR

L'engagement du TCR avec le complexe pMHC va être à l'origine de l'initiation de l'activation lymphocytaire T. La partie du TCR qui reconnaît une large variété d'antigène est formé d'un hétérodimère hautement polymorphique de chaînes α et β . Certaines sous-populations de cellules T expriment à leur surface un TCR constitué d'un dimère composé de chaînes γ et δ . Ce dimère polymorphique est étroitement associé à un cluster membranaire de protéines de transduction du signal, non polymorphique appelé le complexe CD3 (Davis et al., 1998). Le complexe CD3 est composé de polypeptides γ, δ, ϵ et ζ . Toutes ces chaînes CD3 contiennent un motif de transduction du signal appelé ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (Irving et al., 1993; Reth, 1989). Les chaînes γ, δ , et ϵ contiennent un seul ITAM, tandis que la chaîne ζ en contient trois. Ainsi, un seul TCR est « équipé » de 10 motifs ITAM (Fig.2). Ce large nombre de motifs est essentiel pour finement réguler la force du signal généré par le récepteur même dans le cas où seulement un petit nombre d'antigènes sont présentés par les CMH de l'APC (Lanzavecchia et al., 1999).



Nature Reviews |

Fig.2. Structure du TCR. Le TCR est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques appartenant à la superfamille des immunoglobulines.

La reconnaissance d'un complexe CMH/peptide particulier requiert la contribution des chaînes α et β . La région cytoplasmique du TCR étant trop courte pour permettre la transduction de signaux intrinsèques, d'autres molécules s'associent physiquement au TCR et sont requises pour assurer les fonctions de transduction de signaux. Le complexe CD3 est composé de polypeptides δ, ϵ et ζ . Toutes ces chaînes CD3 contiennent un motif de transduction du signal appelé ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Les chaînes γ, δ , et ϵ contiennent un seul ITAM, tandis que la chaîne ζ en contient trois. La reconnaissance du peptide antigénique, va provoquer la phosphorylation des motifs ITAM par les protéines Src kinases, permettant l'initiation de l'activation du lymphocyte T.

Václav Horejsi, Weiguo Zhang and Burkhard Schraven (Nature Reviews Immunology, 2004)

Signaux activateurs

Initiation de la réponse T : la phosphorylation des motifs ITAM

La transduction du signal par le TCR est initiée par la phosphorylation des résidus tyrosines (Y) présent dans les motifs ITAM, phosphorylation assurée dans un premier temps par la protéine tyrosine kinase (PTK) Lck appartenant à la famille des Src-kinases. Cette phosphorylation des motifs ITAM va ainsi générer différents sites de liaison pour des protéines contenant des domaines SH2, comme la PTK ZAP-70 qui se lie au CD3 ζ (Dustin and Chan, 2000; Germain, 2001). Le recrutement des Zap-70 par les phospho-Y ITAM va permettre sa phosphorylation par Lck et donc son activation (Fig.2)(Chan et al., 1992). Les molécules ZAP-70 ainsi actives vont propager la transmission du signal en phosphorylant la protéine adaptatrice LAT (Linker for activation of T-Cell) (Zhang et al., 1998). LAT est phosphorylée sur de multiples résidus tyrosine (Tyr ou Y), qui à son tour pourra accueillir de nouvelles protéines adaptatrices à domaine SH2 telles que SLP-76, Grb2 et Gads, mais aussi permettrait le recrutement d'enzymes tels que la PI3K et la PLC γ (Fig.3)(Zhang et al., 1999).

L'importance des Src-kinases dans l'activation du TCR

Structure de la famille des Src-kinases

Il existe deux types de Src-kinases prédominantes au niveau des lymphocytes T, Lck et Fyn, qui ont respectivement des tailles de 56kDa et 59kDa. Elles sont constitutivement localisées au niveau de la membrane dû au fait de la présence en partie amino -terminale de la molécule de sites de myristoylation/palmitoylation (Kabouridis et al., 1997). Il existe également en partie amino-terminale, un domaine « unique » particulier à chacune des protéines Src kinases, Lck contient un motif di-cystéine qui est requis pour son association avec les corécepteurs du TCR, les molécules CD4 et CD8 (Kim et al., 2003a; Turner et al., 1990). Le rôle du domaine unique de Fyn n'a quant à lui pas encore été élucidé, mais il serait également requis pour la localisation subcellulaire de la molécule (zur Hausen et al., 1997). Ces PTKs possèdent un domaine SH3 (Src Homology 3) et un domaine SH2 qui vont permettent d'induire des interactions protéines-protéines intra et intermoléculaires, via la reconnaissance des motifs polyproline (SH3) ou phosphotyrosine (SH2).

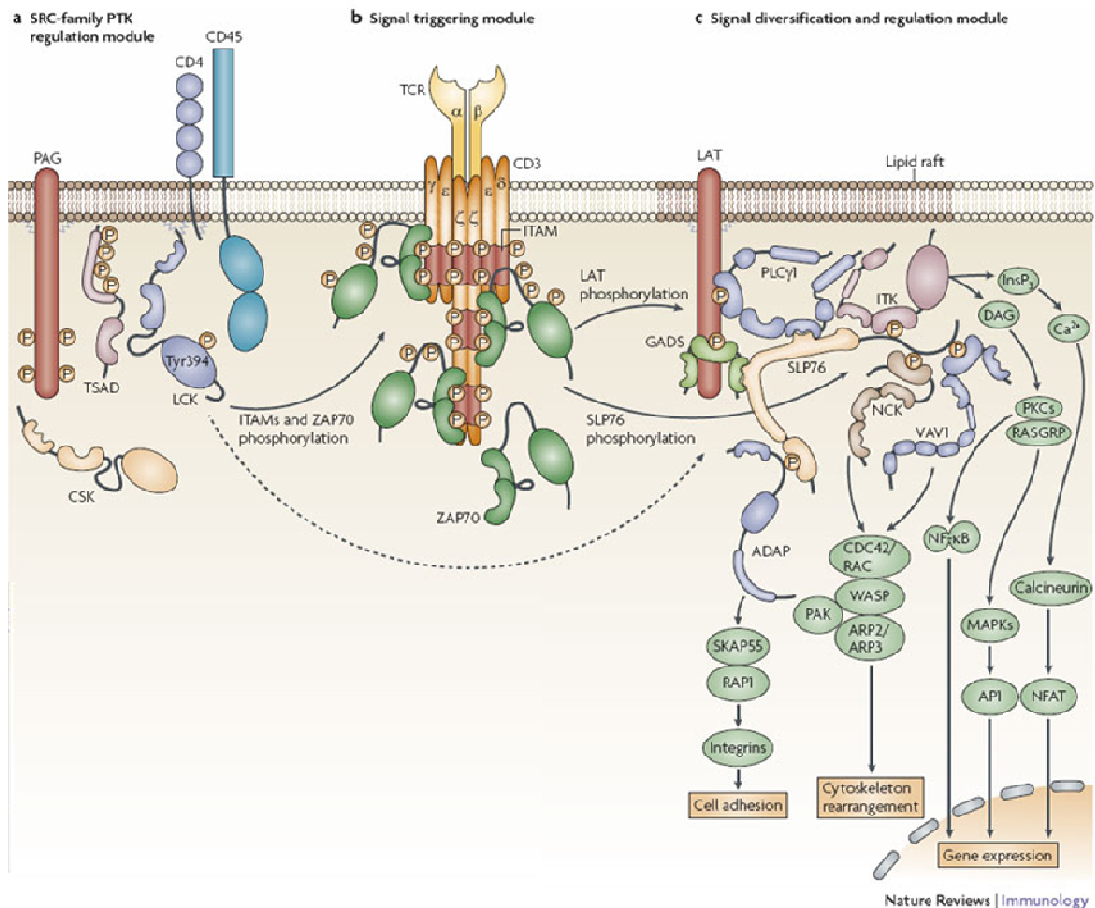


Fig 3. Signalisation sous le TCR activé.

Suite à l'engagement du TCR, les protéines tyrosines kinases (PTK) de la famille Src (Lck et Fyn) sont activées. Les chaînes CD3 ζ sont phosphorylées et les PTKs de la famille SYK (ZAP-70) sont recrutées puis activées. L'activation de ZAP-70 entraîne la phosphorylation de LAT qui recrutera par la suite de nombreuses protéines à domaines SH2 (Grb2, GADS, PLC- γ). L'association entre LAT et GADS va permettre le recrutement de SLP-76. L'activation de la PLC- γ entraîne l'hydrolyse du PtdIns(4,5)P₂ en inositol tri-phosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG), ceux-ci vont permettre respectivement le relargage intracellulaire de Ca²⁺ et l'activation en cascade des PKC ainsi que des protéines RasGRP. Le recrutement de Grb2 par LAT va permettre le recrutement de Sos (GEF), constituant un possible mécanisme pour l'activation de Ras. Le complexe LAT-GADS-SLP-76 va s'associer avec les protéines Vav1 et Nck, qui pourra s'associer à son tour avec PAK1 et également engendrer l'activation des protéines GTPases de la famille Rho, l'ensemble de ce complexe aboutissant au réarrangement du cytosquelette d'actine suite à la stimulation du TCR.

**Oreste Acuto, Vincenzo Di Bartolo & Frédérique Michel
(Nature Reviews Immunology, 2008)**

La présence de ces domaines d'interactions suggère un rôle de protéines adaptatrices pour Lck et Fyn, en plus de leur activité tyrosine kinase, cette dernière résultant de la présence d'un domaine kinase ou domaine SH1 en position carboxy-terminale (Denny et al., 1999; Holdorf et al., 1999; Rudd et al., 2006; Straus et al., 1996; Xu and Littman, 1993).

Enfin, ces PTKs contiennent à leur extrémité carboxy -terminale un résidu tyrosine critique ayant un rôle dans la régulation de leur activité (Y 505 pour Lck et Y 528 pour Fyn). Il existe également

un autre résidu tyrosine critique dans le domaine kinase de Lck et Fyn, qui aura pour rôle de faciliter l'activité enzymatique (Y 394 pour Lck et Y 417 pour Fyn) (Sicheri and Kuriyan, 1997; Xu and Littman, 1995).

Régulation des Src kinases

Il est largement établi que la conformation structurale des Src kinases est essentielle à leur activité. En effet, lorsque les cristaux des structures inactives de Hck et Src ainsi que de la structure active de Lck furent obtenus, un mécanisme commun d'activation à toutes les Src kinases fut proposé (Sicheri and Kuriyan, 1997; Xu and Littman, 1995). Ces structures indiquent que lorsque la tyrosine C-terminale (Y505 pour Lck ou Y 528 pour Fyn) est phosphorylée, Lck adopte une conformation « fermée » où le résidu Y505 phosphorylé crée un site intramoléculaire d'accrochage pour le motif SH2, la Src kinase ainsi refermée inactive totalement l'activité du domaine kinase (Fig.4).

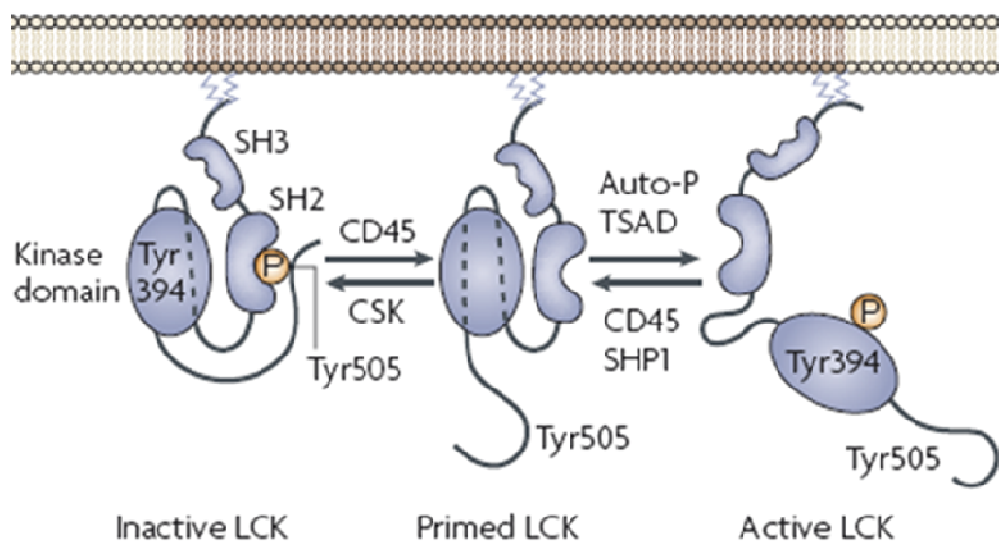


Fig.4. Modèle de régulation des Src kinases.

Lck est membranaire via son site de miryostoylation. Une partie de Lck se retrouve associé au corécepteur CD4 ou CD8. Son activité va être dépendante de la phosphorylation de deux tyrosines, en position 505 et 394 (ou 416 pour Fyn). Au repos, Lck se retrouve en conformation fermée « inactive » le résidu Y505 en partie Carboxy-terminale est phosphorylé et va permettre une fixation intramoléculaire avec le domaine SH2. La phosphorylation de cette tyrosine est notamment assurée par la kinase Csk, qui est recruté via son domaine SH2 par la protéine transmembranaire PAG constitutivement phosphorylée au repos. L'engagement du TCR aboutit vraisemblablement à la déphosphorylation de PAG ce qui provoquerait le décrochage de Csk. L'activation de Lck est initiée par la déphosphorylation du résidu C-ter Y505 par la protéine tyrosine phosphatase CD45. Cette déphosphorylation permet une ouverture de la kinase Lck, qui va être capable de se transphosphoryler sur le résidu maintenant accessible Y394 et aboutir à une action optimale de Lck.

Oreste Acuto, Vincenzo Di Bartolo & Frédérique Michel
(Nature Reviews Immunology, 2008)

Il est à préciser que dans cette conformation le domaine SH3 va également former des interactions intramoléculaires avec le domaine se trouvant entre le domaine SH2 et SH1 ou encore appelé « linker », cette interaction stabilisant plus fortement encore cette conformation fermée (Sicheri and Kuriyan, 1997; Xu and Littman, 1995).

Au contraire, la phosphorylation du résidu tyrosine du domaine kinase (Y 394 pour Lck et Y 417 pour Fyn) sera le témoin de l'activation de la protéine. En effet, la déphosphorylation du résidu tyrosine carboxy-terminal et la perte des interactions intramoléculaires des domaines SH2 et SH3 permet l'ouverture de la molécule dans une conformation dite « active ». le domaine kinase est n'est ainsi « plus masqué », la tyrosine de ce site est ainsi accessible pour être phosphorylée et va permettre une activation optimale de la molécule.

Ainsi, on peut schématiquement distinguer deux types de conformations la conformation inactive ou « fermée » dont la phosphorylation de la tyrosine C-terminale est le témoin, mais également une conformation active ou « ouverte » dont la phosphorylation de la tyrosine du domaine kinase est le témoin. En conséquence, l'état de phosphorylation de l'une ou l'autre de ces tyrosines va être déterminant pour la régulation spécifique des Src kinases (Fig.4).

Rôle des Src kinases dans l'activation lymphocytaire T

La phosphorylation Src-dépendante des motifs ITAM présents sur les chaînes CD3 va initier la signalisation via le TCR. Les PTKs, Lck et Fyn doivent être recrutées au niveau des récepteurs stimulés, mais aussi activées. Lck est enrichie au niveau de structures membranaires particulières, les GEMs (glycolipid enriched membrane microdomains) ou radeaux lipidiques ce qui permet sa régulation (Harder and Engelhardt, 2004).

L'interaction de Lck avec les corécepteurs membranaires CD4 et CD8 est essentielle (Turner et al., 1990). En effet, le TCR va « scanner » les peptides antigéniques chargés sur molécules de MHC à la surface des APCs. Les molécules CD4 ou CD8 en cas de reconnaissance du peptide vont pouvoir se lier à la partie non-variable des molécules de CMH, cela va permettre d'une part de stabiliser la liaison TCR / CMH-peptide, mais permet d'autre part de concentrer Lck au niveau des motifs ITAM des chaînes CD3 du complexe TCR. Il semblerait à ce niveau que les molécules Lck trans-phosphorylent leur boucle d'activation (Y394) permettant leur activation.

Le recrutement de Fyn au niveau du TCR stimulé, reste sujet à controverse, en effet, Fyn ne disposant pas dans son domaine unique du motif di-cystéine nécessaire à l'accrochage aux corécepteurs CD4 et CD8, même s'il a été suggéré qu'une protéine adaptatrice Unc 119 pouvait relier Fyn et Lck au récepteur CD4 (Gorska et al., 2004). Il semblerait également que Lck soit bien

plus actif que Fyn, en effet la fusion des domaines N-terminal SH2 et SH3 de Lck au domaine kinase de Fyn, ne pouvait pas totalement compenser l'absence du domaine kinase de Lck, ceci dans le contexte du développement thymocytaire (Lin et al., 2000).

L'ensemble de ces observations attestant pour un rôle essentiel voire incontournable des Src kinases dans l'initiation de la réponse du TCR activé. De plus diverses observations font état d'un plus fort impact de la molécule Lck versus Fyn. Ceci est en accord avec le résultat du phénotype des souris invalidées pour les gènes Lck ou Fyn (Molina et al., 1992; Stein et al., 1992). Ainsi Lck sera à l'origine de la phosphorylation des motifs ITAM, qui permettra le recrutement de la PTK ZAP-70 via ses domaines SH2 et son activation via sa phosphorylation Lck dépendante. Par la suite comme indiqué plus haut, ZAP-70 va phosphoryler la molécule adaptatrice transmembranaire LAT et permettre le recrutement de l'adaptateur cytosolique, SLP-76 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa).

Le signalosome LAT-SLP-76, complexe adaptateur de l'initiation du signal TCR

SLP-76 est une protéine adaptatrice qui se lie à LAT via l'intervention de la protéine Gads (Grb2-related adapter protein 2 ou GRAP2) (Koretzky et al., 2006). Il s'avère que ces deux protéines adaptatrices, LAT et SLP-76 ont un rôle majeur dans le développement et l'activation des lymphocytes T, en effet la thymogenèse est totalement bloquée chez des souris agéniques pour *lat* ou *slp-76* (Clements et al., 1998; Zhang et al., 1998). SLP-76, en complexe avec LAT, est ensuite phosphorylée par ZAP-70, et le complexe LAT-SLP-76 agit comme une plateforme de recrutement pour d'autres protéines effectrices du signal. L'un des recrutements les plus importants est celui de la phospholipase C- γ 1 (PLC γ 1), qui interagit directement avec LAT et SLP-76. La PLC γ 1 transmet le signal du TCR en hydrolysant les PtdIns(4,5)P₂ en DAG, un lipide associé à la membrane, et en InsP₃ un second messager soluble. Les InsP₃ sont à l'origine de l'augmentation de calcium intracellulaire (Lewis, 2001), tandis que le DAG pourra recruter nombre de protéines au niveau de la membrane plasmique, telles que la PKC- θ (Rhee and Bae, 1997). Ces deux voies de signalisation aboutissent à l'activation de différents facteurs de transcription : NF- κ B, NF-AT et AP-1 via en partie par l'activation de Ser/Thr kinases telles que les Jun kinases (JNK) (Dreikhausen et al., 2003; Su et al., 1994; Werlen et al., 1998). Le DAG peut également recruter RasGRP (RAS guanyl nucleotide-releasing protein), qui est une GEF (Guanine nucleotide exchange factor). RasGRP active la petite protéine G Ras, un activateur crucial de la voie des MAPK (mitogen activated protein kinase) ERK-1/2, cette voie de signalisation représente un axe majeur de signalisation décrit chez de nombreux organismes (Fig.3).

Ras peut également être activé par le facteur d'échange SOS (Son of sevenless), qui est recruté au niveau de LAT par l'intermédiaire de Grb2. Le complexe Grb2/SOS permet l'activation de la molécule Ras, Grb2 permettant la localisation du complexe à la membrane, et Sos, facteur d'échange GDP-GTP, favorisant la forme active de Ras, Ras-GTP (Chardin et al., 1993). Ras permet le recrutement et ainsi l'induction des phosphorylations séquentielles des MAPKs (de Vries-Smits et al., 1992), aboutissant à l'activation de AP-1 dans les lymphocytes T (Faris et al., 1996; Li et al., 1999). Néanmoins, ce complexe n'est pas suffisant à lui seul pour expliquer l'activation des MAPKs, puisque le recrutement de Grb2/SOS et celui de la PLC γ 1 par LAT sont tous deux nécessaires pour induire une activation de ERK-1/2 (Zhang et al., 2000)(Fig.3).

SLP-76 phosphorylée se lie également directement à la PTK, Itk (Interleukin-2-inducible T-cell kinase) appartenant à la famille des Tec kinases. De même que Zap-70 et Lck, Itk a un rôle essentiel dans la phosphorylation et l'activation de la PLC γ 1. De plus, SLP-76 recrute le facteur d'échange Vav qui activera en retour les petites protéines G Rac et Cdc42. La protéine adaptatrice Nck est également recrutée dans ce complexe ainsi que ADAP (adhesion and degranulation-promoting adaptor protein). Ce dernier complexe permettant la réorganisation du cytosquelette lors d'une activation lymphocytaire T, en activant notamment PAK (Bubeck Wardenburg et al., 1998).

Le complexe LAT-SLP-76 est un signalosome hautement coopératif (Koretzky et al., 2006). En effet, plusieurs de ses constituants interagissant avec divers partenaires et la perte d'une seule de ces protéines modifie la signalisation des autres effecteurs. Ce comportement coopératif est probablement important pour la coordination et le traitement efficace des différentes voies de signalisation sous le TCR (Fig.3).

PI3K, un acteur méconnu de la signalisation du TCR

La voie PI3K lors de l'activation du TCR

Les PI3K forment une vaste famille d'enzymes phosphorylant des phospholipides membranaires, les phosphoinositides (PI), sur la position 3 du groupement inositol (Vanhaesebroeck et al., 2005). Elles sont réparties en trois classes majeures sur la base de leur structure et de la spécificité de leurs substrats, et sont généralement constituées d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. Les PI3K impliquées dans l'activation lymphocytaire sont les PI3K de classe I. Elles utilisent comme substrats le PtdIns4P (phosphatidylinositol 4-phosphate), le PtdIns(4, 5)P₂ ou le PtdIns5P et sont subdivisées en deux sous-groupes : I_A, principalement activées en aval de

récepteurs couplés à des tyrosines kinases tels que les récepteurs B et T à l'antigène, les récepteurs aux cytokines et certaines molécules de costimulation ; I_B, activées en aval de récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG) tels que les récepteurs aux chimiokines (Koyasu, 2003). Les PI3K de classe I_A sont des enzymes hétérodimériques constituées d'une sous-unité régulatrice (p85 α , la plus abondante, et ses deux variants d'épissage p55 α et p50 α , p85 β ou p55 γ) et d'une sous-unité catalytique (p110 δ essentiellement leucocytaire, p110 α ou p110 β , ubiquitaires). Elles sont activées grâce au recrutement des domaines SH2 de la sous-unité régulatrice sur des motifs consensus YxxM phosphorylés lors de l'engagement d'un récepteur couplé à des tyrosines kinases. La sous-unité p110, ainsi adressée à la membrane, catalyse la synthèse de PtdIns(3,4)P₂ et de PtdIns(3,4,5)P₃, deux 3'-phosphoinositides (3'-PI) quasiment indétectables dans la membrane plasmique à l'état basal et qui recrutent sélectivement des protéines à domaine PH (Pleckstrin Homology).

La PI3K de classe I_A est recrutée au niveau de la signalisation du TCR par un mécanisme qui porte encore à controverse (Deane and Fruman, 2004; Koyasu, 2003; Okkenhaug et al., 2007; Okkenhaug and Vanhaesebroeck, 2003). Son activation est d'ailleurs rapidement détectable suite à une activation T. Une apparition de PtdIns(3,4,5)P₃ est également détectable suite à la stimulation du TCR (Ward et al., 1992). De plus, les sous-unités régulatrices p85 α sont recrutées dès la formation de la SI lors de la présentation antigénique (Costello et al., 2002; Harriague and Bismuth, 2002). Ceci suggère que l'association entre le complexe de signalisation sous le TCR et la PI3K semble étroitement liée au statut actif initial des PTKs sous le TCR (Costello et al., 2002; Fabre et al., 2005; Harriague and Bismuth, 2002; Huppa et al., 2003; Kane et al., 2004).

Au niveau de la synapse immunologique, il y a des controverses au sujet de quelle isoforme va être responsable de la production de PtdIns(3,4,5)P₃. Une étude a comparé des cellules T p110 δ ^{D910A} (kinase dead) et des cellules T p110 γ ^{-/-}. Ces cellules exprimaient de plus une protéine de fusion GFP associée au domaine PH d'AKT (liant le PtdIns(3,4,5)P₃), il a été observé un rôle prédominant de la p110 δ comparée à la p110 γ dans le contact cellule T primaire-APC (Garcon et al., 2008). Le traitement de cellules T WT avec un inhibiteur sélectif de la p110 δ réduit également le taux de PtdIns(3,4,5)P₃ à un niveau basal dans un contexte de stimulation par l'antigène. Cependant, il est largement suggéré que la p110 γ est activée sous le TCR de cellules T primaires. En effet, des cellules T primaires p110 γ ^{-/-} présentent une réduction de l'activation de Rac et de polymérisation de l'actine, mais également une diminution de la formation de conjugués cellule T-APC chargées avec un peptide spécifique du TCR (Alcazar et al., 2007). Un autre groupe a également rapporté une prolifération réduite de lymphocyte T stimulés par leur TCR dans des cellules déficientes en p110 γ

(Sasaki et al., 2000), pourtant une autre étude n'a trouvé aucun effet de l'inhibiteur sélectif p110 γ (Ji et al., 2007). En résumé, un rôle de la p110 γ ne peut pas être exclu au niveau de la génération du PtdIns(3,4,5)P₃ dans le lymphocyte T, même s'il est communément admis que ce rôle revient à la p110 δ . Il serait ainsi important de continuer de comparer le rôle de ces deux isoformes dans le lymphocyte T, par exemple dans le contexte d'interaction avec des APCs et dans diverses conditions expérimentales.

Hypothèses sur le recrutement de la PI3K au niveau du TCR

Diverses protéines à proximité immédiate de la signalisation du TCR ont été proposées comme impliquées dans le recrutement de la PI3K. Ceux-ci incluent les composants du récepteur lui-même, tel que le CD3 ζ (Exley et al., 1994) et les chaînes CD3 γ, δ, ϵ (de Aos et al., 1997; Osman et al., 1996), la protéine adaptatrice LAT (Fukazawa et al., 1995), la petite protéine G Rac (Genot et al., 2000) et des molécules interagissant avec le TCR directement comme TRIM (Bruyns et al., 1998) et SHC (Gu et al., 2000). Il a été également montré que la kinase Lck pouvait recruter la PI3K au niveau du corécepteur du TCR CD4, ceci par l'intermédiaire du domaine SH3 de Lck se liant aux motifs proline riches de la sous-unité p85 de la PI3K (Prasad et al., 1993b) (Fig.5).

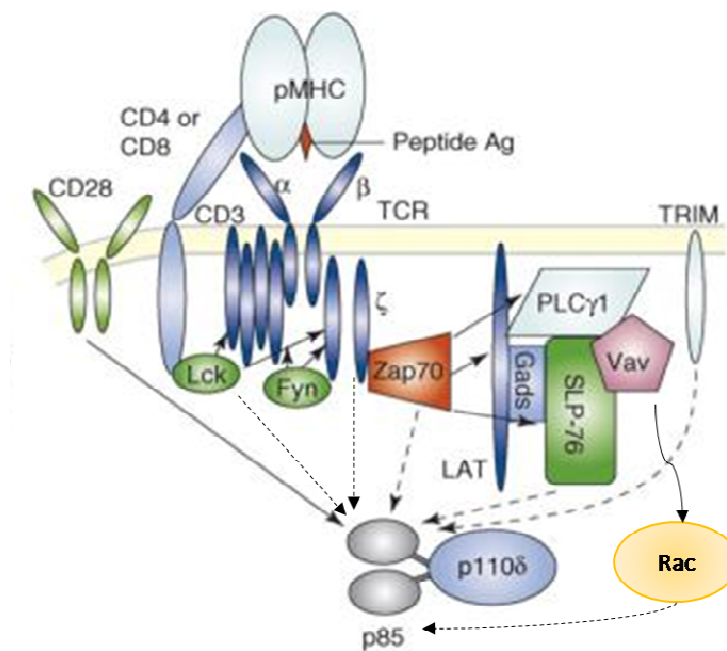


Fig.5. Hypothèses de recrutement de la PI3K suite à l'engagement du TCR.
Les flèches pleines représentent les interactions avérées. Tandis que les flèches en pointillés font état de la plupart des recrutements suggérés.

Oktenberg K, Ali K, Vanhacchiroeck B.
(Trends Immunol., 2007)

La chaîne ζ du CD3 ne semble cependant pas un des sites majeurs pour le recrutement direct de p85 ne possédant pas les motifs YxxM nécessaires. L'adaptateur transmembranaire LAT a également été suggéré pour le recrutement de la PI3K, bien qu'ici aussi il semble que ce soit de manière indirecte, car LAT ne contient pas de motifs YxxM. Il a été suggéré un recrutement indirect par la liaison à SHC et Grb2 au niveau du TCR (Gu et al., 2000), controversé par d'autres travaux (Osman et al., 1995). La relevance de l'activation de la PI3K par Rac reste également sujet à controverse, car l'expression ectopique de Rac activé ne reproduit pas les effets de la PI3K activée dans les cellules T (Reif et al., 1997). TRIM (TCR-interacting molecule) est une protéine transmembranaire, qui a une partie extracellulaire très courte comme LAT, et qui semble donc ne pouvoir accueillir aucun ligand. Cependant, TRIM contient dans sa partie cytoplasmique un domaine YxxM qui pourrait être phosphorylé suite à une stimulation du TCR (Bruyns et al., 1998). De plus, l'activité de la kinase Lck semble être importante pour l'activation de la PI3K en aval du TCR, probablement car cette activité est essentielle pour une majorité d'évènements induits après engagement du TCR, Lck se trouvant en amont de cette cascade d'activation (Carrera et al., 1994).

Mais aussi, on ne peut exclure la possibilité d'un recrutement de la PI3K via les motifs poly-prolines présents sur p85 par des protéines à domaines SH3, comme cela a été suggéré pour Lck et Fyn (Pleiman et al., 1994; Prasad et al., 1993a). Vav a également été récemment proposé pour la régulation de la PI3K au niveau des thymocytes, comme observé dans les cellules B, plaçant Vav en amont plutôt qu'en aval de la PI3K (Han et al., 1998). Des études plus récentes ont suggéré que p85 peut se lier aux PTKs Syk et ZAP-70, de manière directe sans nécessité de la présence du domaine YxxM (Moon et al., 2005). Il existe également des éléments suggérant un possible accrochage de p85 aux domaines SH2 de SLP-76, toujours sans utiliser ces domaines YxxM (Shim et al., 2004) (Fig.5).

Ainsi, il reste encore à déterminer si l'activité de la PI3K observée lors de la stimulation du TCR est due à la mise en place d'un ensemble de mécanismes redondant ou si cette activation est une procédure orchestrée précisément avec l'aide de un ou plusieurs composants essentiels situés en amont de la PI3K. Il reste néanmoins clair que la PI3K semble pouvoir jouer un rôle fonctionnel prépondérant suite à l'activation du TCR, en particulier grâce à l'utilisation de modèles murins invalidés pour le gène *p110delta* (Okkenhaug et al., 2002).

Effecteurs de la PI3K

L'activation de la PI3K lors de la stimulation du TCR permet la production de PtdIns(3,4,5)P₃. La production de ce second messager largement caractérisé permet le recrutement de protéines à domaines Pleckstrin Homology (PH). Parmi les protéines recrutées, sont retrouvées les Ser/Thr kinases PDK-1 et AKT (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000) (Fig.5). Ces enzymes vont ainsi phosphoryler une large gamme de protéines qui réguleront le métabolisme cellulaire, la prolifération cellulaire, la mitose ou l'apoptose. La production de PtdIns(3,4,5)P₃ engendre également le recrutement au niveau de la membrane plasmique de la Tec kinase I κ B via son domaine PH. Cette Tec kinase est exprimée de manière sélective dans les cellules T et se trouve impliquée dans la régulation calcique PI3K dépendante, via sa capacité à phosphoryler la PLC γ (Miller and Berg, 2002). La PI3K peut également réguler des réarrangements au niveau du cytosquelette en activant des GEFs possédant des domaines PH se liant aux PtdIns(3,4,5)P₃. On pourra ainsi observer des effets sur les petites protéines G Rho, Rac et Cdc42 (Gupta et al., 2003). De plus, il a également été montré le recrutement de protéines adaptatrices via leur domaine PH telles que Gab (qui peut également interagir avec la sous unité p85 de la PI3K) permettant notamment de réguler de manière positive la voie Erk/MAPK. Ce recrutement par le domaine PH pourrait avoir également des effets inhibiteurs notamment sur le facteur de transcription NFAT et la production d'IL-2 sous une stimulation TCR/CD28 (Parry et al., 2006; Pratt et al., 2000; Yamasaki et al., 2003; Zhang et al., 2002b). Le recrutement des protéines SKAP, contenant un domaine PH central, serait également dépendant de l'activité de la PI3K, permettant de relier la PI3K à l'activation des intégrines et les phénomènes d'adhésion dans le lymphocyte T (Wang et al., 2007; Wang et al., 2003a). Enfin, il en est de même pour le recrutement des protéines adaptatrices Bam32/DAPP1 agissant notamment sur la prolifération cellulaire suite à l'activation du TCR et l'activation de la voie Erk/MAPK (Sommers et al., 2008).

Un tel mécanisme, par la diversité des voies de signalisation qu'il engage, joue un rôle fondamental dans l'activation T et dans l'élaboration des réponses immunes (Fig.5). De nombreuses études génétiques ont en effet révélé l'importance des PI3K dans le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire. Une étude introduisant une mutation dans le gène de la p110 δ et provoquant une perte de sa fonction catalytique a mis en évidence des défauts des réponses B et T à l'antigène *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'une réduction de la population de cellules T mémoire en périphérie, témoignant du rôle joué par la PI3K dans la survie et/ou la différenciation des cellules T effectrices (Okkenhaug et al., 2002). Enfin, l'inactivation conditionnelle dans les lymphocytes T de PTEN,

l'une des principales phosphatases hydrolysant les 3'-PI, induit un syndrome lymphoprolifératif létal, des anomalies de la sélection thymique et un accroissement de la résistance des cellules T périphériques aux stimuli apoptotiques (Suzuki et al., 2001).

Ces données corroborent d'autres études utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K et démontrant que les effets positifs de certaines cytokines comme l'IL-7, l'IL-2 ou l'IL-12 sur la survie et la prolifération des cellules T sont dépendants de la voie PI3K (Okkenhaug et al., 2002; Sade and Sarin, 2003; Stahl et al., 2002; Yoo et al., 2002). Enfin, il a été rapporté que l'inhibition de la PI3K, bien que n'empêchant pas la synapse immunologique de se mettre en place et n'inhibant pas certains événements liés à l'activation, comme l'augmentation des tyrosines phosphorylées, l'expression de CD25 ou la production d'IL-2, bloque la transformation blastique des cellules T induite par l'antigène (Costello et al., 2002; Harriague and Bismuth, 2002).

Enfin, l'un des rôles important de la PI3K dans les cellules T est la régulation du métabolisme cellulaire et de la synthèse protéique (Jones and Thompson, 2007). Cependant, la PI3K peut également réguler la « dynamique » de l'actine, il a notamment été montré l'importance de la PI3K dans la régulation de la migration leucocytaire ainsi que le chimiotactisme (Asperti-Boursin et al., 2007; Matheu et al., 2007; Reif et al., 2004; Ward, 2006). Récemment, une étude sur le lymphocyte T a souligné l'importance du produit de la PI3K, le PtdIns(3,4,5)P₃ et de mTOR dans la régulation négative de l'expression des molécules pro-migratoires CD62L et CCR7 suite à un engagement du TCR (Sinclair et al., 2008). Cette régulation est possible via l'activation de voies protéolytiques de ces deux molécules PI3K dépendantes. L'intérêt de cette régulation transcriptionnelle négative est d'éviter la recirculation de ces lymphocytes T ayant déjà subi une activation qui resteront ainsi en périphérie et ne seront plus adressés au niveau des organes lymphoïdes secondaires {Sinclair, 2008

Ainsi, malgré les controverses au niveau de son action sous le TCR, il semble clair que l'activation de la PI3K via le TCR peut potentiellement réguler un nombre important de voies de signalisations et de fonctions différentes. Cependant, il est bien établi que lors de l'engagement de molécules de costimulation telles que CD28 ou ICOS, la PI3K pourra être recrutée par les motifs YxxM ainsi phosphorylés {Fos, 2008 #153;Pages, 1994 #148;Coyle, 2000 #705} (Fig.5). C'est d'ailleurs dans ce sens que la PI3K est largement étudiée, il reste néanmoins un « vide scientifique » ou en tout état de cause une incertitude quant au recrutement et au rôle précis de la PI3K lors d'une activation du TCR.

Signaux inhibiteurs

Comme décrit précédemment, la signalisation du TCR activé est un phénomène qui met en jeu plusieurs types de voies effectrices de signalisation. L'activation de ces voies doit être nécessairement régulée pour assurer que une réponse de la cellule T à son ligand appropriée et ceci de la manière optimale (Acuto et al., 2008). Comme pour la régulation positive, les signaux inhibiteurs seront générés soit sous le TCR lui-même ou soit cette régulation émanera d'autres récepteurs de surface. Parmi ces régulations, on peut classer en :

- régulations proximales, plus précisément ciblées sur les PTKs de la famille Src. Mais aussi via le recrutement des protéines adaptatrices Dok-1 et Dok-2, véritable plateforme pour protéines à activités inhibitrices.

- régulations plus tardives, dues à la mise en jeu de récepteurs inhibiteurs, permettant principalement le recrutement de protéines phosphatases. Mais aussi il existe d'autres mécanismes kinases ou ubiquitines ligases qui développeront également des boucles de régulation négatives.

Régulations Proximales

Régulateurs négatifs des Srcs kinases

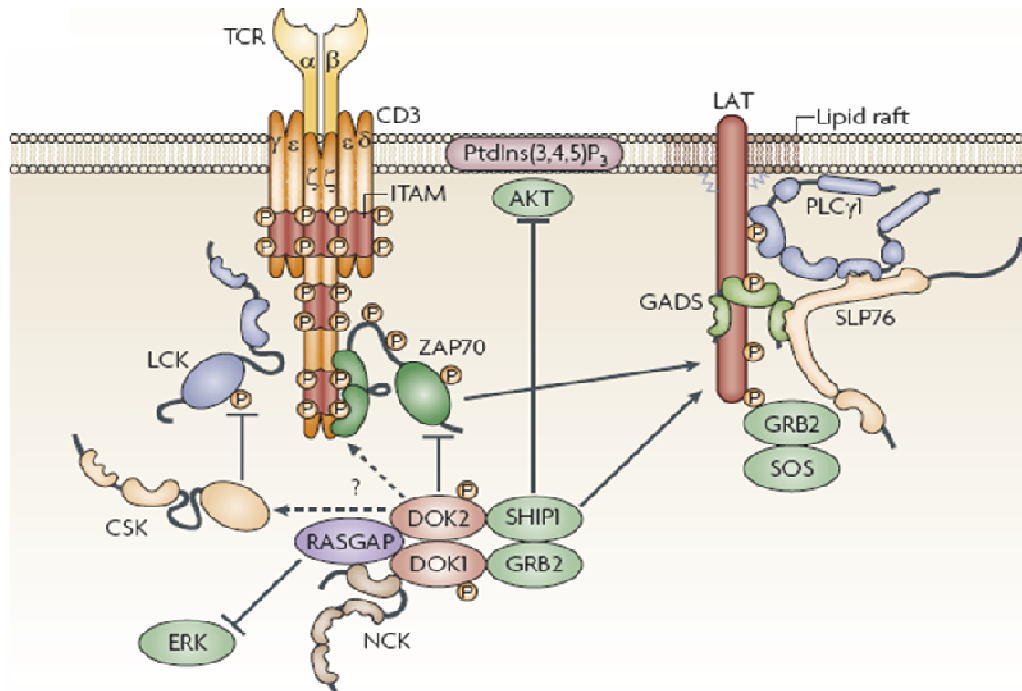
L'élément de signalisation le plus proximal à savoir l'activation des Src kinases, s'avère être activement régulé. Par exemple, de nombreuses protéines, vont contribuer à l'activité de Lck. La kinase Csk (C-terminal Src kinase) est responsable de la phosphorylation de Lck sur sa tyrosine C-terminale inhibitrice (Y 505), la maintenant ainsi dans un état inactif (Hermiston et al., 2003; Vang et al., 2004). Csk est recrutée au niveau de la membrane plasmique de manière phosphotyrosine dépendante via son domaine SH2. En effet, la phosphorylation de la molécule PAG (phosphoprotein associated with glycosphingolipidenriched microdomains) dont la phosphorylation est Src dépendante va permettre ce recrutement. C'est ainsi une boucle de rétrocontrôle qui se met en place avec l'activation de Src, la phosphorylation de PAG qui permet ainsi le recrutement de Csk et donc l'inactivation des Srcs kinases (Solheim et al., 2008a; Solheim et al., 2008b).

La protéine phosphatase transmembranaire CD45 peut également déphosphoryler le site inhibiteur, mais de manière intéressante, peut également réguler la kinase de manière négative en déphosphorylant, la tyrosine activatrice dans le domaine kinase (Y394) (Hermiston et al., 2003)

(Fig.4). Pour expliquer la distinction entre les ligands spécifiques et non spécifiques par le TCR, il a été proposé qu'une liaison peu affine du TCR pour un peptide, engendrait la mise en jeu rapide de la phosphatase SHP1 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase) (Stefanova et al., 2003). SHP-1 va ainsi déphosphoryler le site actif de Lck ce qui entrainera la fin de la signalisation. L'importance de SHP-1 dans ce type de fonction est renforcé par le fait que des souris invalidées génétiquement (Knock-out ou KO) pour SHP-1 développent un syndrome d'autoimmunité sévère (Tsui et al., 1993) (Fig.4)

Les protéines adaptatrices Dok-1 et Dok-2

Les protéines Dok-1 et Dok-2 (pour Downstream of kinases) sont des molécules largement décrites dans les diverses voies de signalisation cellulaire comme substrats de protéines tyrosine kinases (PTKs) (Mashima et al., 2009). Elles appartiennent à la super famille des molécules adaptatrices ou protéines d'ancrage (dockers proteins) comprenant également les familles IRS, SNT/FRS et Gab. Cette classification est due en grande partie à la similarité de séquence de leur domaine PTB (phosphotyrosine binding domain). Les membres de la famille semblent agir comme des inhibiteurs des grandes voies de signalisation (PTKs, Ras, PLC/Ca²⁺) (Acuto et al., 2008). Cette famille a fait l'objet de ma thèse, ainsi leurs structures et leurs fonctions seront présentées dans les paragraphes suivants. Brièvement Dok-1 et Dok-2 vont être au centre d'un complexe multimoléculaire à vocation inhibitrice, recrutant notamment RasGAP, Csk et SHIP-1 au niveau du TCR activé (Fig.6).



Nature Reviews | Immunology

Fig.6. Régulation négative induite par les protéines Dok-1 et Dok-2 sous le TCR.

La stimulation du TCR va engendrer la phosphorylation sur résidus tyrosine de Dok-1 et Dok-2 et la formation d'un complexe multimoléculaire qui va interagir avec LAT. Une fois recrutés à proximité du TCR, Dok-1 et/ou Dok-2 pourraient entrer en compétition via leur domaine PTB avec ZAP-70 pour la liaison aux motifs ITAMs phosphorylés ou pourraient recruter des partenaires provoquant la régulation négative de ZAP-70. Dok-1 et Dok-2 pourraient vraisemblablement permettre le recrutement de CSK ce qui inhiberait les Src kinases. La fonction inhibitrice de Dok-1 et Dok-2 sous le TCR semble renforcer par sa liaison avec des partenaires tels que SHIP-1 ou RasGAP. SHIP-1 de même que Dok-1 et Dok-2, va engendrer des effets inhibiteurs sur AKT en réduisant les taux de PtdIns(3,4,5)P₃

Oreste Acuto, Vincenzo Di Bartolo & Frédérique Michel
(Nature Reviews Immunology, 2008)

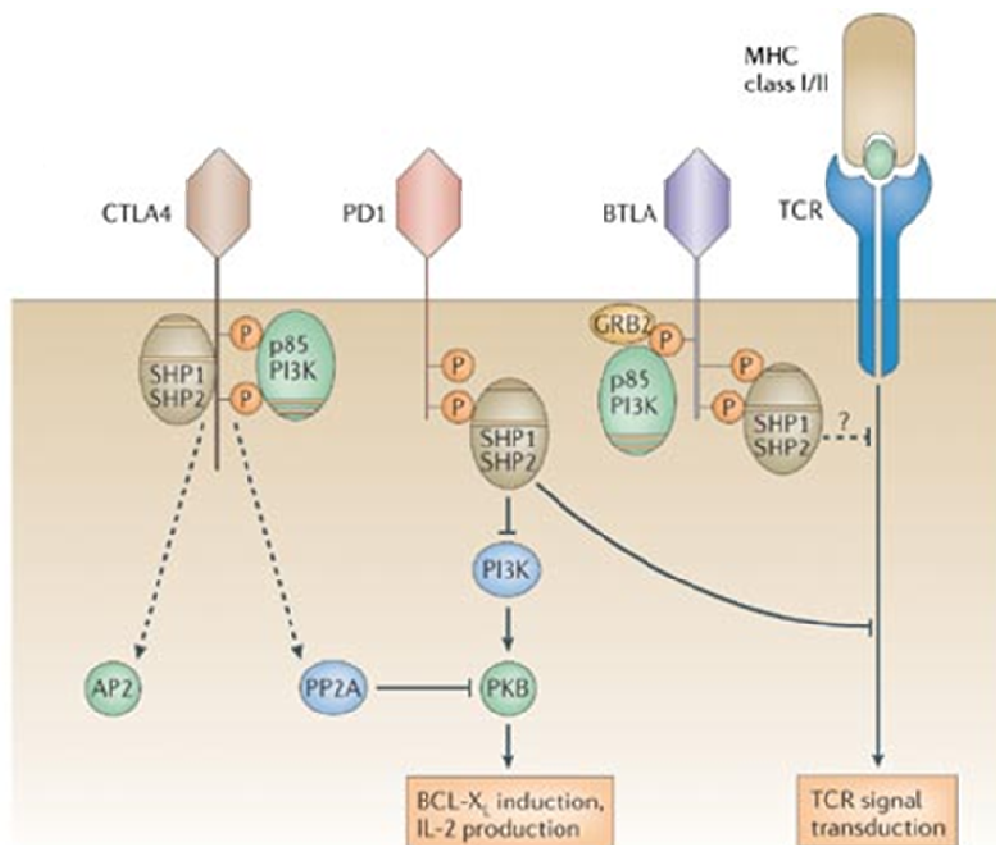
Régulations Tardives

Récepteurs inhibiteurs et recrutement de phosphatases

De la même manière qu'il y a une nécessité d'une costimulation pour l'activation optimale d'un lymphocyte T, il existe des corécepteurs de costimulation à vocation inhibitrices. CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4) et PD-1 (programmed death-1) sont deux exemples de ce type de corécepteurs inhibiteurs, qui vont limiter la prolifération et l'activation des cellules T stimulées par le TCR. Les fondements moléculaires de la co-inhibition dépendent de plusieurs mécanismes, notamment du recrutement des tyrosines phosphatases telles que SHP-1 et SHP-2, par l'utilisation de motifs phosphotyrosine (de types YKVM pour CTLA-4 et ITIM [immunoreceptor tyrosine-

based inhibition motif] pour PD-1) (Chemnitz et al., 2004; Teft et al., 2006) (Fig.7). Ces molécules sont retrouvées sur les cellules T activées avec un pic d'expression à 24h-48h après stimulation.

Leur rôle dans le contrôle de la tolérance immunitaire a été démontré par l'utilisation de souris invalidées génétiquement. Les souris *ctla4^{-/-}* développent ainsi une lymphoprolifération massive



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Fig.7. Récepteurs inhibiteurs de l'activation lymphocytaire T.

La prolifération du lymphocyte T est inhibée par les récepteurs CTLA-4, PD-1 et BTLA. L'activation du lymphocyte T va induire l'expression à la surface cellulaire de PD-1 et la phosphorylation des autres récepteurs inhibiteurs. La phosphorylation de CTLA-4 va permettre la libération de la phosphatase PP2A au niveau cytosolique permettant notamment l'inhibition d'AKT (PKB). Les 3 récepteurs activés vont pouvoir recruter les phosphatases SHP1 et SHP2, bien qu'une association directe n'ait été montrée que pour BTLA et PD-1. Ces phosphatases ont été impliquées dans la régulation négative de la signalisation du TCR et permettrait également l'inhibition de la voie PI3K/AKT. BTLA pourrait également recruter les protéines adaptatrices Grb2 et la sous-unité p85 de la PI3K dans certaines conditions.

Murphy KM, Nelson CA, Sedó JR.
(Nat Rev Immunol., 2006)

conduisant à la mort (Waterhouse et al., 1995), tandis que les souris *pdl^{-/-}* développent des maladies auto-immunes dont le type et la sévérité dépendent du fond génétique (Nishimura et al., 1999).

Ces deux molécules sont des cibles thérapeutiques particulièrement importantes. Chez des patients atteints de cancers, l'injection d'anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 est associée à une augmentation de la réponse aux vaccinations thérapeutiques et un accroissement de l'élimination tumorale ; toutefois, ces patients sont également exposés à la survenue d'événements auto-immuns, spécifiques d'organe ou systémiques (Phan et al., 2003).

La voie HPK-1SLP-76-14-3-3

HPK-1 (Haematopoietic progenitor kinase 1 aussi appelé MAP4K1) est une sérine/thréonine kinase exprimée essentiellement dans les cellules hématopoïétiques (Kiefer et al., 1996). La stimulation du TCR induit la phosphorylation de HPK-1 par Lck et/ou Zap-70 (Ling et al., 2001), s'en suit l'accrochage de HPK-1 à SLP-76 (Sauer et al., 2001) ou d'autres protéines adaptatrices (Boomer and Tan, 2005). Des données récentes ont montré qu'il existe une boucle de régulation négative du signalosome SLP-76 initié par HPK-1. En effet, l'inactivation génique de HPK-1 résulte en une plus forte activation du gène *IL2* suite à une stimulation du TCR (Di Bartolo et al., 2007), de plus, les souris déficientes en HPK-1 montrent une prolifération plus importante de leurs cellules T stimulées via le TCR de même qu'une production plus intense de cytokines comparé aux souris contrôles (Shui et al., 2007). Enfin, la délétion de l'expression d'HPK-1 dans les cellules T stimulées par leur TCR résulte en une baisse significative de la tyrosine phosphorylation de diverses protéines essentielles de la signalisation T telles que SLP-76, PLC γ -1, LAT et ZAP-70 (Di Bartolo et al., 2007; Shui et al., 2007).

Le mécanisme d'action de HPK-1 n'est pas encore totalement compris, cependant on sait que HPK-1 va phosphoryler SLP-76 et permettre son association avec la protéine 14-3-3 (Di Bartolo et al., 2007), qui est exprimée de manière ubiquitaire et se lie à plusieurs cibles régulant des processus cellulaires (Mackintosh, 2004). Cependant la boucle de régulation négative HPK1-SLP76-14-3-3, semble fonctionner à des temps relativement tardifs (10-15 minutes suite à la stimulation du TCR), en comparaison, les premières phosphorylations induites suite à l'engagement du TCR apparaissent dans des temps inférieurs à la minute (Di Bartolo et al., 2007).

L'ubiquitylation dans la régulation négative du signal TCR

Ces phénomènes d'ubiquitylation interviennent entre autres dans la régulation des réponses immunitaires, en particulier sur les mécanismes de tolérance (Liu et al., 2005). Par exemple, les ubiquitines ligases de la famille Cbl (Casitas b-lineage lymphoma) vont réguler la réponse du TCR via la dégradation de plusieurs protéines essentielles telles que CD3 ζ , ZAP-70, PLC γ -1, PI3K and PKC θ (Loeser and Penninger, 2007). Le recrutement des protéines de la famille Cbl, notamment l'ubiquitine ligase E3, vont réguler de manière négative la réponse du TCR par un mécanisme impliquant les protéines sTs1 (suppressor of T-cell signalling 1) et sTs2 (Carpino et al., 2004). sTs1 et sTs2 ont une faible activité PTP (Mikhailik et al., 2007), et il est vraisemblable qu'elles exercent leur activité en régulant les voies de dégradation des composants du signalosome SLP-76 (Feshchenko et al., 2004; Raguz et al., 2007). Enfin, de manière intéressante les souris doublement invalidées pour *sts1* et *sts2* montrent une prolifération plus importante des lymphocytes T suite à une stimulation du TCR, de même qu'une activité plus intense dans la transcription de gènes des cytokines par rapport à des lymphocytes T d'une souris contrôle (Carpino et al., 2004).

Conclusion I

La signalisation du TCR reste un mécanisme extraordinairement complexe qui doit s'adapter à des situations différentes suivant le type de sous-population lymphocytaire T rencontrée (T « naïves », effecteurs/mémoires, régulateurs, Th17...). Ainsi, au niveau des signaux activateurs, la signalisation des PTKs de la famille Src sous le TCR a été particulièrement abordée, car ces molécules restent la clé de voûte essentielle de la bonne mise en route du système, sorte d'interrupteur de l'activité du TCR. De plus, il me semblait essentiel de replacer la PI3K dans ce système, et de montrer que bien que cette activité ait été détectée lors de l'engagement du TCR lors de travaux publiés en 2002 (Ward et al., 1992), le mécanisme qui permet de relier le TCR avec cette activité enzymatique reste méconnu. De plus, par l'impact significatif du PtdIns5P sur l'activité de la PI3K dans des systèmes cellulaires épithéliaux (Pendaries et al., 2006), il était important de présenter cette PI3K dans le contexte de l'activation lymphocytaire T.

Cette énumération de mécanismes d'inhibition est loin d'être exhaustive. Ici, j'ai tenté de résumer diverses facettes de cette régulation, l'une très précoce et déclenchée dès la stimulation du TCR, en même temps que les signaux activateurs, tels que les voies inhibitrices des Src kinases et

les activités associées aux protéines adaptatrices Dok-1 et Dok-2. D'autre part, un signal plus tardif, avec les mécanismes des récepteurs inhibiteurs, d'ubiquitinylation et le rôle de certaines enzymes comme HPK-1 qui vont agir plus tardivement pour contrôler la réponse. Ainsi, on peut parler de frein à deux niveaux :

- l'un pour éviter que le « système s'emballé », c'est une régulation très fine de l'activation sorte de tuteur de celle-ci. Selon l'affinité relative du TCR pour le peptide, il va y avoir le développement d'une réponse appropriée.

- Le second frein sera un signal d'extinction de cette réponse et un retour à l'état basal du système.

Partie II :

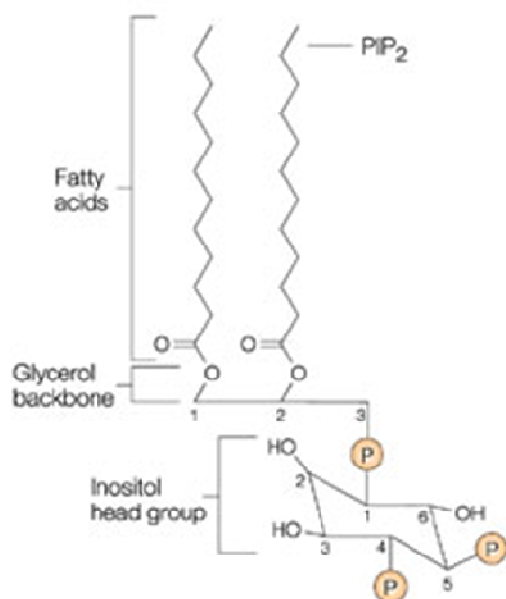
Les phosphoinositides

La famille des phosphoinositides

Les phospholipides sont des éléments de structures essentiels de toutes les membranes plasmiques eucaryotes, qui vont être constamment soumis à des changements métaboliques en fonction des besoins de la cellule pour le maintien de son intégrité structurale. Chaque compartiment membranaire possède une composition unique et caractéristique en phospholipides. Cette compartimentalisation peut s'expliquer du fait de la distribution des enzymes métabolisant ces lipides. En plus de ce rôle structural essentiel, les cellules utilisent des lipides comme molécules de signalisation. Les phosphoinositides sont un très bon exemple pour illustrer comment un phospholipide peut être un élément de structure de la membrane, mais également comme précurseur de multiples molécules de signalisation touchant une large gamme de fonctions cellulaires. Les dix dernières années ont apporté un changement radical et une nouvelle attention sur la famille des phosphoinositides. En effet, un large nombre de processus de signalisation dépendants des phosphoinositides membranaires ont été décrits : par exemple, le contrôle des transporteurs (Hilgemann, 2004) et canaux ioniques (Horowitz et al., 2005), la régulation du cytosquelette d'actine (Takenawa and Itoh, 2001; Yin and Janmey, 2003), la régulation de diverses GEF ou GAP garantes de l'activité de nombreuses petites protéines G (Klarlund et al., 1997; Venkateswarlu et al., 1998), mais aussi des mécanismes tels que l'endocytose (Cremona et al., 1999; Ford et al., 2001) et l'exocytose (Eberhard et al., 1990; Hay et al., 1995). Ainsi, il est de plus en plus établi que les phosphoinositides sont des régulateurs essentiels des membranes cellulaires.

Les phosphoinositides sont des glycérophospholipides anioniques, constitués d'une tête polaire formée par un cycle *myo*-inositol, une partie apolaire formée de deux chaînes d'acides gras le tout relié par un squelette de glycérol. Leur partie apolaire va permettre leur insertion au niveau des membranes plasmiques. Tandis que la tête cytoplasmique sera phosphorylée séquentiellement ou non, sur trois positions du cycle *myo*-inositol D3, D4 et D5, permettant ainsi la constitution de huit types de phosphoinositides (Fig.8).

- Le PtdIns ou phosphatidyl inositol est le précurseur non-phosphorylé.
- Les mono-phosphatidylinositol : PtdIns3P, PtdIns4P et PtdIns5P.
- les phosphatidylinositol bis-phosphates : PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂ et PtdIns(4,5)P₂.
- Le phosphatidylinositol –tris-phosphate ou PtdIns(3,4,5)P₃



Phosphoinositides	% des phospholipides tot.	% des phosphoinositides tot.
PtdIns	10%	90%
PtdIns3P	-	0,2%
PtdIns4P	1%	5%
PtdIns5P	-	0,2%
PtdIns(4,5)P ₂	1%	5%
PtdIns(3,4)P ₂	-	0,01%
PtdIns(3,5)P ₂	-	0,01%
PtdIns(3,4,5)P ₃	-	-

Fig.8. Structure des phosphoinositides et estimation de leur taux dans les érythrocytes de mammifères au repos.

(mesure des phosphoinositides réalisées, d'après Stephens, L., McGregor, A. & Hawkins, P. in *Biology of Phosphoinositides*, Oxford Univ. Press, Oxford, UK, 2000)

**Tableau adapté de Lemmon MA
(Nature Reviews Molecular Cell Biology volume, 2008)**

Le PtdIns est le plus abondant des phosphoinositides et représente environ 10% des phospholipides totaux de la cellule au repos et 90% des phosphoinositides totaux. Le PtdIns4P et le PtdIns(4,5)P₂ représentent un peu moins de 1% des phospholipides totaux soit environ 5% des phosphoinositides totaux. Les autres phosphoinositides ne représentent quant à eux moins de 1% des phosphoinositides totaux (d'après Stephens, L., McGregor, A. & Hawkins, P. in *Biology of Phosphoinositides*, Oxford Univ. Press, Oxford, UK, 2000) (Lemmon, 2008)(Fig.8). Cependant, suite à diverses stimulations, leur taux peut radicalement changer, notamment pour les moins abondants, ainsi le taux de PtdIns5P par exemple peut varier d'un facteur 20 durant le cycle cellulaire (Morris et al., 2000), ainsi que le PtdIns(3,5)P₂ qui peut augmenter d'un facteur 30 suite à une réponse à un stress hyperosmotique dans les levures, et dans une moindre proportion dans les cellules animales (x 2 à 6) (Michell et al., 2006). Ceci nous permet ainsi de bien nous rendre compte de la dynamique de ces molécules dont les taux intracellulaires peuvent varier très rapidement.

Ces lipides sont retrouvés principalement sur les versants cytoplasmiques des membranes cellulaires et semblent être distribués selon des compartiments subcellulaires bien précis (Fig.9). Il est à signaler également la présence de phosphoinositides au niveau du noyau (Barlow et al., 2009;

Divecha et al., 1991; Payraastre et al., 1992). Les phosphoinositides vont jouer le rôle de second messenger, permettant le recrutement de protéines possédant un domaine de liaison spécifique, au lieu « exact » de leur fonctionnement. Ces domaines pourront d'ailleurs servir de sondes pour la détection précise de ces phosphoinositides au niveau des membranes cellulaires (Fig.9).

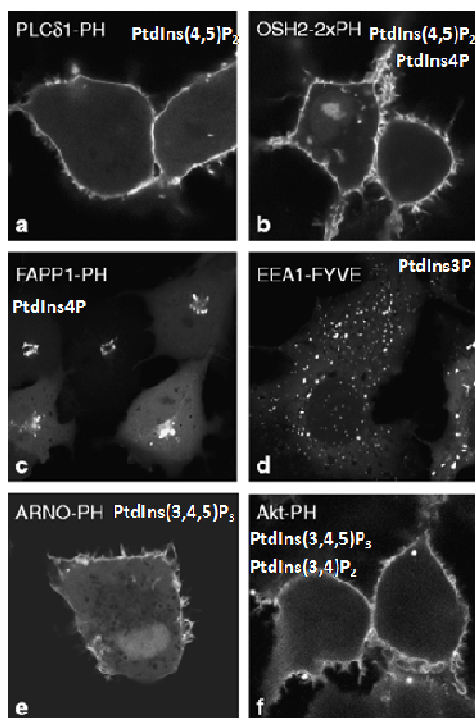
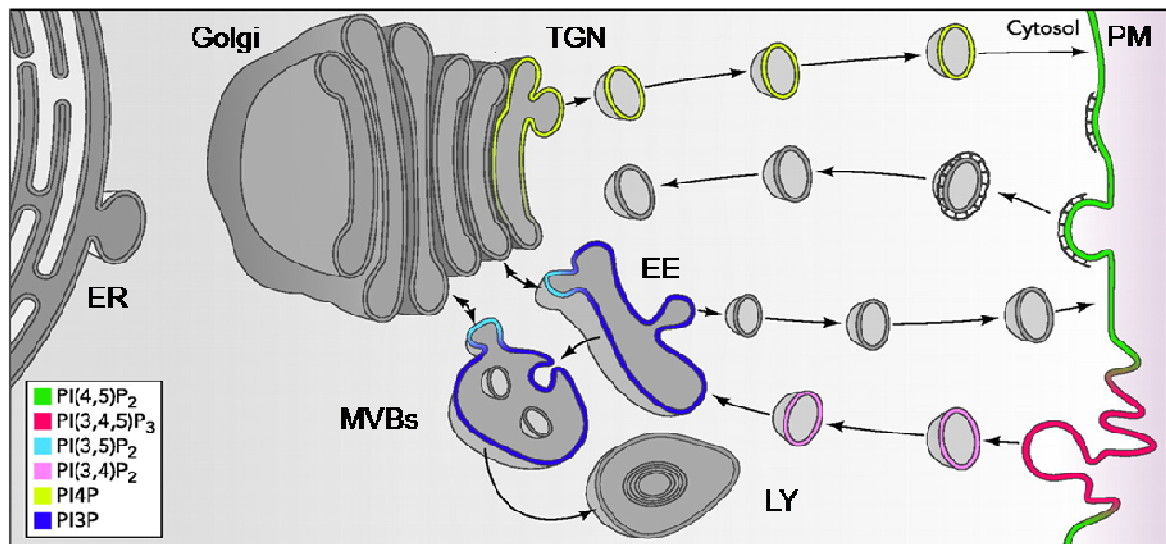


Fig.9. Localisation des phosphoinositides.

Figure du haut. Représentation schématique de la localisation des membres de la famille des phosphoinositides. PM: membrane plasmique, EE: endosomes précoces, LY: lysosomes, MVB: corps multivésiculaires.

Figure de gauche, transfection d'une sonde utilisant un domaine protéique se liant spécifiquement à un PI donné, couplé au GFP en cellules Cos-7. PLC: phospholipase C, OSII2-2X PH: tandem de domaines PH provenant de l'homologue chez la levure de la protéine OSBP (oxysterol-binding protein), FAPP1: the four-phosphate-adaptor protein 1, EEA1-FYVE: domaine FYVE de la protéine EEA1 (Early Endosome Antigen.1), ARNO: Arf nucleotide binding site opener (facteur d'échange de Arf-6).

Heather J. McCrea and Pietro De Camilli
(Physiology, 2009)

Varnai P. & Balla T.
(Pflugers Arch., 2007)

Métabolisme des phosphoinositides et dysfonctionnement

Les taux intracellulaires en phosphoinositides sont finement régulés de manière temporelle et spatiale, par l'action de nombreuses lipide kinases et phosphatases. Celles-ci vont ajouter, ou cliver un groupement phosphate au niveau d'une position précise du cycle inositol, à la manière des phospholipases. La localisation différentielle de chacun de ces enzymes au niveau des membranes va permettre la maintenance et la distribution hétérogènes des phosphoinositides. Le site de synthèse des PtdIns est le réticulum endoplasmique, le PtdIns sera ensuite « exporté » au niveau des autres compartiments membranaires, soit via le trafic membranaire, soit par le biais de protéines spécialisées dans le transfert de phospholipides, telles que les protéines PITPs (Phosphatidylinositol transfer proteins) (Cockcroft, 2007). Un dysfonctionnement dans le métabolisme des phosphoinositides est à l'origine ou potentialise de nombreuses pathologies (McCrea and De Camilli, 2009; Pendaries et al., 2003) (Fig.10 & 11).

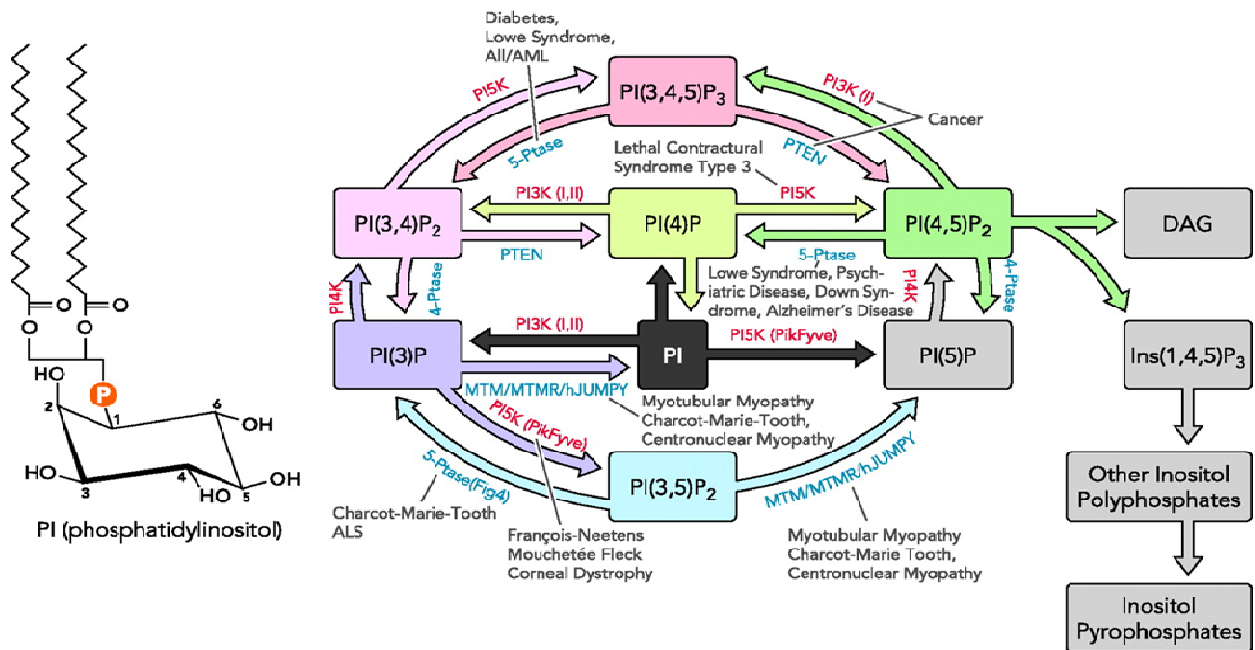


Fig.10. Métabolisme des phosphoinositides et pathologies associées à des dysfonctionnements enzymatiques.

Heather J. McCrea and Pietro De Camilli (Physiology, 2009)

Les lipides Kinases

Phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K)

Classification

De manière schématique, on peut résumer ce métabolisme de phosphatidylinositol en plusieurs étapes, tout d'abord l'apport de PtdIns au niveau de l'appareil de Golgi là où se trouvent les PI4Ks (phosphatidylinositol 4-kinase). Toutes les PI4Ks vont phosphoryler en position D4 du cycle inositol des phosphoinositides pour produire le PtdIns4P. Cette réaction est essentielle, car le PtdIns4P pourra être le précurseur de PtdIns(4,5)P₂ impliqué notamment dans la voie classique du DAG et de l'IP₃. Quatre types de PI4K différentes ont été identifiées, basé sur leur structure et leur sensibilité à divers inhibiteurs. Il y a les isozymes de type II α et β et les isozymes de types III α et β (Balla and Balla, 2006). Chaque isozyme va être exprimé dans un tissu particulier et se localiser au niveau d'un compartiment particulier, ceci suggérant que le PtdIns4P est requis pour diverses fonctions cellulaires comme notamment le transport vésiculaire depuis le Golgi en recrutant des protéines de « coating » et leurs facteurs accessoires (Behnia and Munro, 2005; De Matteis et al., 2005; Wang et al., 2003b).

Il n'existe pas de pathologies associées à la mutation de l'une de ces enzymes, en revanche il semblerait que la PI4K III α puisse jouer un rôle dans l'induction de la réplication virale notamment du virus de l'hépatite C (HCV) (Berger et al., 2009; Trotard et al., 2009; Vaillancourt et al., 2009).

La PI4KII β dans le lymphocyte T

Diverses études suggèrent, une activation de la PI4KII β au niveau des membranes plasmiques suite à une activation du TCR par un anticorps CD3. Cette enzyme serait impliquée dans le signal de transduction TCR (Fernandis and Subrahmanyam, 1998; Inokuchi and Imboden, 1990). Il a d'ailleurs été montré de manière étonnante une association de cette PI4KII β avec les chaînes ζ du CD3 suite à une stimulation TCR (Srivastava et al., 2006). Cette enzyme serait impliquée dans la signalisation TCR, car elle favoriserait le maintien d'un pool de PtdIns(4,5)P₂ au niveau du TCR nécessaire à l'induction du signal via la PLC γ ou PI3K (Fernandis and Subrahmanyam, 1998; Inokuchi and Imboden, 1990). De plus, il a été suggéré que cette enzyme pourrait interagir avec des molécules exprimées dans les lymphocytes T telles que le corécepteur

CD4 ou la PTK Lck (Fernandis and Subrahmanyam, 2000; Pertile and Cantley, 1995). Des pics transitoires d'élévation de PtdIns4P (d'un facteur trois) sont détectés très rapidement entre 2 à 3min après stimulation (Srivastava et al., 2006). Ceci suggère d'une part, le recrutement possible d'une lipide kinase-phosphatase au niveau du TCR, mais d'autre part, laisse à penser que le PtdIns4P pourrait être un intermédiaire pour générer du PtdIns(4,5)P₂.

Phosphatidylinositol phosphate kinases (PIPKs)

Classification

Au niveau de la membrane plasmique ce PtdIns4P sera le précurseur majeur des PtdIns(4,5)P₂ localisé essentiellement au niveau membranaire. Cette localisation sélective est notamment assurée par la concentration de PI4P 5-kinases (type I PIP kinases). Les PIPKs ne partagent pas d'homologies significatives avec d'autres lipides kinases. Trois classes distinctes ont été identifiées selon des similarités dans la région catalytique de ces enzymes. Les classes I et II vont permettre la synthèse de PtdIns(4,5)P₂ de deux manières distinctes. Tandis que la classe III va permettre essentiellement de produire le PtdIns(3,5)P₂. La PIPK I ou PtdIns4P 5-kinase va catalyser la phosphorylation du PtdIns4P en position D5 du cycle inositol (Ishihara et al., 1996; Ishihara et al., 1998; Loijens and Anderson, 1996) et va exister sous 3 isoformes α , β et γ (Ishihara et al., 1998). La PIPK II ou PtdIns5P 4-kinase va catalyser la phosphorylation du PtdIns5P en position D4 du cycle inositol (Boronenkov and Anderson, 1995; Castellino et al., 1997; Divecha et al., 1995; Itoh et al., 1998; Rameh et al., 1997b) et possède également trois isozymes α , β et γ (Boronenkov and Anderson, 1995; Divecha et al., 1992; Itoh et al., 1998). Enfin, la PIPK III ou PIKfyve (phosphoinositide kinase for five position containing a fyve finger) va catalyser majoritairement la phosphorylation du PtdIns3P en position D5 du cycle inositol, on verra qu'elle pourra également engendrer la formation de PtdIns5P à partir du PtdIns (Sbrissa et al., 1999). De manière intéressante, une étude récente fait état de l'importance de la PI4P 5-kinase I α dans la production de PtdIns(4,5)P₂ cruciale pour permettre l'entrée du virus HIV-1 et les premières étapes de l'infection dans les lymphocytes T (Barrero-Villar et al., 2008).

Pathologies associées

Des mutations de ces enzymes ont été identifiées dans certaines pathologies, une mutation inactive dans le gène PIP5K1C encodant pour la PIPK I a été récemment identifié comme étant

responsable du syndrome de contractures congénitales létales ou LCCS (Narkis et al., 2007). Chez l'homme, le gène de la PIPKII α est considéré comme un candidat dans le développement de désordres bipolaires ou de schizophrénies (Schwab et al., 2006; Stopkova et al., 2005). De même une mutation dans le gène PIP5K3, encodant pour PIKFyve est à l'origine de dystrophie cornéenne mouchetée de François-Neetens (Li et al., 2005).

Enzymes	Substrat (s)	Localisation	Pathologie (s) Associée(s)
PI3K			
PI3K I p110 α - δ	PtdIns(4,5)P ₂	MP, N	cancer (P110 α)
PI3K II-C2 α	PtdIns, PtdIns4P?	MP, TGN/E	-
PI3K II-C2 β	PtdIns, PtdIns4P?	MP	-
PI3K II-C2 γ	PtdIns, PtdIns4P?	G	-
PI3K III (Vps34)	PtdIns	G, E	désordre bipolaire
PI4K			
PI4K II α	PtdIns	G, TGN/E, MP?	désordre bipolaire
PI4K II β	PtdIns	G, TGN/E, MP?	rôle dans l'activation T ? Recrutement TCR ?
PI4K III α	PtdIns	RE, G	rôle positif dans la réplication virale (HCV)
PI4K III β	PtdIns	N, G	-
PIP3K			
PIP3K I/PtdIns4P 5-kinase (α, β, γ)	PtdIns4P	MP	PIP3K α : rôle positif dans l'entrée du HIV-1 dans le LT, LCCS
PIP3K II/PtdIns5P 4-kinase (α, β, γ)	PtdIns5P	MP(α, β), RE (γ)	désordre bipolaire, schizophrénies
PIP3K III/PIKFyve	PtdIns, PtdIns3P	ET	Dystrophie cornéenne

Fig.11. Kinases humaines du métabolisme des phosphoinositides, substrat préférentiel, localisation et pathologie engendrée(s) en cas de dysfonctionnement. MP: Membrane Plasmique; G: Golgi; E: Endosomes; TGN: Trans-Golgi Network, RE: Réticulum endoplasmique; ET: Endosomes Tardifs; N: Noyau.

Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)

Classification

Au niveau de la membrane plasmique, le PtdIns(4,5)P₂ pourra ensuite être phosphorylé en position D3 par la PI3-Kinases en PtdIns(3,4,5)P₃. Il existe huit membres dans la famille des PI3K, distribués en 3 classes selon le substrat préférentiel, toutes vont phosphoryler le cycle inositol en position D3. Parmi toutes les classes de PI3K celles de classe I sont particulièrement étudiées dans le lymphocyte T.

Les PI3Ks de classe I vont préférentiellement phosphoryler *in vivo* le PtdIns(4,5)P₂ au niveau de la membrane plasmique en PtdIns(3,4,5)P₃, elles auraient également la capacité de phosphoryler le PtdIns et le PtdIns4P *in vitro*. Ces enzymes sont subdivisées en deux groupes IA et IB. Ce sont des hétérodimères composés d'une sous unité catalytique de 110kDa (p110) et d'une sous unité adaptatrice/régulatrice. La classe IB est composée d'une seule isoforme de la sous-unité catalytique p110γ qui est associée aux sous-unités adaptatrices p101 ou p84. Ces hétérodimères p110γ/p101 sont activés directement par les sous unités Gβγ des protéines G hétérotrimériques en aval des RCPGs (récepteurs couplés aux protéines G) et de la protéine Ras-GTP (Suire et al., 2006). A noter que de nombreuses études montrent que les RCPGs peuvent stimuler également l'activité des PI3K de classe IA. Ceci peut s'expliquer d'une part par des activités tyrosines kinases connues en aval des RCPGs, et d'autre part par une activation directe de p110β (et pas p110α) par les sous unités Gβγ (Vanhaesebroeck et al., 2001).

Les PI3Ks de classe II sont monomériques et vont phosphoryler de manière prédominante le PtdIns mais aussi en moindre proportion le PtdIns4P pour donner respectivement le PtdIns3P et le PtdIns(3,4)P₂. Par contre, ces PI3K de classes II ne semblent pas capables de phosphoryler le PtdIns(4,5)P₂.

Enfin, la seule PI3K de classe III identifiée, à ce jour, est Vps34, un homologue de la protéine Vps34p (vacuolar protein sorting 34) de *Saccharomyces cerevisiae*. Vps34 va également phosphoryler de manière quasi exclusive le PtdIns pour donner le PtdIns3P.

Pathologies associées : Cancer et stratégies anticancéreuses

La PI3K a initialement été découverte à cause de son association avec l'oncoprotéine virale v-Src provenant du virus du sarcome de P. Rous (pp60^{v-Src}) (Sugimoto et al., 1984). Il est maintenant évident que les isoformes de la PI3K IA jouent un rôle critique dans les cancers humains, notamment par le fait que le PtdIns(3,4,5)P₃ va engendrer le recrutement de AKT puis son activation et promouvoir la prolifération et la survie cellulaire. Dans une analyse sur la voie PI3K, sur 450 échantillons de tumeurs provenant de huit types de tumeurs 55% présentaient une forme active d'AKT, laissant présager de l'incidence de l'activité de la PI3K sur les pathologies cancéreuses (West et al., 2002).

Des mutations somatiques activatrices sur les PI3K sont retrouvées dans de nombreux types de cancers tels que les glioblastomes, cancers ovariens, gastriques, du sein, des poumons et du colon (Bader et al., 2005; Engelman et al., 2006; Luo et al., 2003a; Osaki et al., 2004; Yuan and Cantley, 2008). Mais également des amplifications géniques de la PI3K sont observées dans divers types de cancers cervicaux, ovariens, poumons, thyroïde, sein, œsophage, glioblastome et cancers gastriques (Bader et al., 2005; Engelman et al., 2006; Osaki et al., 2004).

La découverte d'inhibiteurs de cette voie PI3K/AKT, permet de limiter cet effet oncogénique, en l'occurrence des inhibiteurs des PI3K (Knight et al., 2006) ou les inhibiteurs agissant sur les effecteurs en aval de la PI3K tels que les inhibiteurs d'AKT (Barve et al., 2006) ou de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), substrat d'AKT comme la rapamycine (Albanell et al., 2007; Engelman et al., 2006; Osaki et al., 2004).

Les premiers inhibiteurs PI3K répertoriés, la wortmannin et le LY294002 montrent pas ou peu de sélectivité pour les isoformes PI3K individuelles et possèdent une toxicité considérable (Knight and Shokat, 2007; Marone et al., 2008). Malgré ces limitations, les études précliniques sur ces inhibiteurs à large spectre ont énormément contribué à la meilleure compréhension de l'importance de la PI3K dans la signalisation et de plus ces études sont un point de départ pour la découverte de nouveaux inhibiteurs PI3K. Ainsi, de nombreux inhibiteurs avec une sélectivité différentielle pour les diverses isoformes ont été développés fournissant de nouveaux traitements potentiels plus ciblés. Dans une étude récente, une comparaison a été réalisée parmi les divers inhibiteurs spécifiques d'isoformes PI3K, les données ont montré un rôle crucial de la p110 α dans la signalisation sous le récepteur à l'insuline (IR) justifiant ainsi de l'utilité cette approche

d'inhibiteur sélectif dans la découverte des fonctions précises de chaque isoforme (Knight et al., 2006). Par la suite il a été suggéré que l'inhibiteur PI-103, inhibiteur spécifique de la p110 α , avait également la capacité de bloquer mTOR (Fan et al., 2006). Cet effet présumé de PI-103 sur le complexe mTOR a à son tour ouvert de nouvelles routes dans la recherche thérapeutique anti-cancéreuse en suggérant l'inhibition combinée de mTOR et la PI3K .

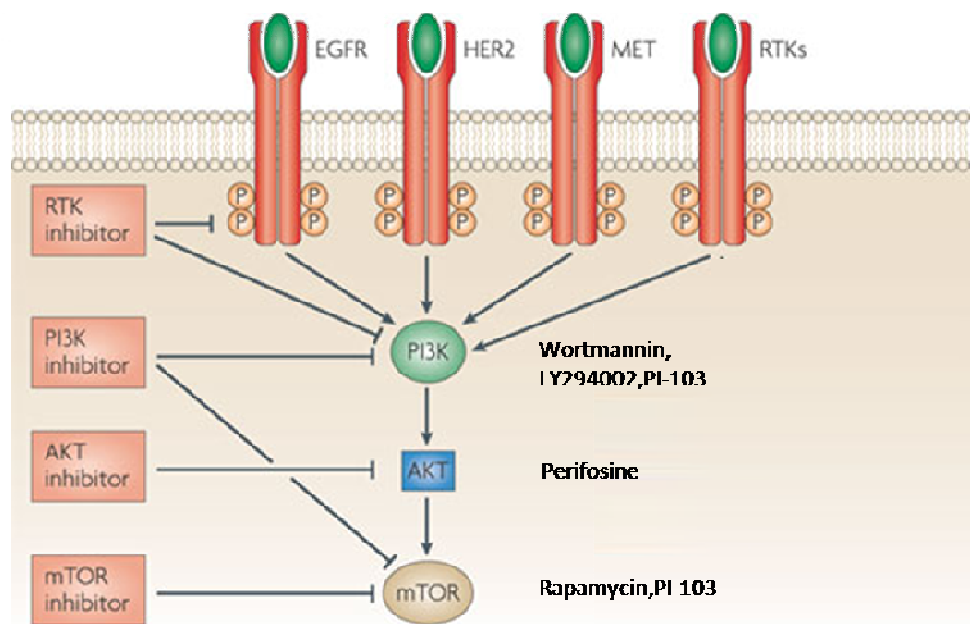


Fig 12. La voie PI3K, cible thérapeutique anti-cancéreuse.

Les inhibiteurs vont reconnaître les PI3K elles-mêmes, des cibles essentielles de la voie PI3K (AKT, mTOR) ou les récepteurs à activité tyrosine kinases (RTKs) en amont. Les inhibiteurs pleiotropiques ou l'association de plusieurs inhibiteurs spécifiques pourraient induire de meilleurs effets thérapeutiques.

**Pixu Liu, Hailing Cheng, Thomas M. Roberts & Jean J. Zhao
(Nature Reviews Drug Discovery, 2009)**

Il y a ainsi un certain nombre de preuves émergentes indiquant que le ciblage d'une isoforme ou d'autres effecteurs de la voie PI3K peuvent être suffisant pour bloquer un type particulier de tumeur. En effet, les inhibiteurs pour une seule isoforme vont éviter la toxicité au niveau du système immunitaire, qui est largement dépendant comme on l'a vu précédemment de l'activité des p110 δ et p110 γ pour fonctionner. De même étant donné que la p110 α et la p110 β semblent avoir des rôles distincts dans de multiples processus cellulaires, il est possible qu'une seule cible développe moins d'effets secondaires.

Ainsi, le développement d'inhibiteurs de plus en plus spécifique de la PI3K ou de ses effecteurs est l'une des stratégies majeure dans la pharmacologie anticancéreuse. On peut ainsi grossièrement

identifier trois grandes cibles, la PI3K elle-même, AKT ou mTOR et le développement de divers inhibiteurs de chacune des isoformes de ces molécules qui seront utilisés seuls ou de manière combinée (Fig.12).

La plupart de ces inhibiteurs vont cibler l'activité kinase de ces molécules, et plus précisément la région se liant à l'ATP. Cependant, parmi tous ces inhibiteurs, il existe des inhibiteurs lipidiques basés sur la structure des phosphatidylinositol. Le plus avancé de ces inhibiteurs « de nouvelle génération » est la perifosine (Barve et al., 2006; Hilgard et al., 1997) . Celle-ci est un analogue du PtdIns(3,4,5)P₃ qui va empêcher la liaison du domaine PH (pleckstrin Homology) d'AKT à son ligand et ainsi prévenir le recrutement d'AKT au niveau de la membrane plasmique. Ces inhibiteurs ont d'ailleurs démontré une inhibition de la croissance tumorale de cellules ayant une forte activité PI3K et AKT (Gills et al., 2006).

Ce genre de nouvelle stratégie originale, peut ainsi s'avérer d'une grande utilité pour l'inhibition de la voie PI3K, mais on peut penser dans une plus large mesure, pourrait être utilisée pour réguler diverses protéines se liant à des membres de la famille des phosphoinositides. De plus, la PI3K est l'enzyme lipidique la plus étudiée, et la masse de données récoltées à ce jour sur cet enzyme est immense. Cette PI3K est à mon avis une « tête de gondole » indiquant l'importance d'un fonctionnement normal du métabolisme des phosphoinositides. Malgré le peu d'études sur les autres lipides kinases, certaines de ces enzymes peuvent être associées également à des pathologies (McCrea and De Camilli, 2009). Cela laisse bien entendu sous entendre encore une fois l'importance des phosphoinositides à proprement parler en tant que seconds messagers dans les voies de signalisation cellulaire, l'efficacité de ces inhibiteurs lipidiques, analogue des phosphatidylinositol, illustrant cette hypothèse.

Les lipides phosphatases

Les Phosphoinositide phosphatases vont déphosphoryler le cycle inositol sur les positions D3, D4 et D5. Ces protéines appartiennent à deux superfamilles d'enzymes :

- Les enzymes de la famille des tyrosines protéines phosphatases qui contiennent une cystéine conservée dans un motif consensus CX_5R typiquement retrouvé dans PTEN (Phosphatases et Tensin homolog deleted on chromosome 10)
- La deuxième famille est composée d'isoenzymes inositol 5-phosphatase

Comme on l'a vu précédemment, pour les lipides kinases, les différentes phosphoinositides phosphatases vont être impliquées dans diverses pathologies humaines (Pendaries et al., 2003).

Phosphoinositides 3-phosphatases

PTEN (Phosphatases et Tensin homolog deleted on chromosome 10)

Classification

PTEN possède une double fonction, d'une part c'est une tyrosine protéine phosphatase et d'autre part une protéine lipide phosphatase car elle va être capable d'hydrolyser in vitro les phosphates en positions D3 du cycle inositol des $PtdIns3P$, $PtdIns(3,4)P_2$ et $PtdIns(3,4,5)P_3$ (Maehama and Dixon, 1998). Les deux fonctions semblent importantes, en effet, l'hyperpolarisation des cellules β pancréatiques des îlots de Langerhans par la leptine, étape préalable à la sécrétion d'insuline, va requérir l'action conjointe des deux mécanismes (Ning et al., 2006). C'est par l'analyse de sa structure que l'on a pu révéler, pour la première fois, l'importance du motif CX_5R et notamment de sa cystéine conservée pour accéder à la tête tri-phosphorylée du cycle inositol des $PtdIns(3,4,5)P_3$ (Lee et al., 1999). Le $PtdIns(3,4,5)P_3$ est le substrat préférentiel de PTEN, en faisant ainsi un régulateur majeur de la voie des PI3K (Leslie and Downes, 2002).

Rôle dans le lymphocyte T : PTEN un régulateur négatif du système immunitaire

Il est essentiel de souligner l'importance que la régulation de PTEN semble avoir dans les voies de signalisation, en effet, l'inactivation génique de *pten* est létale au niveau embryonnaire chez la souris (Di Cristofano et al., 1998b). Mais les déplétions tissus-spécifiques et hétérozygotes ont permis de replacer PTEN en tant que régulateur négatif du système immunitaire. En effet, les souris hétérozygotes pour PTEN vont développer une lymphoprolifération auto-immune à neuf mois (Di Cristofano et al., 1999). La déplétion de PTEN T-spécifique va engendrer une splénomégalie et un accroissement de la taille du thymus, mais également l'hyperprolifération des lymphocytes T autoréactifs, la résistance à l'apoptose, l'augmentation de la sécrétion de cytokines, accompagnés de l'augmentation de la phosphorylation d'AKT dépendante de la voie PI3K (Suzuki et al., 2001). Ainsi, il est apparu évident que la régulation de la voie PI3K par PTEN au niveau du thymus, jouait un rôle critique dans le développement des cellules T.

Le modèle cellulaire T le plus utilisé pour l'étude de cette phosphatase est la lignée leucémique T Jurkat qui est déplétée en PTEN et SHIP. Ce modèle a notamment largement été utilisé pour démontrer que ces deux phosphatases pouvaient contrebalancer les effets de la PI3K suite à l'engagement du TCR ou de la molécule de costimulation, CD28 (Astoul et al., 2001). A ce jour, seule une lignée cellulaire T immortalisée, Hut-78 a été identifiée comme exprimant PTEN et SHIP-1 à des niveaux comparables aux cellules T primaires (Freeburn et al., 2002).

Pathologies associées : PTEN un suppresseur de tumeur

PTEN est également connu sous le nom de MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers-1). C'est un suppresseur de tumeur bien caractérisé et il est fréquemment inactivé par des mutations, délétion génique ou inactivé de manière épigénétique (Cully et al., 2006).

Son rôle de suppresseur de tumeur est lié à sa capacité à déphosphoryler le PtdIns(3,4,5)P₃ en position D3 du cycle inositol. Des mutations somatiques de PTEN sont fréquemment retrouvées dans une grande variété de cancers et des mutations germinales en PTEN sont également associées à des syndromes caractérisés par le développement de multiples hamartomes qui présentent un risque élevé de développer des tumeurs. Ces maladies ont d'ailleurs été classifiées sous l'appellation PHTS : « PTEN Hamartoma tumor syndrome » (Marsh et al., 1999). Des mutations de PTEN dans les cancers sporadiques sont trouvées dans certains cancers tels que les glioblastomes, les cancers de l'endomètre et de la prostate (Stokoe, 2001). Dans près de 50% de ces cancers, l'expression de PTEN est moindre tandis qu'il n'existe aucune altération du gène en lui-même (Stokoe, 2001).

Enfin, la perte de fonction de la protéine PTEN va donc engendrer un accroissement de la prolifération, de la survie, de la migration (Whang et al., 1998). Ces caractéristiques, vont ainsi rendre les cellules susceptibles à l'apparition de carcinogènes, mais aussi favoriser l'apparition d'altérations épigénétiques secondaires qui vont induire l'apparition ou la progression de cancers (Kwabi-Addo et al., 2001 ; Suzuki et al., 1998). PTEN est ainsi largement admis en tant qu'enzyme permettant de contrebalancer les effets pro-oncogéniques de la voie de signalisation PI3K dépendante, cette enzyme représente ainsi un régulateur essentiel des voies de signalisations cellulaires.

La famille des myotubularines (MTMR)

Classification

Le premier membre identifié, la myotubularine (codée par le gène MTM1) est muté dans la myopathie myotubulaire, un désordre congénital sévère lié à l'X (Laporte et al., 1996). Par la suite, deux études indépendantes ont démontré que MTM1 avait, à l'image de PTEN, une double spécificité de protéines phosphatases et lipides phosphatase en position D3 spécifique du PtdIns3P (Blondeau et al., 2000; Taylor et al., 2000). MTM1 est ainsi devenu le prototype d'une large famille de protéines MTMR (MTM-related) qui comprend 14 membres chez l'homme (Clague and Lorenzo, 2005; Robinson and Dixon, 2006). MTM1 et les MTMR1,2,3,4,6 et 7 sont des 3-phosphatases avec une spécificité restreinte au PtdIns3P et PtdIns(3,5)P₂ (Robinson and Dixon, 2006; Tronchere et al., 2003; Tronchere et al., 2004). Les autres membres de la famille présentent étonnamment une mutation dans le motif consensus phosphatase qui les rend inactifs (Robinson and Dixon, 2006). Malgré l'identification de leurs substrats, la régulation de leur activité de même que leur localisation et leur rôle exact dans les fonctions cellulaires n'est que très peu documenté. Cependant plusieurs études réalisées sur les levures et *C.elegans* ont proposé un rôle de régulateurs négatifs du trafic endocyttaire pour cette famille MTM (Parrish et al., 2004; Xue et al., 2003).

Pathologies associées

Diverses MTMs ont des rôles importants et non redondants, illustré par le fait que chaque mutation résulte en une pathologie différente. Les mutations dans MTM1 sont responsables de la

myopathie myotubulaire, qui peut d'ailleurs être reproduite avec des souris déplétées en MTM1, qui sont ainsi incapable de maintenir des myotubes matures (Buj-Bello et al., 2002).

MTMR2 et MTMR13 sont mutés dans deux formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (McCrea and De Camilli, 2009)(CMT) respectivement CMT4B1 et CMT4B2, une neuropathie dégénérante atteignant la gaine de myéline (Bolino et al., 2000; Senderek et al., 2003). Les souris déplétées en MTMR2 ont un défaut au niveau des gaines de myélines, mais également un défaut dans la spermatogénèse et une azoospermie (Bolino et al., 2004). Il est intéressant de noter que MTMR13 est une MTM inactive qui pourrait agir en tant que régulateur de MTMR2.

Dans les cas des MTMs, là aussi des pathologies malignes associées à des mutations sur des enzymes de la voie de biosynthèse des phosphoinositides sont identifiées.

Les phosphoinositides 4-phosphatases

Seulement deux types de phosphoinositides phosphatases ont été identifiées chez les mammifères :

- les PtdIns(3,4)P₂ 4-phosphatases (Type I et II)
- les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases (Type I et II)

Aucune PtdIns(3,4,5)P₃ 4-phosphatase n'a été identifiée à ce jour. Deux enzymes PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases ont été identifiées chez les eucaryotes (Ungewickell et al., 2005). Ces dernières sont des orthologues de la protéine bactérienne IpgD qui est aussi une PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases provenant de *Shigella flexneri*. Cette enzyme bactérienne IpgD est d'ailleurs à ce jour l'outil le plus utilisé et le mieux caractérisé pour produire du PtdIns5P dans les cellules eucaryotes (Niebuhr et al., 2002).

Les PtdIns(3,4)P₂ 4-phosphatases

Cette famille est composée de deux isoformes, type I et type II partageant le même site catalytique CX₅R que les phosphatases précédentes (Norris et al., 1997; Norris et al., 1995).

Il existe des variants issus d'un épissage alternatif qui contiennent un domaine C-terminal hydrophobe pour les deux types, on a donc des type I et II α et β (Norris et al., 1997). Diverses études suggèrent que ces phosphatases peuvent avoir un rôle important dans la régulation cellulaire (Nystuen et al., 2001; Vyas et al., 2000). Une étude a d'ailleurs démontré que la 4-phosphatase de type Ia pouvait moduler le signal de la PI3K dans les endosomes et au niveau de la membrane plasmique (Ivetac et al., 2005). Ces enzymes semblent réguler le taux de PtdIns(3,4)P₂ en réponse à

des facteurs de croissance. Leur localisation est au niveau des membranes endosomales et leur fonction serait de produire du PtdIns3P nécessaire au recrutement de diverses protéines.

IpgD, le prototype bactérien de la PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatase

Il été récemment mis en évidence que certains pathogènes bactériens pouvaient affecter le pool de phosphoinositide des cellules hôtes en injectant leur propre phosphatase. Par exemple, *Shigella flexneri* responsable du bacille dysentérique, va utiliser un mode de sécrétion de type III pour injecter ses facteurs de virulence à l'intérieur de la cellule hôte (Cossart and Sansonetti, 2004). Parmi ces facteurs de virulence, il y a IpgD qui va être injectée au cours du processus infectieux. IpgD dégrade les PtdIns(4,5)P₂ et provoque une production massive en PtdIns5P, qui ont pu être dosée au cours de l'invasion du pathogène (Niebuhr et al., 2002). La séquence d'IpgD possède le même motif CX₅R que les 4-phosphatases eucaryotes, il a été montré que la substitution du résidu cystéine en sérine (C438S) conduit à une protéine inactive, comme classiquement observé pour ces familles de phosphatases (Niebuhr et al., 2002; Norris et al., 1997). Ainsi cette 4-phosphatase bactérienne est devenu l'outil principal pour augmenter le taux de PtdIns5P de manière ectopique à l'intérieur de cellules de mammifères. Aucune étude n'a fait mention de PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases eucaryote avant 2005 (Ungewickell et al., 2005). IpgD a d'ailleurs été dans cette étude comme séquence contrôle.

Les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases eucaryotes

Les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases eucaryote de type I et II sont deux orthologues de la protéine bactérienne IpgD, et ont été identifié sur la base du motif conservé CX₅R (Ungewickell et al., 2005). A part pour ce site actif pour l'activité phosphatase, il n'y a pas de similarités importantes entre ces phosphatases et IpgD. *In vitro* les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases eucaryote de type I et II sont capables de convertir le PtdIns(4,5)P₂ en PtdIns5P.

Les taux de PtdIns(4,5)P₂ peuvent ainsi être réduit de 20% dans des lignées stables inductibles en 4-phosphatase de type I (Ungewickell et al., 2005). Les deux enzymes sont localisés au niveau des compartiments des endosomes tardifs et des membranes lysosomales. Il reste cependant à confirmer que l'effet observé sur le pool de PtdIns(4,5)P₂ *in vitro* se retrouve *in vivo*.

Enzymes	Substrat (s)	Localisation	Pathologie (s) Associée(s)	
3-phosphatases				
PTEN 1/2	PtdIns(3,4)P ₂ , PtdIns(3,4,5)P ₃	MP, G, N	cancer	
MTM1	PtdIns3P, PtdIns(3,5)P ₂	C, PM?	myopathie	
MTMR1,2,3,4,6,7	PtdIns3P, PtdIns(3,5)P ₂	C, PM?	maladie de Charcot-Marie Tooth	
4-phosphatases				
Type I,II/ PtdIns(3,4)P ₂ phosphatase	PtdIns(3,4)P ₂	-	-	
Type I,II/ PtdIns(4,5)P ₂ phosphatase (IppD homologue bactérien)	PtdIns(4,5)P ₂	ET, LY, N	-	
5-phosphatases				
Type II	OCRL	PtdIns(4,5)P ₂	TGN/E, LY	syndrome oculo-cérébral de Lowe
	SKIP (Homologue INP54 chez la levure)	PtdIns(4,5)P ₂	RE, MP	-
	INPP5B/type II 5-phosphatase	PtdIns(4,5)P ₂ PtdIns(3,4,5)P ₂	G	syndrome oculo-cérébral de Lowe ?
Type III	SHIP-1/INPP5D	PtdIns(3,4,5)P ₂	MP, N	leucémies myéloïdes
	SHIP-2/INPP5L1	PtdIns(3,4,5)P ₂	MP, N	diabète de type II
Type IV	INPP5E/72 kDa 5-phosphatase	PtdIns(3,4,5)P ₂ PtdIns(4,5)P ₂	G	-

Fig.13. Phosphatases humaines du métabolisme des phosphoinositides, substrat préférentiel, localisation et pathologie engendrée(s) en cas de dysfonctionnement. MP: Membrane Plasmique; G: Golgi; E: Endosomes; TGN: Trans-Golgi Network, LY: Lysosomes; ET: Endosomes Tardifs; N: Noyau; C; Cytosol.

Les phosphoinositides 5-Phosphatases

Les phosphoinositides 5-phosphatases (INPP5s) sont définies par la présence d'un domaine inositol 5-phosphatase (5-Ptase) qui contient deux motifs consensus (F/I)WXGDXN(F/Y)R et (R/K)X(R/N)XP(S/A)(W/Y)(C/T)DR(I/V)L(W/Y) , qui vont être critique pour la fixation au substrat et la catalyse. Il y a 4 classes d'INPP5s : types I à IV. Cependant seules les classes II à IV sont capables d'hydrolyser des substrats phosphoinositides.

- La Type I, la première découverte, va agir sur les $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ et $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$.
- Les enzymes de types II incluent les synaptojanins, OCRL1, INPP5B et INPP5J et SKIP.
- Les types III comprennent SHIP-1 et SHIP-2
- La seule enzyme de Type IV est INPP5E

Je me focaliserais ici essentiellement sur les enzymes SHIP-1 et SHIP-2 qui sont les seules ayant un rôle décrit dans le système immunitaire.

SHIP-1 et SHIP-2: SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase

Classification

SHIP-1 (aussi appelée INPP5D) est une protéine de 145kDa dont l'expression est largement confinée aux cellules hématopoïétiques, tandis que SHIP-2 (aussi appelée INPP5L1) est exprimée de manière plus ubiquitaire. Des mécanismes d'épissage alternatif du transcrite codant pour la protéine entière SHIP-1 (SHIP-1 α) vont permettre la création de 3 isoformes plus petites SHIP-1 β , SHIP-1 δ et s-SHIP-1 (Lucas and Rohrschneider, 1999; Tu et al., 2001).

Comme leur nom l'indique, les isoformes de SHIP-1 et SHIP-2 contiennent un domaine SH2 en partie amino-terminale, une région proline-riche en partie C-terminale mais aussi deux motifs NPXY qui pourront être phosphorylé pour accueillir des partenaires à domaine PTB (Phospho Tyrosine Binding domain) ou SH2. L'ensemble de ces caractéristiques structurales facilitant leur liaison à de nombreuses kinases, protéines adaptatrices et récepteur membranaires (notamment motifs ITIM et ITAM). L'enzyme prototype SHIP-1 α a été identifiée de par sa capacité à se lier à des protéines adaptatrices telles que SHC, Grb-2 et Dok, mais aussi aux immunorécepteurs FC γ RIIB (Liu et al., 1994). Malgré les domaines 5-phosphatases des différentes SHIP-1 et SHIP-2 très similaires (65% d'identité de séquence), les isoformes SHIP-1 vont hydrolyser les phosphate en position D5 des $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ and $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ tandis que SHIP-2 sera plus spécifique des $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ (Wisniewski et al., 1999). Une fois recrutées au niveau des membranes plasmiques par les complexes de signalisation, son activité enzymatique va dégrader le $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ et empêcher le recrutement au niveau de la membrane plasmique de protéines effectrices à domaine PH, qui permettra de contrebalancer l'effet de la PI3K (Rohrschneider et al., 2000).

Rôle de SHIP dans le lymphocyte T

L'ensemble des domaines d'association protéiques de SHIP-1 et 2 suggère qu'elles jouent également un rôle d'adaptateur ou de compétiteur dans l'assemblage de certains complexes multienzymatiques de la signalisation. Beaucoup de données indiquent un rôle de régulateur essentiel de SHIP dans la cellule T. Par exemple, SHIP est tyrosine phosphorylé en réponse à une stimulation TCR ou CD28 (Edmunds et al., 1999). De plus, l'expression d'un mutant constitutivement actif de SHIP dans la lignée T leucémique Jurkat va réguler les taux constitutifs de PtdIns(3,4,5)P₃ (Freeburn et al., 2002). SHIP interagit également avec les PTK de la famille Tec et inhibe ses fonctions dans le lymphocyte T (Tomlinson et al., 2004) SHIP-1 participe également au signal négatif de la réponse TCR par la formation d'un complexe multimoléculaire composé de la molécule adaptatrice Dok-2, de la phosphatase lipidique SHIP-1 et de la protéine membranaire LAT (Dong et al., 2006).

Les souris déplétées en SHIP-1 ont initialement été utilisées pour explorer leur rôle dans la régulation du développement et de l'activation myéloïde et lymphoïde. Ces souris SHIP-1^{-/-} étaient viables et fertiles mais avec un raccourcissement de la vie (Helgason et al., 1998). La déficience en SHIP-1 dans les souris ont conduit à un nombre plus important de granulocytes, macrophages, une splénomégalie progressive et une infiltration myéloïde des poumons, conduisant à leur mort (Helgason et al., 1998). De manière importante, tandis que les macrophages, cellules B, cellules NK issus de ces souris présentaient des déficiences fonctionnelles (Brauweiler et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Wahle et al., 2007), l'impact de la déplétion SHIP-1 sur la biologie des cellules T a tout d'abord semblé peu important (Helgason et al., 1998; Liu et al., 1998).

Des analyses plus poussées sur ces souris ont cependant permis de démontrer que les lymphocytes T périphériques étaient constitutivement actifs, une augmentation du nombre de lymphocyte T_{reg} CD4⁺CD25⁺ a également été observé, suggérant un rôle important pour SHIP-1 dans le développement des T_{reg} (Kashiwada et al., 2006). Récemment, un paradigme emblématique de l'immunité liée au lymphocyte T a été révisé, en effet, il était communément admis qu'en fonction de la réponse immunitaire cellulaire pro-inflammatoire un sous-type T CD4⁺ Th1 apparaissait, ou si une réponse immunitaire humorale anti-inflammatoire un sous type CD4⁺ Th2 apparaît. Dernièrement, il a été proposé une troisième lignée de cellules Th produisant de l'IL-17, permettant la production de cellules Th17 et d'un sous-type de T_{reg} qui pouvaient réguler négativement la réponse immunitaire (Steinman, 2007). Il a été montré très récemment que SHIP était essentiel au

développement de ces cellules Th17 et jouait un rôle essentiel dans la régulation des T_{reg} et de ces cellules Th17 (Locke et al., 2009).

Enfin, afin de mieux comprendre l'effet de la délétion de SHIP-1 sur le compartiments cellulaire T, des souris possédant la délétion de *ship-1* uniquement dans les lymphocytes T ont été réalisés. Ces souris ne présentent aucune anomalie du développement thymique. La signalisation TCR induite, ne présente d'ailleurs aucune altération, et il n'y a aucune différence dans le nombre de T_{reg} en périphérie comparée à une souris normale. Cependant, les cellules T issus de ces souris montrent une expression réduite des niveau de cytokines pro-Th2 telles que l'IL-4, IL-5 et l'IL-13, tandis que ces cellules semblent plus sensibles à la cytokine pro-Th1 INF- γ . D'ailleurs ces souris présentent également une augmentation du nombre de lymphocyte T CD8+ cytotoxiques qui sont également plus actifs. Ainsi, l'expression normale de SHIP-1 semble s'opposer au développement du sous type Th1 et favoriser le développement de cellules Th2 (Tarasenko et al., 2007).

L'ensemble de ces données permettant de souligner l'importance de SHIP-1 dans la génération des sous types lymphocytaires et la régulation des T_{reg}.

Pathologies associées

Une mutation somatique du gène humain SHIP1 a été reporté dans des leucémies myéloïdes (AML) et dans des leucémies lymphoblastiques aigue (LLC) (Luo et al., 2003b). De plus, l'oncogène Bcr-Abl responsable des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) régule de manière négative l'expression de SHIP-1 (Sattler et al., 1999). Quant à SHIP-2 elle apparaît impliquée en tant que régulateur négateur négatif des voies de signalisation induites par l'insuline en inhibant la translocation dépendant du PtdIns(3,4,5)P₃ du transporteur du glucose GLUT4, vers la membrane plasmique (Kohn et al., 1996). Elle est aussi impliquée dans la dégradation du PtdIns(3,4,5)P₃ en aval du récepteur à l'EGF et dans les problématiques de diabète et/ou d'obésité (Clement et al., 2001; Sleeman et al., 2005).

Conclusions II.A

Il ressort de cette étude non-exhaustive des diverses phosphoinositides kinases et phosphatase que le métabolisme des phosphoinositides est très finement régulé par un nombre toujours croissant d'enzymes. Le grand nombre de maladies qui ont été identifiées suite à des atteintes de ces divers enzymes de cette voie métabolique soulignent l'importance de la régulation des

phosphoinositides dans la cellule et plus généralement dans la physiologie de l'organisme. J'ai voulu être le plus complet possible sur ces enzymes, car si PI3K, SHIP et PTEN qui sont sujets à de nombreuses recherches, il est plus rare de citer d'autres lipide kinases/phosphatases dans les mécanismes de signalisation associés aux cellules du système immunitaire.

Pourtant, l'étude approfondie de ces derniers, nous permet de nous rendre compte de leur importance, laissant présager par la même un rôle de certains phosphoinositides plus rares en dehors de ceux couramment étudiés, PtdIns(3,4,5)P₃ et PtdIns(4,5)P₂. Il me paraît ainsi essentiel de décrire des acteurs moins connus de cette voie de biosynthèse que sont les autres variétés de PIs.

Rôle fonctionnel des phosphoinositides et localisation subcellulaires

Au cours de ces 10 dernières années, le rôle des phosphoinositides n'a cessé de croître dans de nombreux processus cellulaires. Ces lipides vont contrôler la biologie des organelles en régulant le trafic vésiculaire, peuvent réguler des canaux ioniques et transporteurs, mais aussi les processus d'endocytose et d'exocytose. Ces phosphoinositides vont se localiser dans des compartiments précis des membranes cellulaires pour recruter de manière spatio-temporelle les protéines possédant un domaine d'interaction spécifique du phosphoinositide. Ces domaines d'interactions représenteront autant d'outils pour permettre leur localisation subcellulaire. Nous allons voir les différents membres des PIs plus en détail. On peut classer ces PIs selon trois critères distincts suivant la chronologie de leur découverte:

- Les PIs participant à la voie classique permettant la génération des seconds messagers DAG et IP₃, à savoir le PtdIns4P et le PtdIns(4,5)P₂.
- Les D3 phosphoinositides
- Le PtdIns5P

Domaine de reconnaissance des phosphoinositides

Comme suggérés précédemment les phosphoinositides sont des régulateurs spatio-temporels pour une large gamme de protéines. Cette régulation est rendue possible grâce à leur interaction avec des domaines protéiques capables de reconnaître directement et spécifiquement les différents phosphoinositides. Par interaction avec des phosphoinositides, ces domaines recrutent les protéines dans des compartiments cellulaires spécifiques où, par interaction protéique ou par modulation de leur activité enzymatique, elles peuvent intervenir dans diverses réponses physiologiques telles que la transduction de signaux, le réarrangement du cytosquelette et le trafic membranaire. Le nombre de domaines connus pour interagir avec des phosphoinositides a fortement augmenté ces dernières années. On retrouve entre autres les domaines PH (Pleckstrin Homology), FYVE, PX (Phox Homology), ENTH, FERM, Tubby, C2 et PHD. Je me focaliserais uniquement ici, sur les domaines PH, qui ont été plus précisément l'objet de notre étude.

Les domaines PH

Le domaine PH (Pleckstrin Homology) fut initialement découvert dans la pleckstrine, protéine substrat de la protéine kinase C abondamment exprimée dans les plaquettes (Harlan et al., 1994) (Fig.14). On retrouve ce domaine dans plus de 250 protéines humaines, telles que des protéines adaptatrices (IRS1, Gab-1, Dok1...), des kinases (PKB, PDK1...), des phospholipases (PLC δ et γ , PLD), des protéines régulatrices de petites protéines G (Vav, ARNO, SOS...), des protéines du cytosquelette (Dynamin, Cytohesine) (Lemmon, 2003, 2008; Lemmon and Ferguson, 2000; Rebecchi and Scarlata, 1998).

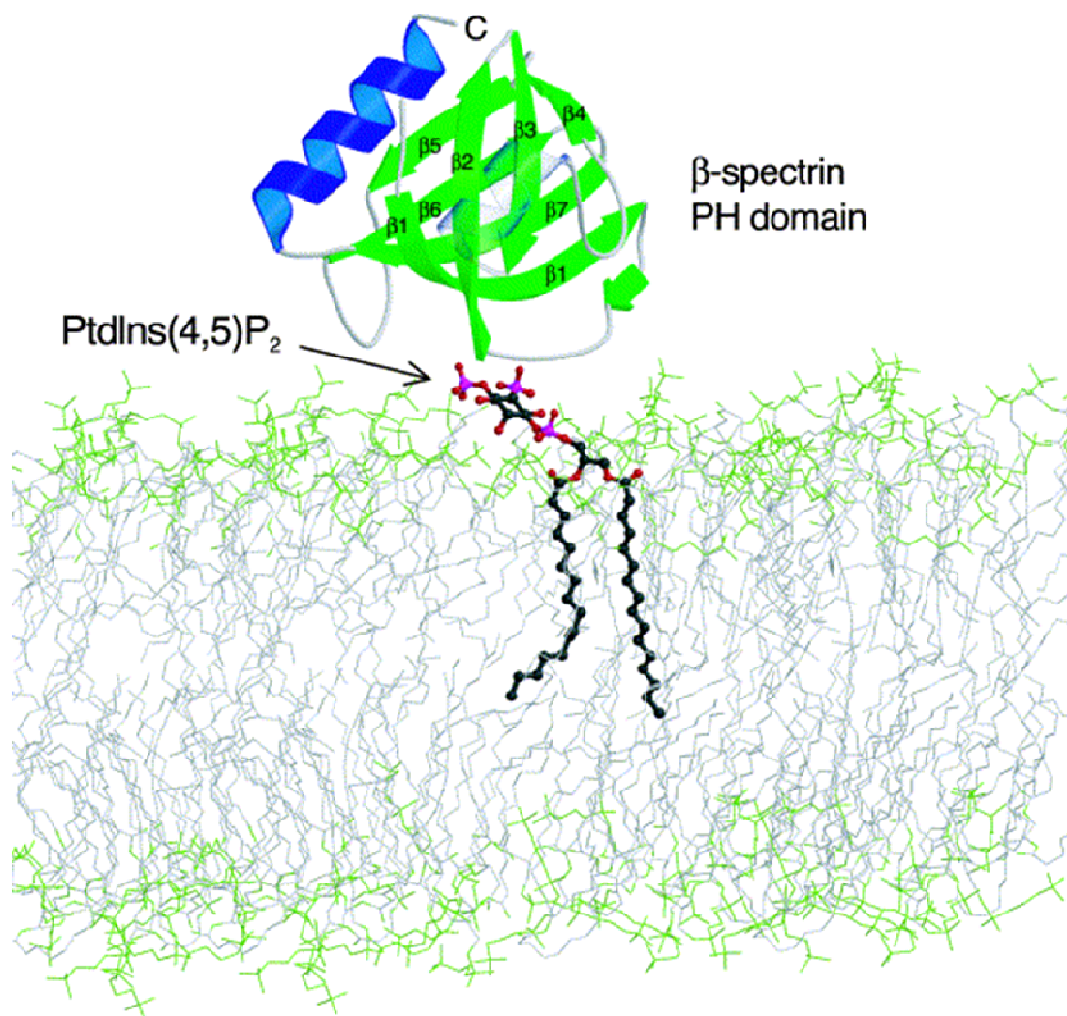


Fig.14. Représentation hypothétique de la fixation du domaine PH de la β-spectrine au PtdIns(4,5)P₂. La structure en cristallographie de la liaison du domaine PH de la β-spectrine avec l'InsP₃ a été obtenue. Par la suite le squelette de glycérol ainsi que les chaînes d'acide gras ont été ajouté artificiellement à l'IP₃ pour générer une vision hypothétique du PtdIns(4,5)P₂. Ce dernier est inséré dans un modèle de bicouche lipidique dimyristoylphosphatidylcholine. Les coudes β du domaine PH sont représentés en vert, tandis que l'hélice α est représentée en bleu.

Les domaines PH sont composés de 100 à 120 acides aminés. Ils présentent tous une structure commune, malgré le peu d'identité de séquence entre les différents domaines. Le domaine PH présente une structure en « sandwich » composée de deux feuillets β orthogonaux antiparallèles composés respectivement de trois et quatre brins. Une hélice α C-terminale ferme une des extrémités du sandwich, tandis que l'autre extrémité est fermée par trois boucles de séquence très variable, parmi les différents domaines PH, qui constituent le site de liaison aux phosphoinositides (Fig. 14). Ces deux régions sont responsables de la forte polarisation électrostatique du domaine ; la région comprenant les trois boucles variables, riches en lysines, arginines et histidines, est chargée positivement tandis que la région comprenant l'hélice α , riche en acides aminés acides, est chargée négativement. Le phosphoinositide interagit avec cette poche et l'interaction se fait par formation de liaisons ioniques entre les résidus basiques chargés positivement des boucles variables et les groupements phosphates chargés négativement des phosphoinositides (Dowler et al., 2000; Lemmon, 2003, 2008; Lemmon and Ferguson, 2000; Rameh et al., 1997a) (Fig.14). A noter que le même type de conformation est retrouvé dans les domaines PTB.

Les domaines PH lient les phosphoinositides avec une affinité et une spécificité d'interaction variable dépendant principalement de la longueur et de la séquence des boucles variables. La majorité des domaines PH ne présente qu'une faible affinité avec les phosphoinositides (Pleckstrin, Dynamin1, IRS1...). En effet, seulement 10% des domaines PH (et pourtant les plus étudiés des domaines de liaisons aux phosphoinositides) lient les phosphoinositides avec une forte affinité et une grande spécificité. (Dowler et al., 2000; Lemmon, 2003, 2008; Lemmon and Ferguson, 2000; Rameh et al., 1997a) C'est par exemple le cas du domaine de la PLC δ qui lie le PtdIns(4,5)P₂ (Kavran et al., 1998) ou du domaine PH de GRP-1 qui lie le PtdIns(3,4,5)P₃. C'est d'ailleurs dans le cas d'une forte affinité que le domaine d'intérêt sera utilisé *in cellulo* pour le marquage de ces phosphoinositides. D'autres domaines vont reconnaître spécifiquement les produits de la PI3-kinase tels que ceux des protéines AKT (Franke et al., 1997) et PDK1 (Stephens et al., 1998) qui lient spécifiquement les PtdIns(3,4)P₂ et PtdIns(3,4,5)P₃.

Enfin, il a largement été suggéré que quelques domaines PH pourraient se lier à des protéines *in vitro*, mais la relevance *in vivo* de telles interactions n'a été établie que dans quelques exemples concernant les sous unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques (Lemmon and Ferguson, 2000; Rebecchi and Scarlata, 1998). Comme suggérées dans des analyses des PH domaines chez la levure, entre 25 et 33% des PH domaines pourraient être recrutés à la membrane par la liaison conjuguée au phosphoinositide et à une petite protéine G (ou une autre protéine) (Yu et al., 2004). Récemment il a été fait état de la liaison de deux parties de domaine PH provenant de deux

protéines différentes PLC γ et le canal ionique TRPC3, recréant un domaine « PH-like ». Par des analyses de séquences et des études *in vitro*, il a été suggéré ce nouveau mode de protéine-protéine interaction avec deux fragments de domaines PH, qui pourraient ainsi former un nouveau domaine PH intermoléculaire pour la liaison avec le PtdIns(4,5)P₂. Cette association intermoléculaire serait requise pour la localisation et la fonction du canal ionique (van Rossum et al., 2005) (Fig.15). Cette dernière suggestion pourrait donner des indices quant à la fonction de la plupart des domaines PH n'ayant pas de spécificité dans la reconnaissance aux phosphoinositides.

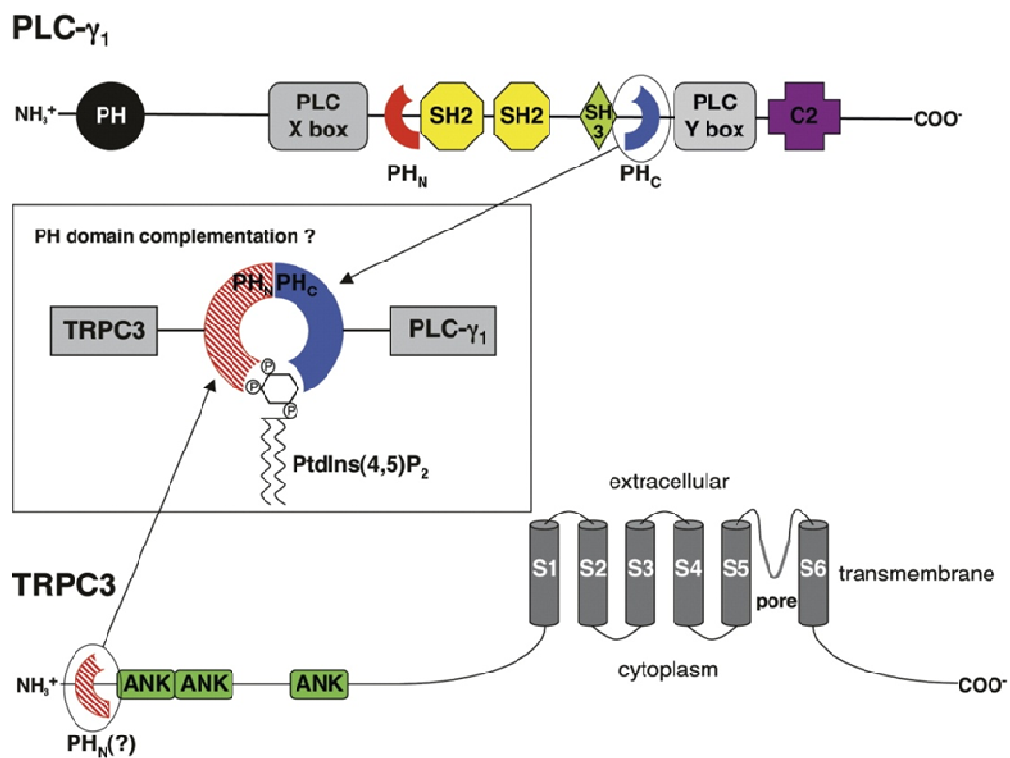


Fig.15. Représentation schématique de la complémentation entre les deux “fragments” de domaine PH de la PLC- γ_1 et TRPC3.

L’association des deux héli- PH permettrait l’interaction des deux protéines. Cette association permettrait également la reconstitution d’un domaine PH totalement fonctionnel permettant la liaison au PtdIns(4,5)P₂.

Lemmon MA.
(Cell, 2005)
Van Rossum DB, Patterson RL, Sharma S,
Barrow RK, Kornberg M, Gill DL, Snyder SH.
(Nature, 2005)

Les phosphoinositides de la voie classique DAG/IP₃

Le PtdIns4P

Le PtdIns4P est l'un des plus abondants des phosphoinositides avec le PtdIns(4,5)P₂. Il a longtemps été considéré comme un intermédiaire dans la production de PtdIns(4,5)P₂. Ce lipide est distribué dans l'ensemble des membranes des organelles de la cellule, mais est retrouvé en plus forte abondance au niveau de l'appareil de Golgi et particulièrement au niveau du réseau trans-golgien (TGN). Comme cité précédemment, l'enzyme qui synthétise le PtdIns4P au niveau du Golgi, est la PI4KII α . De manière générale, chez les mammifères, le Golgi est riche en PtdIns4P et pauvre en PtdIns(4,5)P₂, tandis que ce rapport est inversé au niveau de la membrane plasmique (De Matteis and Godi, 2004a, b).

Après sa production, le PtdIns4P va être reconnu par la protéine AP-1 et va ainsi participer à la formation des vésicules recouvertes de clathrin au TGN (Wang et al., 2003b). Lorsque le taux de PtdIns4P est réduit au niveau du Golgi grâce à l'utilisation d'ARN interférant de la PI4KII α , le Golgi tend à croître anormalement, l'association du complexe AP-1 avec le Golgi étant bloquée et les fonctions dues à AP-1 sont alors inhibées (Wang et al., 2003b). Ainsi, le PtdIns4P apparaît comme une molécule d'ancrage de protéines au niveau du Golgi, pour des protéines telles que FAPP1 et 2 (four-phosphatase-adaptor protein), epsinR ou OSBP (oxystérol binding protein) (Hirst et al., 2003; Levine and Munro, 2002; Wang et al., 2003b).

Diverses études suggèrent, une activation de la PI4KII β au niveau des membranes plasmiques suite à une activation du TCR par un anticorps CD3 (Fernandis and Subrahmanyam, 1998; Inokuchi and Imboden, 1990). Enfin, il ne serait pas étonnant que ce lipide soit une cible de choix pour entraver la progression de l'infection virale, étant donné que la plupart des virus bourgeonnent à partir du Golgi pour s'isoler dans le cytosol. En bloquant les fonctions du Golgi, la progression du virus pourrait être stoppée comme il l'a été observé dans le cas particulier du virus HCV, la régulation du taux de PtdIns4P pourrait donc être une cible de choix pour ralentir la progression virale (Berger et al., 2009; Trotard et al., 2009; Vaillancourt et al., 2009).

Le PtdIns(4,5)P₂

Le PtdIns(4,5)P₂ est considéré comme un des régulateurs clé de nombreuses voies de signalisation (McLaughlin and Murray, 2005; Oude Weernink et al., 2004). Trois voies différentes

mènent à la synthèse du PtdIns(4,5)P₂. La voie majoritaire consiste en la phosphorylation par une PtdIns4P 5-kinase du PtdIns4P (Ishihara et al., 1996; Ishihara et al., 1998; Loijens and Anderson, 1996) qui est en grande quantité dans les membranes cellulaires, la deuxième voie implique la phosphorylation par une PtdIns5P 4-kinase du PtdIns5P (Boronenkov and Anderson, 1995; Castellino et al., 1997; Divecha et al., 1995; Itoh et al., 1998; Rameh et al., 1997b) et la troisième voie correspond à la déphosphorylation du PtdIns(3,4,5)P₃ par PTEN . Outre son rôle essentiel de précurseur de trois messagers secondaires différents (le DAG, IP3 et le PtdIns(3,4,5)P₃), le PtdIns(4,5)P₂ participe, par interaction avec des protéines du cytosquelette, à de nombreux événements qui se déroulent à la membrane plasmique ou qui impliquent la membrane. Des exemples bien caractérisés ciblent notamment des composants de la machinerie d'endocytose tels que AP2, AP180 et l'epsine (Ford et al., 2001; Itoh et al., 2001) ce qui facilite leur recrutement à des sites potentiels d'endocytose. Un autre exemple au niveau de la réorganisation du cytosquelette d'actine, avec des liaisons à des protéines telles que la profiline et la gelsoline, qui sont des modules d'assemblage de l'actine (Hilpela et al., 2004; Yin and Janmey, 2003). Dans le cadre du remodelage du cytosquelette d'actine, la cible de la 4-phosphatase bactériennes IpgD (Niebuhr et al., 2002) favorise l'entrée du pathogène dans la cellule hôte. Divers rôles ont aussi été suggérés dans la motilité et l'adhérence cellulaires ainsi que les événements qui participent au trafic vésiculaire tels que l'endocytose, l'exocytose, la phagocytose et la sécrétion (McLaughlin and Murray, 2005; Oude Weernink et al., 2004).

Dans le système lymphocytaire T, une augmentation du taux intracellulaire de PtdIns(4,5)P₂ a été observé suite à la stimulation du complexe TCR par des anticorps CD3 sur la lignée T Jurkat(Inokuchi and Imboden, 1990). Ce phosphoinositide jouerait également un rôle prépondérant dans la réorganisation du cytosquelette durant le contact cellule T-APC, cependant il n'y a à ce jour que peu d'études qui s'intéressent directement au PtdIns(4,5)P₂ dans le lymphocyte T. Une étude récente, fait état d'une accumulation de PtdIns(4,5)P₂ au niveau de la synapse immunologique, mais plutôt dans la cellule présentatrice d'antigène et non pas dans la cellule T (Fooksman et al., 2009). La CPA doit également subir des réorganisations du cytosquelette et également des inductions de signaux d'activation.

Les D3 phosphoinositides

Le PtdIns3P

Le ptdIns3P est produit par la PI3K de classe III qui comprend la sous-unité catalytique Vps34. Le PtdIns3P est largement présent au niveau des membranes endosomales, des corps multivésiculaires (MVBs) et des phagosomes (Kutateladze, 2006). Les premières protéines identifiées liant le PtdIns3P sont Fab1p, YOPB, Vps27p et EEA1 donnant leur nom à ce domaine d'interaction, FYVE. Plus de 30 protéines à domaine FYVE ont été identifiées chez l'homme, et la plupart ont un rôle régulateur dans le trafic des membranes endocytaires. Ces protéines sont ainsi recrutées au niveau des membranes endosomales, ici aussi le PtdIns3P sera un véritable point d'ancrage endosomal. Deux protéines contenant un domaine FYVE sont très importantes pour la régulation endosomale, EEA1 et Hrs (Gillooly et al., 2000). EEA1 est un effecteur de la GTPase Rab5 et va promouvoir la fusion vésiculaire avec l'aide des protéines SNARE pour permettre la formation des endosomes précoces (Lawe et al., 2000). Tandis que Hrs va interagir avec la clathrine et les molécules STAM-1 et STAM-2 (signal transducing adaptor molecule) pour la formation de vésicules MVBs (Bilodeau et al., 2002). Au niveau des endosomes précoces dans les cellules de mammifères se produit un processus d'invagination de la membrane de l'organelle vers l'intérieur de ces compartiments, générant la formation de vésicules internes à l'endosome appelé "corps multivésiculaires" (MVBs).

Dans le lymphocyte T, il n'a pas été fait mention d'un rôle du PtdIns3P dans la signalisation. En tout état de cause, le PtdIns3P est le seul D3 phosphoinositide à ne pas augmenter, suite à une stimulation du TCR ou du récepteur à l'IL-2. (Jimenez et al., 1998 ; Jones et al., 1999a; Ward et al., 1992).

Le PtdIns(3,4)P₂

Le PtdIns(3,4)P₂ comme on l'a vu précédemment, est produit en grande partie par la déphosphorylation du PtdIns(3,4,5)P₃ par la phosphatase SHIP. Plusieurs protéines avec un domaine PH peuvent se lier aux deux phosphoinositides PtdIns(3,4,5)P₃ et PtdIns(3,4)P₂ comme PDK1 (Currie et al., 1999; Stephens et al., 1998) ou AKT (James et al., 1996). Cependant, il a été montré que le domaine PH des protéines TAPP-1 et TAPP-2 (Tandem PH domain-containing protein 1 and 2) lie préférentiellement le PtdIns(3,4)P₂, ce qui suggère que ce phosphoinositide peut

avoir une signalisation qui lui est propre (Thomas et al., 2001). Il a été suggéré que le PtdIns(3,4)P₂ pouvait fonctionner comme un second messager, car ses taux sont très bas dans des cellules quiescentes, mais relativement élevés après activation de la PI3K (Gray et al., 2003; Stephens et al., 2002; Vanhaesebroeck et al., 2001). De plus dans certains systèmes cellulaires, comme la voie de signalisation des intégrines dans les plaquettes, le PtdIns(3,4)P₂ peut être généré de manière indépendante par rapport au PtdIns(3,4,5)P₃, par la phosphorylation du PtdIns3P par une PI4K (Banfic et al., 1998). Dans le lymphocyte T, il y a une augmentation de 40 à 60 % des taux de PtdIns(3,4,5)P₃ et PtdIns(3,4)P₂ suite à une stimulation de la voie de l'IL-2 par un agoniste mais également sous une stimulation CD3/TCR (Jimenez et al., 1998 ; Jones et al., 1999a; Ward et al., 1992).

Le PtdIns(3,5)P₂

Initialement isolé chez la levure et dans des fibroblastes de mammifères, le PtdIns(3,5)P₂ résulte de la phosphorylation en position D5 du PtdIns(3)P par une PI5-kinase appelée Fab-1 chez la levure et PIKfyve chez les mammifères (McEwen et al., 1999; Shisheva, 2008). Une augmentation de PtdIns(3,5)P₂ a été observé due à divers stress tels que les chocs osmotiques chez la levure ou les rayons ultraviolets (UV) et les radiations chez les mammifères (Dove et al., 1997; Jones et al., 1999a). Ces données suggèrent que ce phosphoinositide agit comme un messager secondaire impliqué dans le stress cellulaire induit par ces stimuli. De plus, une mutation dans la protéine Fab-1, qui est l'unique kinase produisant du PtdIns(3,5)P₂ chez la levure, provoque un agrandissement anormal des vacuoles intracytoplasmiques suggérant également un rôle de ce PtdIns dans le trafic vésiculaire (Yamamoto et al., 1995), mais aussi dans le recyclage des protéines des corps vésiculaires et des vésicules des compartiments vacuolaires ou lysosomaux (Odorizzi et al., 2000). Enfin, il a été montré une production de PtdIns(3,5)P₂ suite à une stimulation de la voie de l'IL-2 par un agoniste ou une stimulation CD3/TCR, ceci dans les lymphocytes T (Jimenez et al., 1998 ; Jones et al., 1999a; Ward et al., 1992). Il peut ainsi être envisagé un rôle de ce phosphoinositide en réponse à l'IL-2 et/ou sous la signalisation du TCR.

PtdIns(3,4,5)P₃

Le PtdIns(3,4,5)P₃ est virtuellement indétectable dans les cellules quiescentes et sera seulement produit de manière transitoire au niveau des membranes plasmiques des cellules stimulées par la PI3K IA. Le PtdIns(3,4,5)P₃ va agir en tant qu'important second messager dans de

nombreux processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, le métabolisme, la motilité cellulaire et la réponse immunitaire (Cantley, 2002; Engelman et al., 2006). En accord avec ces fonctions pleiotropiques, la nature des protéines qui vont se lier spécifiquement au PtdIns(3,4,5)P₃ est variée, incluant des kinases (AKT, PDK-1, PKC...), des molécules adaptatrices (Gab1,...), mais aussi des GAPs et des GEFs (Vav, Grp1...). Ces protéines vont être recruté par l'intermédiaire de leur domaine PH. Il a été également montré que le PtdIns(3,4,5)P₃ pouvait également interagir avec des séquences protéiques basiques et hydrophobes qui sont retrouvés sur certaines protéines comme la neurogranine, la neuromoduline ou la centaurine α (Lu and Chen, 1997). Des séquences similaires ont été retrouvées sur les protéines RhoA et Rac1, ce qui leur permettrait de lier le PtdIns(3,4,5)P₃ et augmenter la dissociation avec le GDP *in vitro*. Ceci pourrait expliquer le rôle de ce lipide dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Missy et al., 1998). Enfin, de manière plus étonnante, les domaines SH2 de SRC, PLC γ et p85 pourraient eux aussi interagir avec le PtdIns(3,4,5)P₃ *in vitro*, ceci avec une faible affinité, les auteurs ont proposé que le phosphoinositide pourrait entrer en compétition avec la liaison aux phosphotyrosines (Rameh and Cantley, 1999).

Phosphoinositides	Localisation	Fonctions
PtdIns3P	Endosomes, corps multi-vésiculaires (MVBs)	Trafic endocyttaire, autophagie, maturation des phagosomes
PtdIns4P	Golgi, Trans Golgi Network (TGN) Membrane plasmique ?	Trafic du golgi à la membrane plasmique
PtdIns5P	Noyau, Endosomes ? Membrane plasmique ?	Survie, Apoptose induite par un stress ? Trafic vésiculaire ? Réorganisation du cytosquelette d'actine ? Régulation de l'expression génique et ubiquitinylation ? Rôle dans l'oncogenèse (NPM-ALK) ? Rôle dans le lymphocyte T ?
PtdIns(4,5)P ₂	Membrane Plasmique, Noyau, Golgi ?	Endocytose, dynamiques du cytosquelette, précurseur IP ₃ et DAG
PtdIns(3,4)P ₂	Membrane Plasmique	dynamiques du cytosquelette, signalisation membranaire
PtdIns(3,5)P ₂	Endosomes, corps multi-vésiculaires (MVBs), lysosomes ?	Réponse stress osmotique, recyclage protéique
PtdIns(3,4,5)P ₃	Membrane Plasmique	Dynamiques du cytosquelette, signalisation: prolifération cellulaire, apoptose, métabolisme, motilité cellulaire, la réponse immunitaire

Fig.16. Fonctions et localisation des phosphoinositides.

Le PtdIns5P

Généralités

Le PtdIns5P est le dernier des phosphoinositides caractérisé (Rameh et al., 1997b). La communauté scientifique a longtemps douté quant à l'existence de ce mono-PtdIns. En effet, les analyses réalisées en HPLC (high pressure liquid chromatography) jusqu'en 1997 ne détectait que le PtdIns4P et le PtdIns3P. C'est donc en 1997 que l'équipe du Pr. Cantley a démontré l'existence d'une nouvelle voie de biosynthèse du PtdIns(4,5)P₂ par phosphorylation du PtdIns5P *in vivo* et *in vitro* par la PtdIns5P-4kinase ou PIP5K II. Cette découverte tardive, est due à la difficulté de séparer le PtdIns5P de son isomère le PtdIns4P en plus grosse quantité dans la cellule. De manière étonnante, la découverte de ce nouvel mono-PtdInsP est une coïncidence. En effet, le but primaire de l'étude était de caractériser plus précisément l'activité des enzymes PIPK de types I et II qui étaient soupçonnées comme étant des PtdIns4P-5kinases. Les auteurs ont ainsi mis ces kinases en présence de PtdIns4P commercial et d'ATP radiomarqué (ATP-[γ ³²P]). Comme attendu, ils ont obtenu la synthèse de PtdIns(4,5)P₂ pour les deux types enzymatiques. Par la suite, ils ont traité leurs échantillons par la 5-phosphatase SHIP pour voir le relargage de phosphate inorganique (PI) radiomarqué. De manière surprenante, ils ont détecté du PI radiomarqué seulement dans l'échantillon traité avec la PIP5K de type I, tandis que pas ou peu de PI radiomarqué fut retrouvé dans le second échantillon. Cette observation indiquant, que le PI n'avait pas été relargué la PIP5K II générant ainsi du ³²P-PtdIns4P. Ceci suggère que la PIP5K II a phosphorylé la position D4 du cycle inositol. Suite à diverses confirmations, cette kinase fut caractérisée comme une 4-kinase et non 5-kinase comme attendu. Les auteurs expliquent finalement que cette découverte est dû à une contamination de l'échantillon commercial de PtdIns4P par du PtdIns5P, procurant ainsi par hasard le substrat préférentiel de la PIPK II.

Technique de détection du PtdIns5P : Dosage en masse

C'est d'ailleurs grâce à cette étude, qu'il a été permis de mettre en place une technique sensible pour la détection de PtdIns5P (Morris et al., 2000) (qui a d'ailleurs été employée dans nos études avec l'aide du laboratoire du Pr. Bernard Payrastre). En effet, l'utilisation de l'enzyme PtdIns5P 4-kinase II α spécifique du PtdIns5P est utilisée en présence d'ATP radiomarqué sur les échantillons ; qui ont subi au préalable une extraction lipidique, suivi d'une migration sur chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC) visant à séparer les mono-PtdInsP des autres

phosphoinositides. Il y aura ainsi production de 32 -PtdIns(4*,5)P₂. Suivra une seconde CCM pour isoler spécifiquement le 32 -PtdIns(4*,5)P₂ qui sera ensuite soumis à une analyse HPLC. C'est cette quantité de 32 -PtdIns(4*,5)P₂ qui permettra de refléter très précisément la quantité de PtdIns5P initialement présente dans l'extrait cellulaire, ceci étant possible grâce à une gamme étalon de PtdIns5P commercial ayant subi les mêmes traitements. Cette technique relativement lourde et difficile à mettre en place permet de détecter de faibles quantités de PtdIns5P et ainsi d'apprécier des variations minimales de taux de PtdIns5P dans les cellules stimulées.

Variation des taux de PtdIns5P dans divers modèles cellulaires

Régulation cytosolique positive de PtdIns5P

Suite à la découverte du PtdIns5P, il a été ainsi détecté pour la première fois l'existence d'une production de PtdIns5P *in vivo* dans les fibroblastes NIH3T3 en phase exponentielle de croissance. De manière intéressante, ils ont révélé une faible quantité de PtdIns5P comparables aux taux de PtdIns3P déjà connus (Rameh et al., 1997b). Les auteurs suggérant ainsi un rôle de ce PtdIns5P dans la génération du PtdIns(4,5)P₂ au niveau du cerveau, des plaquettes ou des globules rouges, où s'exprime principalement l'enzyme PIPK II α .

Par la suite, dans les plaquettes, qu'il a été fait état pour la première fois, d'une augmentation de PtdIns5P suite à une stimulation par la thrombine (Morris et al., 2000). La cinétique de stimulation indique un pic de PtdIns5P (de facteur 4 par rapport au contrôle) à 5 min de stimulation pour redescendre à des taux basaux vers 10 min. Puis, pour la première fois la présence de PtdIns5P dans les plantes a été établie (Meijer et al., 2001). D'ailleurs, suite à un stress osmotique, ce taux va varier dans les mêmes proportions et cinétiques que précédemment observés chez les plaquettes. La même observation sera faite plus tard sur des cellules de mammifères, les adipocytes 3T3-L1 (Sbrissa et al., 2002) ou des cellules musculaires L6 (Tronchere et al., 2004).

Peu après ces observations, l'invasion de cellules Hela par le pathogène *Shigella flexneri* a permis de mettre en évidence une augmentation de PtdIns5P. Cette bactérie va injecter dans sa cellule hôte, son effecteur IpgD (Niebuhr et al., 2002). Ce genre d'observation n'exclut pas un rôle du PtdIns5P dans la régulation du cytosquelette, car l'expression ectopique d'IpgD a un effet important sur l'organisation du cytosquelette d'actine, avec notamment la perte des fibres d'actine.

Variation des taux de PtdIns5P cytosolique

Régulation positive	Régulation négative
<ul style="list-style-type: none"> -Cellules NIH3T3 phase exponentielle de croissance (Rameh et al.1997) -Cellules adipocytes 3T3-L1 surexpression de PIKfyve (Sbrissa et al. 1999) -Plaquettes stimulation thrombine (Morris et al.2000) -Présence de PtdIns5P suite à un stress osmotique chez les plantes (Meijer et al. 2001) -Adipocytes 3T3-L1 stress osmotique (Sbrissa et al. 2002) -Cellules Hela, infection par <i>Shigella flexneri</i> (Niebuh et al. 2002) -Cellules CHO-IR stimulation insuline (Carricaburu et al. 2003)(Ikononov 2004) -Cellules musculaire L6 stress osmotique (Tronchère et al. 2004) -Cellules Jurkat surexpression de MTM1 (Tronchère et al. 2004) -Cellules exprimant NPM-ALK (Coronas et al. 2008) -Cellules Hela traitement pV (Willcox et al. 2008) -Cellules Hut-78 stimulation TCR (Guittard et al. 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> -Choc hypo-osmotique cellules adipocytes 3T3-L1 et Fibroblastes 3T3-L1 (Sbrissa et al. 2002) -Cellules CHO-IR surexpression de PIPKIIβ (Carricaburu et al. 2003) -Hydrolyse in vitro par la PLCδ1 (Liu et al. 2003) Cellules Hela traitement histamine + EGF (40%) (Roberts et al. 2005)

Variation des taux de PtdIns5P nucléaire

Régulation positive	Régulation négative
<ul style="list-style-type: none"> -Phase G1 du cycle cellulaire d'erythroleucémie murine (Clarke et al. 2001) -Surexpression de la PtdIns(4,5)P₂ 4-Phosphatase de Type I en cellules Hela (Zou et al. 2005) 	<ul style="list-style-type: none"> -Surexpression de la surexpression de PIPKIIβ ? (Gozani et al. 2003)

Fig.17. Résumé des variations de PtdIns5P observées sous diverses stimulations, transfections et modèles cellulaires.

Plus tard, une augmentation des taux de PtdIns5P fût détecté suite à une stimulation par l'insuline, dans des adipocytes ou des cellules CHO surexprimant le récepteur à insuline (CHO-IR) (Carricaburu et al., 2003; Sbrissa et al., 2004), suggérant ainsi un rôle du PtdIns5P dans la voie de l'insuline et le métabolisme du glucose.

Récemment, une augmentation de PtdIns5P a été décrite lors du processus de lymphomagenèse (Coronas et al., 2008). En effet, la présence de taux important de ce lipide a pu être mesuré dans des cellules exprimant la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK (NucleoPhosMin Anaplastic Lymphoma Kinase). Cette protéine chimérique est trouvée dans une large majorité de lymphomes anaplasiques à large cellules (ALCLs). Ces données suggèrent pour la première fois, un rôle potentiel de ce lipide dans le processus d'oncogenèse (Fig.17 tableau du haut).

L'ensemble de ces observations sont autant d'arguments, pour suggérer que lePtdIns5P serait un second messenger dans diverses voies de signalisation cellulaire, avec des rôles dans l'oncogenèse, le métabolisme du glucose ou en favorisant les invasions de diverses bactéries. Une augmentation de PtdIns5P (ici aussi d'un facteur 4 à 5) a été décrite dans des cellules Hela traitées par un agent inhibant les protéines tyrosines phosphatases, le pervanadate (pV) (Wilcox and Hinchliffe, 2008). Cette dernière observation suggère fortement un lien entre régulation des phosphorylations sur résidus tyrosine par les PTKs et PtdIns5P.

Régulation cytosolique négative du PtdIns5P

Lorsque des fibroblastes 3T3-L1 ou des Adipocytes 3T3-L1 ont été soumis à un choc hypo-osmotique, il a été observé une baisse très importante de PtdIns5P (80%) (Sbrissa et al., 2002). Récemment, une modulation négative des taux de PtdIns5P a été proposée dans les cellules Hela (Roberts et al., 2005). En effet, divers agents pharmaceutiques ont été utilisés, s'en est suivi un dosage de PtdIns5P. L'utilisation d'EGF, d'un stress oxydatif avec de l'eau oxygénée (activation voie MAPK p38), des esters de phorbols (activation voie PKC) ou de la thapsigargine (séquestration ion Ca^{2+} du cytosol) n'a pas permis une augmentation du taux de PtdIns5P. Cependant, le traitement des cellules par de l'histamine a produit une baisse significative (40%) du taux de PtdIns5P. De manière générale, l'histamine est un activateur de la dégradation du PtdIns(4,5)P₂ via l'activation de la phospholipase C spécifique des PIs. Les auteurs suggèrent ainsi que cette PI-PLC pourrait être à l'origine de l'hydrolyse de PtdIns5P, et qu'il pourrait d'ailleurs constituer un bon substrat (Essen et al., 1996). Il a également déjà été montré que la PLC δ 1 pouvait hydrolyser *in vitro* le PtdIns5P (Liu et al., 2003). Il reste cela dit étonnant de trouver un tel résultat quelque peu en opposition avec les résultats préalables notamment sur l'effet positif de la thrombine sur le taux de PtdIns5P qui active au contraire la PLC. Les auteurs expliqueraient éventuellement cette contradiction par le fait que la PKC serait activée de manière plus précoce que l'augmentation

de PtdIns5P, évitant ainsi l'hydrolyse de ce dernier. Il n'en reste pas moins à déterminer le réel impact de la PLC sur le PtdIns5P (Fig.17 tableau du haut).

Régulation nucléaire

La première étude faisant état de la présence de PtdIns5P dans le noyau a été réalisée sur des cellules d'érythroleucémie murine, et a décrit une augmentation d'un facteur 20 du taux de PtdIns5P durant la phase G1 du cycle cellulaire (Clarke, 2003). De plus, il a été également montré une augmentation du taux de PtdIns5P suite à un traitement aux UV, celle-ci serait due à la PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatase de type I également été retrouvé au niveau du noyau (Ciruela et al., 2000 ; Jones et al., 2006; Zou et al., 2007). Il a été également suggéré que cet effet pouvait être contrebalancé par l'expression nucléaire de la PIPKII β réalisant la transformation inverse (Gozani et al., 2003). Enfin, le premier ligand relativement bien caractérisé du PtdIns5P a été la protéine impliquée dans le remodelage de la chromatine ING-2 via un domaine PHD (Plant Homeo domain). L'ensemble de ces observations attestant pour un rôle supposé au niveau du noyau (Fig.17 tableau du bas).

Métabolisme du PtdIns5P

Le métabolisme du PtdIns5P n'a que très récemment était découvert, ou tout du moins suggéré. Parmi les enzymes qui le synthétisent on a : les enzymes procaryotes 4-phosphatase comme IpgD, les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases de type I et II, MTM1 et PIKfyve. Tandis qu'un seul type enzyme a été identifiée pour réguler les taux de PtdIns5P les PtdIns5P 4-kinases (PIPK II) (Fig.18).

Les lipides Kinases

Les PtdIns5P 4-kinases (PIPK II)

Ces enzymes ont récemment été impliqués dans le contrôle de l'augmentation de PtdIns5P. En effet, il a été démontré que l'augmentation de la phosphorylation sur résidus tyrosine engendré par un traitement au pervanadate provoquait une augmentation du taux de PtdIns5P (Wilcox and Hinchliffe, 2008). De manière intéressante, la baisse d'expression de la PIPKII α , via l'utilisation d'ARNi, mais pas de la PIPKII β ou PIPKII γ augmente la production de PtdIns5P, de manière

significative, suite au même traitement par le pervanadate (Wilcox and Hinchliffe, 2008). Ceci suggérant que la PIPKII α est responsable de la régulation du taux de PtdIns5P dans des compartiments subcellulaires sensibles au traitement par le pervanadate. Enfin, il a été observé récemment une augmentation du taux de PtdIns5P dans le noyau suite à une irradiation aux UV (Jones et al., 2006). Cette augmentation a été attribuée à l'inhibition de la PI5P 4-kinase II β qui est phosphorylée par la protéine kinase p38 activée dans le cadre de stress cellulaire (Jones et al., 2006).

PIPK III ou PIKfyve

La PIPK III ou PIKfyve est une lipide 5-kinase possédant un domaine FYVE de liaison au PtdIns3P. Ce domaine est responsable de son adressage subcellulaire aux endomembranes (Sbrissa et al., 2002). Les deux substrats de PIKfyve qu'elle phosphoryle en position D5 sont le PtdIns pour générer du PtdIns5P ou le PtdIns3P pour générer du PtdIns(3,5)P₂. C'est la seule lipide kinase identifiée à ce jour capable de synthétiser du PtdIns5P *in vitro* et potentiellement *in vivo* puisqu'une surexpression de PIKfyve induit une augmentation des taux de PtdIns5P de 80% dans les adipocytes 3T3-L1 (Sbrissa et al., 2002; Sbrissa et al., 1999; Shisheva, 2001). Mais également, PIKfyve semblerait être impliqué dans la production de PtdIns5P relevée dans les cellules exprimant la kinase oncogénique NPM-ALK. En effet, l'utilisation d'un ARNi de PIKfyve va réduire d'un facteur deux le taux de PtdIns5P de ces lignées, suggérant d'une part que PIKfyve permet la production de PtdIns5P *in vivo* et d'autre part, qu'elle participerait potentiellement au processus de lymphomagenèse induite par NPM-ALK (Coronas et al., 2008). Cependant, la présence du domaine FYVE de fixation au PtdIns3P laisse à penser qu'il serait son substrat préférentiel. En effet, il est intéressant de souligner que la présence de ce domaine FYVE permet une production efficace de PtdIns(3,5)P₂ *in vivo* malgré le fait que le PtdIns3P soit 400 fois moins abondant que le PtdIns, l'autre substrat de PIKfyve. Il reste ainsi difficile de savoir si la production de PtdIns5P est le fait de l'abondance du substrat PtdIns par rapport au PtdIns3P ou s'il existe une sorte de double spécificité pour les deux substrats, largement supérieure pour le PtdIns3P du fait du domaine FYVE.

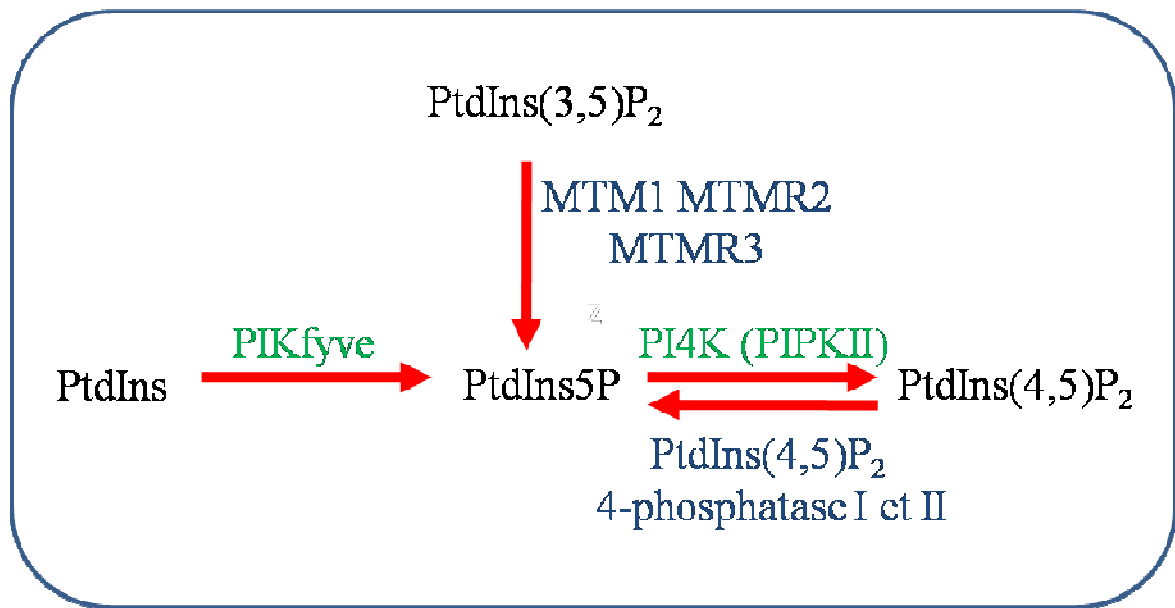


Fig.18. Représentation schématique du métabolisme du PtdIns5P chez les cellules eucaryotes.

Les lipides phosphatases

MTM1

Le rôle physiologique de ces diverses myotubularine, à savoir réguler les pools de PtdIns3P et PtdIns(3,5)P₂ par leur activité 3-phosphatase reste encore à explorer *in vivo*. Il semblerait que les MTMs n'aient pas vraiment de spécificité de substrats, car *in vivo* et *in vitro* des données du laboratoire de B. Payraastre ont démontré que les MTM1, MTMR1 ou MTMR3 peuvent utiliser l'un ou l'autre des substrats (Tronchere et al., 2004). Ces travaux ont ainsi mis en évidence pour la première fois une production de PtdIns5P par une enzyme eucaryote. Ces MTMs sont donc des candidats potentiel pour la régulation du taux intracellulaire de PtdIns5P. D'ailleurs de manière intéressante, la transfection de MTM1 permet la production *in vivo* de PtdIns5P dans la lignée leucémique Jurkat (Tronchere et al., 2004). Cette dernière observation suggérant d'une part que MTM1 est réellement capable de synthétiser du PtdIns5P *in vivo*, et d'autre part, nous fournit un candidat potentiel pour la synthèse de PtdIns5P au niveau du lymphocyte T.

la PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases : *IpgD*

IpgD va dégrader les PtdIns(4,5)P₂ et provoquer une production massive en PtdIns5P, qui ont pu être dosée au cours de l'invasion du pathogène (Niebuhr et al., 2002). Bien qu'*IpgD* ne soit

pas absolument requis pour l'entrée de la bactérie dans les cellules en culture (Allaoui et al., 1993), elle est impliquée dans la formation des foyers d'entrée et semble agir sur le remodelage du cytosquelette d'actine (Niebuhr et al., 2002; Niebuhr et al., 2000). L'expression ectopique d'IpgD dans des cellules mammifères induit une forte diminution de la tension membranaire. Ces données suggèrent qu'IpgD abaisse localement l'adhésion du cytosquelette à la membrane, en hydrolysant les principaux intermédiaires de cette association membrane- système de filaments d'actine sans doute par la dégradation du PtdIns(4,5)P₂. Cependant, l'apparition de PtdIns5P pourrait également jouer un rôle important pour la bactérie. En effet, le PtdIns5P va favoriser l'activité de la PI3K de classe IA (Pendaries et al., 2006). Ce mécanisme semble particulièrement important car il pourrait réguler la survie des cellules hôtes dans le but de maintenir un environnement bénéfique à la colonisation bactérienne. Ainsi cette 4-phosphatase bactérienne est devenu l'outil principal pour augmenter le taux de PtdIns5P de manière ectopique à l'intérieur de cellules de mammifères.

Les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases eucaryotes

Comme vu précédemment, Les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases eucaryote de type I et II sont deux orthologues de la protéine bactérienne IpgD. Dans une étude récente, l'équipe du Pr. Majerus a démontré que la type I 4-phosphatase pouvait augmenter le taux nucléaire de PtdIns5P (Zou et al., 2007). Ils suggèrent que le taux de PtdIns5P pourrait réguler l'apoptose p53-dépendante grâce à son interaction avec le facteur de transcription ING2 en réponse à un stress génotoxique. En effet, la type I 4-phosphatase est transloquée au niveau du noyau suite à une stress et permettrait ainsi l'augmentation du taux de PtdIns5P intranucléaire (Zou et al., 2007). Ceci va cependant à l'encontre des observations sur les effets du PtdIns5P sur la survie vues précédemment. Malgré la découverte de ces enzymes eucaryotes, il reste tout de même quelques incertitudes quand à leur rôle dans les voies de signalisations cellulaires. Il faudrait ainsi caractériser plus précisément l'activité de ces enzymes pour trancher sur leur effet réel sur les pools de PtdIns5P.

Ligands du PtdIns5P

Comme mentionné précédemment, la meilleure stratégie pour comprendre le rôle des phosphoinositides est de trouver un domaine d'interaction spécifique pour pouvoir localiser les pools de lipides et leur attribuer une fonction. Une autre stratégie adoptée est de localiser les enzymes du métabolisme de ces phosphoinositides, en gardant en tête que l'enzyme se trouvera localisée au lieu où se situe son substrat. Cependant, pour le PtdIns5P cette dernière option semble

cela dit plutôt anticipée étant donné le peu de certitude que l'on a sur la véritable activité de chaque enzyme identifié à ce jour dans le métabolisme du PtdIns5P. Ainsi la découverte d'un domaine spécifique pour la liaison au PtdIns5P devient réellement essentielle voire incontournable pour caractériser plus précisément son action.

Le Domaine PHD des protéines ING-2 et ATX-1

Ce domaine PHD (Plant Homéo Domain) est un domaine en doigt de zinc conservé, présent dans de nombreuses protéines chez les eucaryotes. Un grand nombre de protéines servant à la régulation chromatinienne contiennent des domaines PHD, comme par exemple la protéine acetyltransférase CBP/p300, la protéine de remodelage chromatinien ACF et la famille de suppresseur de tumeur ING (Feng et al., 2002; Fyodorov and Kadonaga, 2002; Kalkhoven et al., 2002). En 2003, le domaine PHD de la protéine ING-2 est le premier domaine identifié, par trois types d'expériences *in vitro*, comme ayant pour ligand lipidique préférentiel le PtdIns5P, même si il est capable de lier plus faiblement également le PtdIns3P et le PtdIns4P (Gozani et al., 2003). De plus, le fait d'oligomériser leur domaine PHD dans une protéine chimère 3X-PHD ING-2, leur permet d'augmenter sensiblement la spécificité de liaison au PtdIns5P par rapport aux autres phosphoinositides.

Cependant, la force de cette étude réside dans le fait qu'ils ont réussi à créer des mutants dominants négatifs pour la liaison au PtdIns5P. En effet, la mutation de 3 résidus lysine K49, K51, and K53 va entraîner la réduction de l'efficacité de la liaison d'un facteur huit. Ces mutations pourraient ainsi suggérer un motif consensus pour le PtdIns5P.

Quant à la localisation de cette sonde, elle se retrouve au repos dans les cellules HT1080 issues de fibrosarcomes au niveau du noyau et de manière plus diffuse dans le cytoplasme. La localisation au niveau du noyau n'est pas très étonnante du fait que le domaine PHD est également connu pour se lier aux histones H3 de la chromatine et ceci de manière indépendante au PtdIns5P (Shi et al., 2006b). Cependant l'utilisation d'IpgD dans le système va permettre la relocalisation de cette sonde au niveau de la membrane plasmique, suggérant ainsi la présence d'un pool de PtdIns5P au niveau de la membrane plasmique, il reste cependant à souligner toujours la présence de marquage intense au niveau du noyau. L'hypothèse ainsi avancée est que le PtdIns5P pourrait induire le trafic d'ING-2 pour cibler des promoteurs au niveau du noyau et que la liaison aux histones permettrait la rétention d'ING-2 au niveau de ces promoteurs.

En tout état de cause en dehors de la découverte essentielle de ce domaine, qui deviendra d'ailleurs un outil emblématique pour l'étude du PtdIns5P, les auteurs ont montré que la modulation positive de cette interaction entre ING-2 et le PtdIns5P permet de stimuler la réponse p53-dépendante à un signal apoptotique (Gozani et al., 2003).

Un autre domaine PHD a plus récemment été identifié chez les plantes, en effet, la protéine Arabidopsis homolog of trithorax-1 ou ATX-1 va également se lier au PtdIns5P par l'intermédiaire d'un domaine PHD (Alvarez-Venegas et al., 2006). Ces protéines de la famille trithorax vont activer les gènes homéotiques qui vont réguler le développement chez les cellules animales au niveau embryonnaire. De manière générale, chez la plante ATX-1 va engendrer la régulation positive des gènes de structures de la plante en inhibant les répresseurs épigénétiques. Les auteurs suggèrent que le PtdIns5P réprimerait l'effet d'ATX-1 en délocalisant la protéine du noyau où elle effectue son action, au niveau du cytoplasme, provoquant ainsi l'action des répresseurs géniques.

Ainsi les domaines PHD semblent être des domaines candidats pour lier les phosphoinositides. Le domaine PHD est régulièrement utilisé en tant que contrôle positif pour la liaison au PtdIns5P (comme dans nos expériences). Il reste cependant un outil difficile d'utilisation étant donné sa localisation nucléaire. De plus, notre collaboration dans les expériences de résonance plasmonique de surface (SPR) ou de fat-blotting avec l'équipe du Dr. Pascale Zimmermann et du Pr. Bernard Payraastre, ne nous ont pas permis de trouver une liaison significative de ce domaine PHD ING-2 au PtdIns5P *in vitro*. D'ailleurs l'équipe du Pr. Divecha s'est lancée dans une étude poussée sur ce domaine ING-2, le caractérisant plutôt comme un interacteur des mono-PtdInsP. Il a ensuite entrepris le clonage extensif de ce domaine PHD réalisant 60 clones, avec uniquement neuf clones relevant pour le PtdIns5P, mais liant également les autres mono-PtdInsP (The 34th European Symposium on Hormones and Cell Regulation, 2009). L'ensemble des observations postérieures à cette étude sur ING-2 réalisées sur ce domaine permettent de conclure à une spécificité relative de ce domaine pour le PtdIns5P.

Les domaines PH liant le PtdIns5P

Plus récemment, le facteur de transcription TFIIF, par l'intermédiaire de son domaine PH a montré une liaison significative au PtdIns5P (Di Lello et al., 2005). Ce dernier est capable de réguler la transcription par l'intermédiaire de l'ARN polymérase II. Ce domaine PH se lie de manière bispécifique au PtdIns5P et PtdIns3P. De manière intéressante, le domaine d'activation transcriptionnel VP16 se lie au niveau de ce domaine PH pour provoquer l'initiation de la

transcription. On peut imaginer ici une compétition pour la liaison de ce domaine PH entre le PtdIns5P ou le PtdIns3P et VP16. Cette découverte renforce cependant, les découvertes au préalable réalisés sur les domaines PHD de ATX-1 et ING-2 que le PtdIns5P pourrait jouer un rôle essentiel au niveau du noyau, en régulant l'expression génique ou l'initiation de la transcription.

Nos études nous ont également permis d'identifier les domaines PH des molécules Dok comme des ligands convaincants du PtdIns5P, mais cette fois-ci plutôt au niveau cytoplasmique. Nous en discuterons dans la partie résultat.

Enfin, L'équipe du Pr. Payraastre, vient dernièrement d'identifier le domaine PH du facteur d'échange des petites protéines G Tiam-1, comme un ligand convaincant du PtdIns5P dans des expériences de Fat-blotting (Ramel et al. The 34th European Symposium on Hormones and Cell Regulation, 2009). Cette observation pourrait s'avérer essentielle pour expliquer un rôle du PtdIns5P dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, Tiam-1 étant une GEF de Rac1.

Fonctions du PtdIns5P

Rôle dans la voie de survie PI3K/AKT

Lors de l'invasion bactérienne par *Shigella flexneri* il a été observé une accumulation des produits de la PI3K (PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂ et PtdIns(3,4,5)P₃), dépendante de l'activité d'IpgD, suggérant un rôle du PtdIns5P ou de la perte de PtdIns(4,5)P₂ sur la voie PI3K (Niebuhr et al., 2002). Plus tard, il a été montré de manière directe que cette augmentation de PtdIns5P pouvait jouer un rôle essentiel dans l'activation de la voie PI3K IA/AKT dans les cellules épithéliales (Pendaries et al., 2006). De plus, il a été fait la même observation lors de l'infection par *Salmonella typhimurium* avec le même type de mécanisme impliquant un homologue d'IpgD, SigD ou SopB (Marcus et al., 2001; Steele-Mortimer et al., 2000).

De manière intéressante, la surexpression de la PIP4KII β , qui transforme le PtdIns5P spécifiquement en PtdIns(4,5)P₂, dans des cellules CHO-IR a démontré une inhibition de la voie PI3K-AKT associée à une chute du taux de PtdIns(3,4,5)P₃ en réponse à l'insuline (Carricaburu et al., 2003). Cependant l'activité intrinsèque de la PI3K en présence de cette enzyme ne semble pas affectée (Carricaburu et al., 2003). De plus si les taux de PtdIns(3,4,5)P₃ sont diminués, il semble que les taux de PtdIns(3,4)P₂ augmentent, ces observations suggérant un modèle orienté sur l'inhibition d'une PtdIns(3,4,5)P₃ phosphatase par le PtdIns5P. Ainsi, la PtdIns(3,4,5)P₃ 5-

phosphatase SHIP semble un candidat idéal étant donné l'accumulation de PtdIns(3,4)P₂ (Carricaburu et al., 2003).

Un modèle de souris déficientes en PIP4KIIβ a été développé. De manière intéressante, les souris montrent une hypersensibilité à l'insuline, une masse corporelle moins importante et une augmentation du signal d'activation d'AKT dans les tissus adipeux et musculaire (Lamia et al., 2004). Enfin une étude récente suggère que le taux de PtdIns5P « protège » AKT de la déphosphorylation. Ceci n'étant pas due à l'inhibition de PTEN, mais plutôt à l'inhibition de la phosphatase PP2A (Ramel et al., 2009). Cette étude étant la première observation pour déterminer comment le PtdIns5P pourrait agir sur la phosphorylation d'AKT et confirmant par là même le rôle de régulateur important du PtdIns5P sur AKT (Fig.19).

L'ensemble de ces observations, faisant du PtdIns5P un régulateur positif convaincant de la voie de survie PI3K/AKT, même si la régulation précise reste à confirmer.

Rôle dans l'organisation du cytosquelette

Une étude a suggéré que le PtdIns5P produit lors d'une stimulation par l'insuline, représente un intermédiaire clé du désassemblage des fibres de stress et de la translocation à la surface du récepteur au glucose GLUT4 dans des modèles cellulaires sensibles à l'insuline (Sbrissa et al., 2004). Cet effet apparait indépendant de la PI3K et est inhibé par la séquestration de PtdIns5P par l'expression du PHD d'ING-2 (Kim et al., 2003b). On a abordé également précédemment la réorganisation du cytosquelette suite à une invasion bactérienne, même s'il reste encore difficile à l'heure actuelle, de déterminer si le PtdIns5P joue un rôle direct, il semble cependant qu'il y ait une activation des petites protéines G Rac et Cdc42 en présence d'IpgD et d'une induction par des facteurs de croissance (Niebuhr et al., 2002). Des données non publiées du laboratoire du Pr. B. Payraastre identifient Rac1 comme une cible indirecte du PtdIns5P par la liaison au facteur d'échange Tiam1 et l'activation de Rac1 en découlant. D'ailleurs l'utilisation de PtdIns5P commercial dans leurs modèles cellulaires ont mené à des désassemblages de fibres d'actines, confirmant bien l'effet en lui-même du PtdIns5P sur le cytosquelette (Ramel et al. The 34th European Symposium on Hormones and Cell Regulation) (Fig.19).

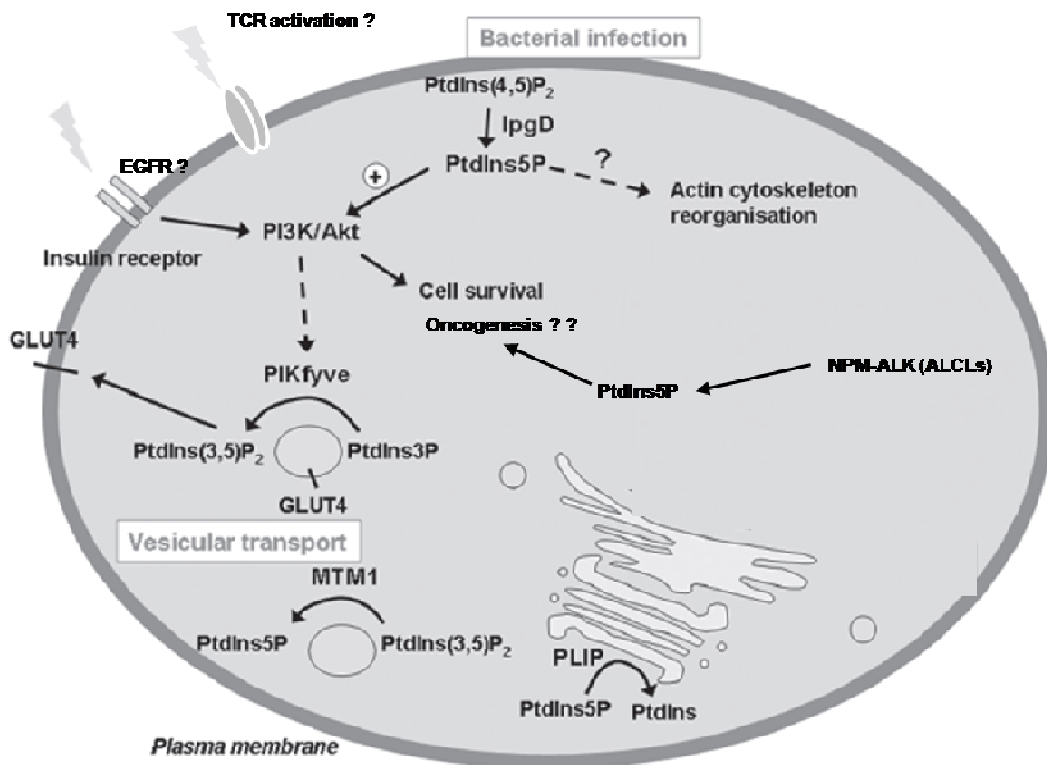


Fig.19. Fonctions du PtdIns5P au niveau cytosolique.

**Adapté de
Coronas S, Ramel D, Pendaries C,
Gaïts-Iacovoni F, Tronchère H, Payrastré B.
(Büchem.Soc Symp., 2007)**

Rôle dans le trafic vésiculaire

Bien qu'un rôle direct du PtdIns5P dans le trafic vésiculaire n'ait pas été clairement démontré, plusieurs études suggèrent un rôle de ce lipide. Dans les cellules CHO –IR, exprimant de manière stable le récepteur à l'insuline, ainsi que dans des adipocytes 3T3-L1, la production de PtdIns5P sous une stimulation par l'insuline va permettre la translocation de GLUT4 au niveau de la surface cellulaire (Sbrissa et al., 2004). La même observation est faite lorsque le PtdIns5P est microinjecté ou lorsque PIKfyve est surexprimée. La séquestration du PtdIns5P par le PHD d'ING-2 va inhiber la translocation des vésicules GLUT4, effet qui semble indépendant de la PI3K (Sbrissa et al., 2004). De plus, la surexpression de MTMR2 va engendrer une inhibition du trafic vésiculaire de l'EGFR des endosomes tardifs jusqu'aux lysosomes suite à une stimulation EGF. En effet, dans ces conditions, le trafic étant inhibé, il y a une large vacuolisation des endosomes. Il a

été suggéré que le PtdIns5P pourrait se lier à MTMR2 via son domaine putatif GRAM-PH, et que cette association pourrait être essentielle dans cette inhibition du trafic vésiculaire (Berger et al., 2003; Wishart and Dixon, 2002).

Enfin, lors de surexpression de la PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases eucaryote dans des cellules Hela, il y a une augmentation du taux de dégradation de l'EGFR (Ungewickell et al., 2005). Une étude plus récente a montré qu'un important régulateur du trafic de l'EGFR, SNX5 (sorting Nexin-5) dont la surexpression conduit à la dégradation de l'EGFR, pouvait se lier spécifiquement au PtdIns5P via son domaine PX (Liu et al., 2006). Enfin des données non publiées du laboratoire du Pr. B. Payraastre, font état d'une accumulation d'EGFR au niveau des endosomes tardifs suite à la transfection d'IpgD, tandis que l'expression d'EGFR en surface est abaissée (Ramel et al. The 34th European Symposium on Hormones and Cell Regulation). L'ensemble de ces arguments faisant du PtdIns5P une molécule pouvant jouer un rôle important dans le trafic vésiculaire, et notamment dans le recyclage de récepteurs (IR, EGFR...)

Dernièrement, une étude phylogénétique sur 32 enzymes eucaryotes métabolisant le PtdIns5P dans 39 génomes eucaryotes différents, ont permis de suggérer un rôle du PtdIns5P des compartiments endosomaux à la membrane plasmique (Lecompte et al., 2008). Cette étude rapproche le PtdIns5P des phosphoinositides important dans le trafic vésiculaire tels que le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P₂ présents sur les endosomes, mais également du PtdIns(4,5)P₂ membranaire, dont il serait un précurseur. L'hypothèse serait ainsi que le PtdIns5P se trouverait localisé au niveau des endosomes tardifs et à la membrane plasmique, ou peut être au niveau d'un compartiment intermédiaire important pour le trafic, tels que les exosomes ou les lysosomes (Lecompte et al., 2008)(Fig.19-20).

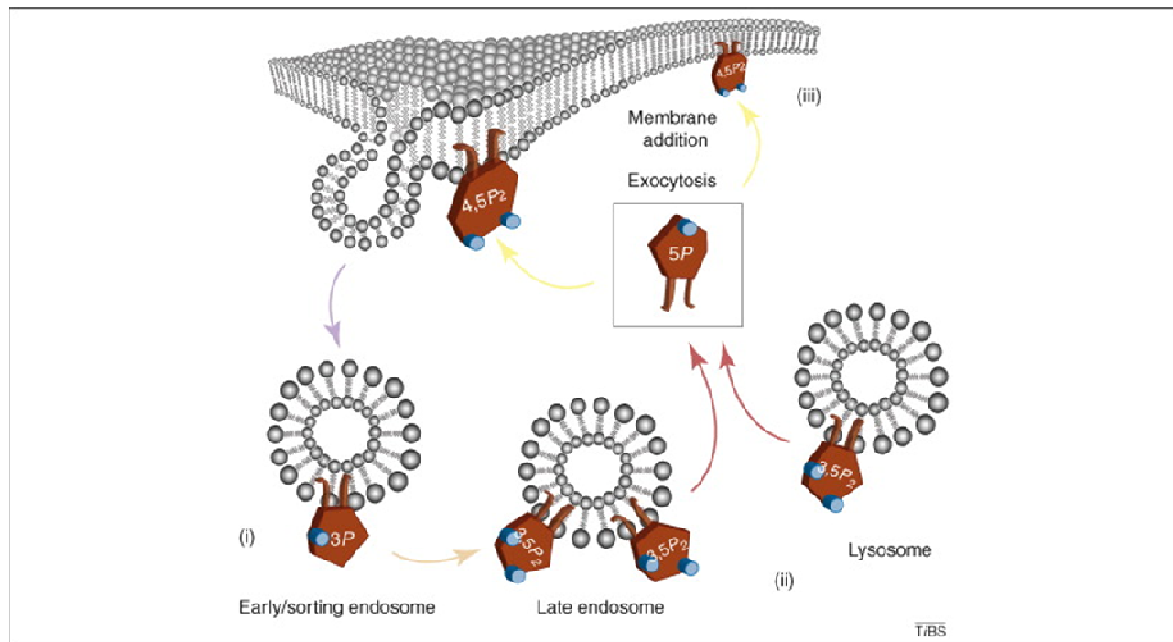


Fig.20. Régulation présumée du trafic vésiculaire par le PtdIns5P.

(i) le PtdIns3P est retrouvé au niveau des membranes des endosomes précoces; (ii) le PtdIns(3,5)P₂ se localiserait au niveau des endosomes tardifs et probablement des lysosomes; et (iii) le PtdIns(4,5)P₂ est présent à la membrane plasmique. L'hypothèse faite ici est que le PtdIns5P est présent au niveau des membranes des endosomes tardifs et au niveau de la membrane plasmique, ou éventuellement au niveau des membranes de vésicules intermédiaires entre ces deux structures. Ceci suggère ainsi que le PtdIns5P aurait un rôle dans l'exocytose depuis les endosomes tardifs ce qui aboutirait à l'addition au niveau de la membrane de pool de PtdIns5P.

**Lecompte O, Poch O, Laporte J.
(Trends Biochem Sci., 2008)**

Rôle dans l'oncogénèse ?

L'augmentation de PtdIns5P décrite lors du processus de lymphomagenèse lié à la kinase oncogénique NPM-ALK (ALCLs) (Coronas et al., 2008). Ainsi que le rôle positif observé du PtdIns5P sur la voie PI3K trouvée dérégulée dans de nombreux cancer (Pendaries et al., 2006), suggèrent fortement un rôle potentiel de ce lipide dans le processus d'oncogénèse (Fig.19).

PtdIns5P nucléaire

Apoptose en réponse au stress

Malgré le fait que l'on associe le PtdIns5P à la survie cellulaire via la phosphorylation d'AKT, il y a plusieurs études qui décrivent un rôle du PtdIns5P dans l'apoptose p53-dépendante. Notamment, Gozani et al. qui ont montré que le facteur nucléaire ING-2 est requis pour l'acétylation de p53 (Gozani et al., 2003). Cette acétylation va stabiliser p53 en empêchant sa dégradation protéosomale augmentant ainsi l'apoptose. De plus des ARN interférants d'ING-2 vont réduire la réponse cellulaire à l'apoptose (Gozani et al., 2003).

De plus, la transfection, de la PtdIns5P 4-kinase II β qui catalyse la formation de PtdIns(4,5)P₂ à partir de PtdIns5P conduit à une baisse de l'apoptose (Gozani et al., 2003). Les auteurs suggérant que le PtdIns5P forme un complexe avec ING-2, ce dernier jouant le rôle de cofacteur pour l'acétylation de p53. Cependant, une critique que l'on peut émettre à l'encontre de cette étude, est que le taux de PtdIns5P n'a pas été mesuré suite à la transfection de cette enzyme. De plus, quand les cellules sont soumises à des stress génotoxiques via l'utilisation d'étoposide ou de doxorubine, il se développe une apoptose p53-dépendante qui sera accentuée par l'expression inducible de la PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatase de Type I, entraînant une augmentation du taux de PtdIns5P intranucléaire (Ungewickell et al., 2005; Zou et al., 2007). L'acétylation de p53 étant ici mesurée confirmant les hypothèses suggérées. La PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatase de Type I est classiquement localisée au niveau des membranes lysosomales et des endosomes tardifs, les auteurs suggèrent ainsi que suite à un stress génotoxique l'enzyme se relocalise au niveau du noyau pour former du PtdIns5P. Le taux de PtdIns5P serait d'ailleurs régulé de manière opposée par la PI5P 4-kinase II β . ING-2 serait alors transloqué au niveau du noyau pour promouvoir l'acétylation de p53 et l'apoptose en découlant (Fig.21).

Ubiquitinylation et dégradation protéique

Une seule étude fait état d'un rôle du PtdIns5P dans l'ubiquitinylation et donc la régulation de l'enzyme PIPKII β ou PtdIns5P 4-Kinase II β (Bunce et al., 2008). L'utilisation d'un test double hybride a permis de démontrer que cette enzyme pouvait se lier à SPOP (speckle-type POZ domain protein), d'ailleurs en immunofluorescence les deux protéines co-localisent au niveau de régions nucléaires caractéristiques appelée « speckles » (régions punctiformes). SPOP interagit également

avec une ubiquitine ligase de la famille des culines au niveau de ces régions, le complexe est ainsi appelé Cul3-SPOP. Ce complexe va être activé suite à un stress génotoxique par la MAPK p38, et va aboutir à l'ubiquitinylation de la PtdIns5P 4-Kinase II β (Bunce et al., 2008). L'hypothèse faite ici par les auteurs, est que le PtdIns5P est capable de réguler cette ubiquitinylation, car l'utilisation d'un mutant inactif de PtdIns5P 4-Kinase II β favorise cet état.

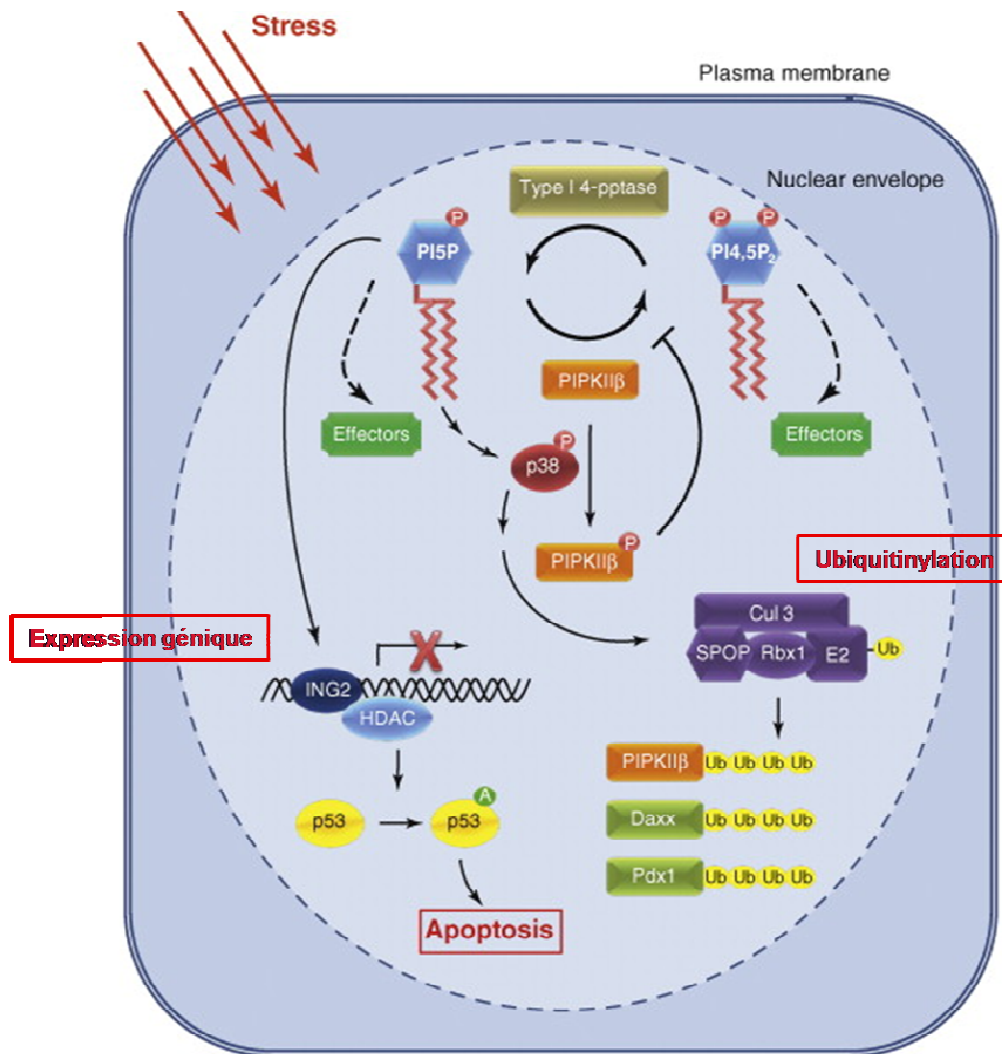


Fig.21. Fonctions du PtdIns5P au niveau nucléaire.

Barlow CA, Lishnam RS, Anderson RA.
(Trends Cell Biol., 2009)

Cette ubiquitinylation est d'ailleurs bloquée par un inhibiteur de p38 suggérant ainsi que le PtdIns5P pourrait réguler l'activité de p38 (Bunce et al., 2008). La critique que l'on peut faire ici : est qu'à aucun moment les auteurs ont contrôlé le taux effectif de PtdIns5P, ils n'ont démontré leurs

résultats que de manière indirecte. En tout état de cause cette ubiquitinylation permettrait la dégradation de la PtdIns5P 4-Kinase II β , et permettrait ainsi l'accumulation de PtdIns5P par un mécanisme p38 MAPK-dépendant (Fig.21).

Régulateur de l'expression génique

Comme on l'a vu précédemment, son association avec des facteurs interagissant avec la chromatine tels que ING-2 ou ATX-1, ont permis de suggérer un rôle du PtdIns5P dans le recrutement de ses facteurs soit au niveau du noyau (ING-2), soit au niveau du cytoplasme (ATX-1) pour réguler l'activité chromatinienne. De plus, L'association avec le facteur de transcription TFIIH, et le système original de régulation par compétition du PtdIns5P avec VP16, permet là aussi d'ajouter un argument quant au rôle du PtdIns5P dans l'expression génique. Les données de laboratoire du Pr. P. Majerus, démontrant pour la première fois qu'une enzyme est capable de former du PtdIns5P au niveau du noyau. L'ensemble de ces données, suggérant un rôle au niveau nucléaire qui pourrait s'avérer important pour le PtdIns5P. Reste à déterminer, si les variations de taux de PtdIns5P observés au niveau du cytoplasme et au niveau du compartiment nucléaire le sont de manière indépendante, ou s'il existe- un lien entre la variation de PtdIns5P suite à une activation d'un récepteur (EGFR, IR...) et une expression génique régulée par le PtdIns5P lors de la même stimulation (Fig.21).

Conclusions II.B

L'étude attentive des différents membres de la famille des phosphoinositides permet d'apprécier l'importance que ces molécules commencent à revêtir dans les voies de signalisation cellulaire. Même si pour les phosphoinositides les plus rares, ces résultats portent encore sur des sujets à controverse et doivent être précisés. Il ressort tout de même que cette famille touche un nombre toujours croissant de fonctions cellulaires. L'explosion des études sur les mono-PtdInsP ces dernières années ont d'ailleurs fini de convaincre les plus sceptiques sur l'utilité en tant que second messager de chacune de ces molécules.

Quant au PtdIns5P, malgré sa découverte relativement récente (1997), un nombre croissant d'études commencent à émerger sur ses nouvelles fonctions. Cependant, il reste toujours assez difficile de faire le tri entre toutes les informations qui arrivent. En effet, la plupart des outils identifiés, tels que les enzymes le synthétisant, s'avèrent être « peu fiables », j'entends par là que les variations de taux de PtdIns5P sont certes observés, mais il reste difficile de trancher sur le fait

que la surexpression *in vivo* ou l'utilisation enzymatique *in vitro* en excès ne va pas créer des substrats qui ne le sont pas dans un système cellulaire à l'état normal. Le fait que MTM1 ou PIKfyve possèdent plusieurs substrats ne nous permet pas de savoir si l'action de l'enzyme est due à la variation du taux de PtdIns5P ou à une variation due à l'activité sur l'autre substrat. Il reste ainsi, une seule enzyme, un seul outil permettant la synthèse exclusive du PtdIns5P à savoir IpgD. Les enzymes orthologues eucaryotes découverts récemment synthétisent certes du PtdIns5P, mais leur localisation au niveau des membranes lysosomales et des endosomes tardifs ne permettent pas d'expliquer les taux de PtdIns5P rapidement mesurés sous divers récepteurs, tels que la thrombine, l'EGFR ou l'IR. Ces dernières variations laissent à penser qu'il existe un pool membranaire de PtdIns5P, et on s'attend donc à trouver une enzyme au niveau des membranes cellulaires.

Enfin, au niveau des domaines de reconnaissances, il ressort également une fiabilité relative des divers outils proposés par le passé, en effet, le domaine PHD d'ING-2 qui s'avérait être « le » ligand spécifique de PtdIns5P a au fur et à mesure des diverses études, perdu de son importance. Il reste ainsi beaucoup de nouveaux outils à identifier et caractériser pour comprendre réellement l'impact du PtdIns5P sur les voies de signalisation cellulaires.

Nous nous sommes lancés dans l'étude des domaines PH des membres de la famille Dok, en espérant confirmer, la liaison de ce domaine au PtdIns(3,4,5)P₃ (Zhao et al., 2001). Cependant, les expériences *in vitro* ont suggéré le PtdIns5P comme ligand des domaines PH de Dok-1 et Dok-2 et c'est cela qui a lancé toute notre étude sur le lymphocyte T et le PtdIns5P. L'étude approfondie des autres domaines PH des autres membres de la famille Dok, nous a permis peut être de trouver une sonde convaincante et prometteuse quant au rôle des PtdIns5P, en tout cas au niveau du lymphocyte T. C'est ainsi, la recherche d'un nouvel outil pour la reconnaissance du PtdIns5P, par l'étude des domaines PH de la famille Dok, qui a motivé une grande partie de nos recherches.

Partie III :

Les membres de la famille Dok

Les protéines Dok sont des molécules adaptatrices, largement décrites dans les diverses voies de signalisation cellulaire comme substrats de protéines tyrosine kinases (PTKs) (Mashima et al., 2009). Cette famille, qui compte sept membres (Dok-1 à Dok-7), est située en aval des récepteurs à tyrosines kinases (RTKs). Elle appartient à la super famille des molécules adaptatrices ou protéines d'ancrage (dockers proteins) comprenant également les familles IRS, SNT/FRS et Gab. Cette classification est due en grande partie à la similarité de séquence de leur domaine PTB (phospho-tyrosine binding domain). Les membres de la famille semblent agir comme des inhibiteurs des grandes voies de signalisation (PTKs, Ras, PLC/Ca²⁺). Des analyses phylogénétiques réalisées précédemment sur les domaines PH et PTB ont permis de discriminer deux groupes au sein de la famille (Favre et al., 2003) :

- Le groupe A composé des Dok-1, Dok-2 et Dok-3;
- Le groupe B composé de Dok-4 et Dok-5.

L'analyse de l'expression tissulaire et cellulaire des Dok-1 à Dok-5 montrent que les membres du groupe A sont présents dans les cellules hématopoïétiques alors que les membres du groupe B sont plutôt confinés au cerveau (Crowder et al., 2004; Grimm et al., 2001). Les deux derniers membres Dok-6 et Dok-7 ont été identifiés récemment (Crowder et al., 2004; Okada et al., 2006). Des données dans le laboratoire (non-publiées) nous permettent de replacer Dok-6 dans le groupe B, mais d'exclure Dok-7 de la famille (Rodriguez, Guittard et al. données non publiées). Malgré cette expression différentielle, les membres de la famille Dok possèdent la même organisation structurale.

Structure des membres de la famille Dok

Les protéines de la famille Dok partagent le même type de structure que les protéines de la famille IRS (Insulin receptor substrate) et Gab, avec en partie amino-terminale un domaine PH (pleckstrin Homology), qui fera plus particulièrement l'objet de mon intérêt par la suite, suivi en partie centrale d'un domaine PTB (Phospho tyrosine binding domain). Enfin, la partie carboxy-terminale de ces protéines contient plusieurs tyrosines phosphorylables ainsi que des motifs proline-rich.

A l'origine, la protéine Dok-1 (p62^{dok}) a été identifiée comme un substrat majeur de l'oncoprotéine Bcr-Abl retrouvée communément dans des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et présentant une activité tyrosine kinase intense capable de phosphoryler Dok-1 sur sa partie carboxy-terminale (Carpino et al., 1997). Par la suite les autres membres de la famille ont été identifiés

successivement, avec tout d'abord, Dok-2 (p56^{dok} ou FRIP ou Dok-R) (Carpino et al., 1997; Di Cristofano et al., 1998a; Jones and Dumont, 1999; Lock et al., 1999; Nelms et al., 1998) et Dok-3 (Dok-L) (Cong et al., 1999; Lemay et al., 2000), clonées grâce à leur caractéristique structurale (PH-PTB). Ensuite, par homologie de séquences avec les trois premiers membres (DKH : Dok Homology) Dok-4 (IRS-5) et Dok-5 (IRS-6) ont été isolés chez la souris. (Grimm et al., 2001). Enfin, plus récemment, Dok-6 a été identifié par homologie de séquence avec Dok-4 et Dok-5 (Crowder et al., 2004) et s'exprime également au niveau du système nerveux central (SNC). Enfin, récemment, Dok-7 a été clonée par homologie de séquences avec l'ensemble des membres de la famille, son expression est restreinte aux muscles squelettiques et au niveau du cœur (Okada et al., 2006) (Fig.22).

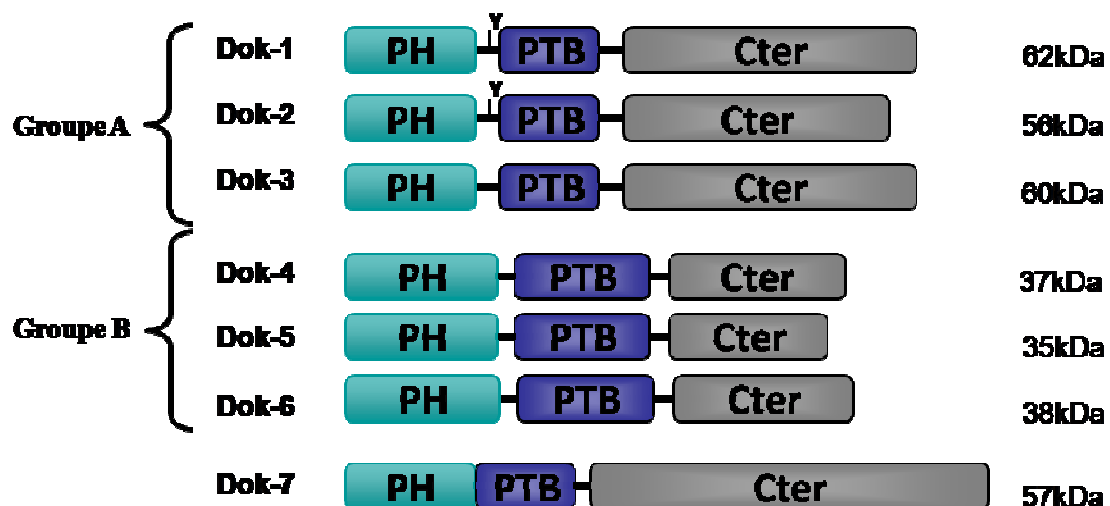


Fig 22. Structure des membres de la famille Dok (Downstream Of Kinases). Les poids moléculaires apparents de chaque membre est indiqué sur la droite. Les groupes A et B représentent des groupes phylogénétiquement distincts (Favre C. et al GAI 2003).

Pour la suite de mon exposé, je me focaliserai sur les membres exprimés au niveau du lymphocyte T, à savoir Dok-1, 2, 4 et 5 (Favre et al., 2003) (Fig.23). Du fait du peu d'études réalisées sur Dok-4 et Dok-5 et de leur similitude de séquence, je traiterai de ces deux protéines en même temps. Enfin, Les protéines Dok-1 et Dok-2 sont quant à elles largement étudiées dans les voies de signalisation, je me focaliserai donc plus précisément sur elles.

Dok-4 et Dok-5

Il n'y a que peu d'études qui se sont penchées sur Dok-4 et Dok-5. Pour notre part, nous nous sommes surtout intéressés au PH de Dok-4 et Dok-5 dans nos études vis-à-vis des lipides. Cependant, il est intéressant de voir ces protéines apparaître comme des molécules activatrices ou inhibitrices des voies de signalisation suivant le modèle cellulaire étudié.

Expression	Dok 1	Dok 2	Dok 3	Dok 4	Dok 5	Dok 6	Dok 7
Cœur	+	+	-	++	+	-	-
Rate	+	-	+	+	-	-	-
Poumons	-	+	+	++	-	-	-
Moelle osseuse	T,B, Mono	T, Mono	B, Mono	T,B Mono	T?	-	-
Muscle squelettique	-	-	-	+	+	-	+
Système nerveux central	-	-	-	+	+	++	++

Fig.23. Expression tissulaire des membres de la famille Dok.
T: Lymphocyte T; B: Lymphocyte B; Mono: Monocytes. Les signes +/- représentent la quantité relative de chaque membre.

Dok-4 est exprimée de manière ubiquitaire, tandis que l'expression de Dok-5 est plutôt restreinte au niveau du système nerveux central (Bedirian et al., 2004), mais notre laboratoire a démontré qu'il pouvait s'exprimer au niveau du lymphocyte T activé, il existe aussi une expression au niveau cardiaque (Favre et al., 2003). Dans les cellules non hématopoïétiques, Dok-4 apparaît comme un substrat des récepteurs à tyrosine kinase Ret ou du récepteur à l'insuline (IR), mais également de la PTK Src (Grimm et al., 2001; Lemay et al., 2000). Des études fonctionnelles ont conduit à des résultats différentiels, avec deux études rapportant que Dok-4 augmentait l'activation des MAPK, ERK suite à une stimulation des RTKs, Ret et IR (Grimm et al., 2001; Lemay et al., 2000), tandis qu'une autre étude démontre un effet contraire sur Elk, un substrat de ERK (Bedirian et al., 2004). Sous le récepteur Ret, Dok-4 permettra la croissance neuronale en activant la petite protéine G Rap-1. Enfin, notre laboratoire s'est intéressé à cette molécule au niveau du lymphocyte

T. Dok-4 est ainsi identifié comme un substrat des PTKs durant l'activation lymphocytaire T. De plus, Dok-4 va s'accumuler dans un compartiment vésiculaire qui sera recruté à proximité du MTOC (centre organisateur des microtubules) durant l'activation T. D'ailleurs le domaine PH est important, d'une part pour sa localisation, mais également pour sa fonction inhibitrice de l'activité du promoteur IL-2 et de la phosphorylation de ERK suite à l'engagement du TCR (Gerard et al., 2009).

Dok-5 quant à lui, joue un rôle positif dans l'activation des MAPK et peut interagir avec les récepteur de facteurs de croissances, les neurotrophines TrkB et TrkC (Shi et al., 2006a). D'autres études l'ont également montré comme substrat de Ret, et de manière intéressante, il engendrerait la croissance neuronale (Grimm et al., 2001).

L'ensemble de ces résultats, suggèrent pour Dok-4 et Dok-5 un rôle régulateur positif au niveau du système nerveux central, notamment, dans la croissance neuronale. Dans le laboratoire, nous avons permis démontrer que Dok-4 pouvait être un acteur des voies de signalisation lymphocytaire T (Gerard et al., 2009). En tout état de cause, les fonctions de ces deux membres récemment identifiés commencent à peine à être élucidé (Fig.25).

Dok-1 et Dok-2

Le domaine PH De Dok-1 et Dok-2

Les domaines PH des membres de la famille Dok s'organisent de la même manière, correspondant à la structure canonique d'un domaine PH. Très peu d'études se sont intéressées à la spécificité d'interaction et le rôle du domaine PH de ces molécules adaptatrices. Aucune donnée de cristallographie ou de modélisation de la structure tertiaire de ces domaines n'est publiée.

Cependant, quelques données sont disponibles sur le domaine PH de Dok-1. Dans plusieurs types cellulaires, Dok-1 se retrouve à l'état basal, dans le cytosol et à la membrane plasmique (Liang et al., 2002; Nemorin et al., 2001; Noguchi et al., 1999; Zhao et al., 2001), et son recrutement à la membrane plasmique est augmenté suite à certains stimuli. Par exemple, la stimulation du récepteur au PDGF (PDGF-R) par son ligand induit une relocalisation de Dok-1 à la membrane plasmique dans les cellules Rat1 (Zhao et al., 2001). Néanmoins, ce phénomène n'est pas être retrouvé dans tous les systèmes. Par exemple, la stimulation de c-Kit par son ligand (Stem Cell Factor) dans les cellules Mo7 n'induit pas de relocalisation massive de Dok-1 à la membrane plasmique (van Dijk et al., 2000). Par contre, la phosphorylation sur résidu tyrosine de Dok-1 se retrouverait uniquement à la membrane plasmique, au moins dans le cas d'une activation des cellules T par la molécule d'adhérence CD2 (Nemorin et al., 2001). Ce phénomène dépend du système puisque la phosphorylation de Dok-1 induite par la stimulation de CD2 dans les cellules Jurkat est présente aussi bien à la membrane plasmique que dans le cytoplasme (Nemorin et al., 2001). Malgré ces différences de résultats, toutes les études ayant analysé la localisation d'un mutant de Dok-1 dépourvu de son domaine PH ont conclu que le domaine PH de Dok-1 est nécessaire à la localisation de ce dernier dans une fraction membranaire (Liang et al., 2002; Nemorin et al., 2001; Zhao et al., 2001), en accord avec le rôle putatif d'un domaine PH qui est de localiser une protéine dans un compartiment subcellulaire précis.

Il a été montré que l'activité de la PI3K est nécessaire au recrutement de Dok-1 à la membrane plasmique, puisqu'un inhibiteur de la PI3K (wortmannin) inhibe le recrutement de Dok-1 à la membrane plasmique suite à la stimulation de PDGF-R dans les cellules Rat-1 (Zhao et al., 2001). Ces données corrélerent avec une interaction du domaine PH de Dok-1 avec les PtdIns(3,4,5)P₃ présents à la membrane plasmique. Plusieurs études ont montré l'importance de l'activité PI3K pour la phosphorylation de Dok-1. La mutation de Ret, multiple endocrine neoplasia type 2B (MEN

2B), induit une hyperactivation de la PI3Ki ainsi qu'une hyperphosphorylation PI3K-dépendante de Dok-1 (Hosooka et al., 2001). Enfin, la phosphorylation sur résidus tyrosine de Dok-1 induite par la stimulation de c-Kit dans les cellules Mo7, ainsi que son association à Tec et Lyn, est également PI3K-dépendante (van Dijk et al., 2000).

Il semble donc y avoir un lien plus ou moins direct entre la production de PtdIns(3,4,5)P₃ et la phosphorylation et/ou le recrutement de Dok-1. Néanmoins, la mise en jeu de la PI3Kinase ne semble pas être un mécanisme général de régulation de Dok-1, puisque l'engagement de la molécule de costimulation CD28, muté sur le site YxxM de fixation de la PI3K, est toujours capable d'induire la phosphorylation sur résidus tyrosine de Dok-1 (Klasen et al., 1998). Néanmoins, ces différentes données suggèrent que le domaine PH permet une régulation fine de Dok-1, puisqu'il est impliqué, nécessaire même, à son recrutement et sa phosphorylation sur résidu tyrosine, et que ces deux étapes semblent nécessaires à sa fonction (Fig.24).

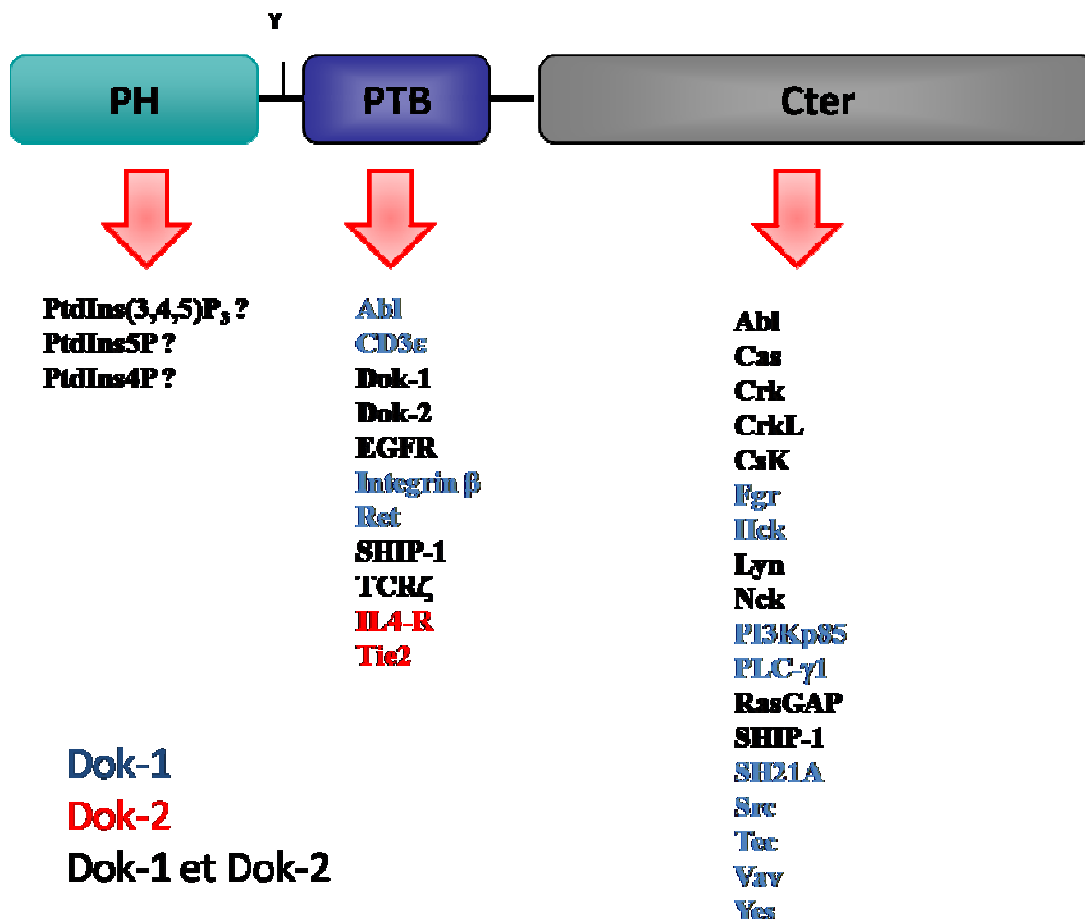


Fig 24. Nature des partenaires des molécules adaptatrices, Dok-1 et Dok-2. La couleur bleue représente les ligands liant exclusivement Dok-1 et en rouge Dok-2. Tandis que le noir montre la liaison de Dok-1 et Dok-2.

Les domaines PTB de Dok-1 et Dok-2

Le domaine PTB reconnaît généralement une tyrosine qui peut être phosphorylée ou non et présente dans une séquence consensus NPxY (où x représente un acide aminé quelconque). Le domaine PTB de Dok-1 reconnaît quant à lui des motifs consensus de type NxLpY (Songyang et al., 2001), mais peut également se lier à des motifs NPxpY (Dunant et al., 2000; Latour et al., 2001; Sattler et al., 1999; Zhang et al., 2004). Il est composé d'environ 200 acides aminés et est formé de 7 brins β et de 3 hélices α qui forment un sandwich de 3 et 4 feuillets avec une hélice carboxy-terminale.

Un nombre limité de protéines se lient au domaine PTB de Dok-1 et Dok-2. Dok-1 et Dok-2 peuvent s'oligomériser via leur domaine PTB, de manière homo ou hétéro-typique, celle-ci dépendant d'une tyrosine phosphorylée ou non, entre le domaine PH et le domaine PTB (Boulay et al., 2005). D'ailleurs cette oligomérisation semble essentielle à la fonction de Dok-1 et Dok-2 (Boulay et al., 2005; Songyang et al., 2001). Une étude récente, fait état d'une liaison de ce domaine PTB de Dok-1 et Dok-2 aux motifs ITAMs phosphorylés des chaînes ϵ et ζ CD3 du TCR par des expériences d'immunoprécipitation (Yasuda et al., 2007). Les auteurs suggèrent d'ailleurs que l'inhibition due à Dok-1 et Dok-2 lors de l'activation lymphocytaire T, serait dû au fait de cette liaison qui viendrait entrer en compétition avec les domaines SH2 de ZAP-70 pour la liaison de ces motifs ITAM phosphorylés (Yasuda et al., 2007). Cette observation semble somme toute étonnante, car le tandem SH2 de ZAP-70 présente une affinité très forte pour les motifs phospho-ITAMs (contrairement au domaine PTB des molécules Dok-1 et Dok-2). De plus, plusieurs études ont fait état de l'importance de la liaison du domaine PTB de Dok-1 et Dok-2 à la lipide 5-phosphatase, SHIP-1 (Dong et al., 2006; Latour et al., 2001; Tamir et al., 2000), c'est d'ailleurs cette liaison qui est proposée comme essentielle pour le recrutement de Dok-1 et Dok-2 au niveau du TCR, mais de manière indirecte. D'ailleurs, la déplétion de SHIP-1 durant une activation lymphocytaire T empêcherait la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 suggérant ainsi que Dok-1 et Dok-2 se trouvent en aval de ZAP-70 et LAT, plutôt qu'en amont lors d'une activation lymphocytaire T (Dong et al., 2006).

Le domaine PTB de Dok-1 est également capable de se lier à la partie juxtamembranaire de certains RTKs comme Ret (Murakami et al., 2002) ou EGFR (Zhang et al., 2004), et aux intégrines $\alpha\beta3$ (Calderwood et al., 2003). Le domaine PTB de Dok-2 s'associe également à la partie juxtamembranaire de RTKs comme Tek/Tie2 (Jones et al., 1999b), EGFR (Jones and Dumont,

1999; Master et al., 2003) ou à des récepteurs cytokiniens tels que le récepteur de l'IL-4 (Nelms et al., 1998).

Les protéines Doks pourraient agir par compétition avec une autre molécule pour la liaison au niveau du récepteur. Dans un autre modèle, le domaine PTB serait un domaine régulateur, dans le sens où il est simplement impliqué dans le recrutement de ces molécules au niveau du récepteur. Le fait que la phosphorylation des molécules Doks implique souvent l'interaction entre Dok et ces récepteurs soutiendrait cette hypothèse. Il ne faut pas oublier également le domaine PH pour le recrutement au niveau de la membrane plasmique de Dok-1 et Dok-2 qui pourraient par la suite jouer leur rôle régulateur notamment la liaison aux divers partenaires via leur domaine PTB (Fig.24).

Partie carboxy-terminale et fonctions de Dok-1 et Dok-2

Les parties carboxy-terminales des membres de la famille Dok correspondent à la partie la moins conservée entre les 7 membres de cette famille. Cependant, Dok-1 et Dok-2 présentent de fortes similitudes dans cette partie contenant différentes tyrosines contenues dans un motif consensus permettant la liaison avec un domaine SH2 (Songyang et al., 2001), ainsi que plusieurs motifs « *poly-proline* » permettant la liaison avec un domaine SH3 (Rickles et al., 1994). L'ensemble de ces sites « accepteurs » de protéines va permettre de réguler diverses fonctions essentielles au niveau de voies de signalisation cellulaires.

Régulation négative de la voie Ras/MAPK

Les molécules Dok-1 et Dok-2 présentent des motifs YxxP phosphorylable capable de reconnaître le domaine SH2 du facteur d'échange GTP/GDP de la petite protéine GTPase Ras, p120^{RasGAP} (Yamanashi and Baltimore, 1997). Ainsi cette association Dok/RasGAP, va permettre le recrutement de RasGAP au niveau des RTKs activés, permettant la conversion de Ras-GTP (forme active) en Ras-GDP (forme inactive), et ainsi inactiver la voie ERK/MAPK (Campbell et al., 1998). Dok-1 et Dok-2 sont largement identifiés comme des régulateurs négatifs de la voie Ras/MAPK de par leur association avec la protéine RasGAP empêchant l'activation de la protéine Ras (Campbell et al., 1998), ceci sous divers récepteurs exprimés sur des cellules non hématopoïétiques tels que c-Ret (Murakami et al., 2002) ou l'EGFR (Zhang et al., 2004), mais également sous divers récepteurs de cellules lymphoïdes tels que la molécule CD2 (Nemorin et al., 2001), le BCR via l'association de Dok-1 par l'intermédiaire de SHIP-1 sous le récepteur FcγRIIB

(van Dijk et al., 2000), mais aussi les récepteurs de cellules myéloïdes tels que FcεRI (macrophages) (Hiragun et al., 2005) ou TLR4 (cellules dendritiques) (Shinohara et al., 2005) (Fig.25).

	Fonction	Dok 1	Dok 2	Dok 4	Dok 5
Cellules non-hématopoïétiques	Contrôle de la voie Ras-MAPK	Rôle négatif (c-RET)	Rôle négatif (EGF-R)	Rôle positif ? (IR, Ret) Rôle négatif ? (Ret)	Rôle positif (TrkB, TrkC)
	Contrôle de l'adhésion/migration	Rôle positif (IR, intégrines)	Rôle positif (Tek/Tie-2)		
	Croissance des neurites			Rôle positif (c-Ret)	Rôle positif (c-Ret)
	Prolifération	Rôle négatif	Rôle négatif		
Cellules hématopoïétiques	Contrôle de la voie Ras-MAPK	Rôle négatif -FcεRI (macrophages), -TLR4 (cellules dendritiques) -BCR (FcγRIIB) (LB) -TCR, CD2, CD28, (LT)	Rôle négatif -FcεRI (macrophages), -TLR4 (cellules dendritiques) -TCR, CD2 (LT)	Rôle négatif -TCR (LT)	
	Contrôle de l'activité du promoteur IL-2	Rôle négatif (IT)	Rôle négatif (IT)	Rôle négatif -TCR (IT)	
	Prolifération	Rôle négatif -Cellules myéloïdes: IL-3, SCF, M-CSF et GM-CSF -LT: TCR. Rôle positif ? (IL-4R) (SDF-1α: chimiotactisme)	Rôle négatif -Cellules myéloïdes: IL-3, SCF, M-CSF et GM-CSF -LT: TCR. Rôle positif ? (IL-4R)	Rôle négatif -TCR (LT)	

Fig.25. Fonctions des membres de la famille Dok.

Régulation de protéines Tyrosine Kinases

Les protéines Dok-1 et Dok-2 seront également capables de se lier à de nombreuses PTKs. Dok-1 et Dok-2 ont initialement été identifiés comme des substrats de l'oncoprotéine Bcr-Abl (Carpino et al., 1997; Di Cristofano et al., 1998a). Plusieurs études ont montré que Dok-1 et Dok-2 se lient à Abl et sa chimère pro-oncogénique Bcr-Abl, via leurs domaines SH2 ou SH3 (Master et al., 2003; van Dijk et al., 2000). D'ailleurs cette fixation permettra l'augmentation de la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2. D'autres PTKs s'associent à Dok-1 et Dok-2, c'est le cas des membres des familles Tec et Src qui peuvent également phosphoryler Dok-1 et Dok-2 (Nemorin and Duplay, 2000; Shah and Shokat, 2002; van Dijk et al., 2000; Yoshida et al., 2000). De manière intéressante, il existe une sorte de rétrocontrôle négatif de l'activité de ces kinases lors de leur fixation aux molécules Dok qui va permettre l'inhibition de l'activité PTK de Tec ou Src (Gerard et al., 2004 ; Shah and Shokat, 2002). D'autre part, la liaison de la PTK Csk avec Dok-1 phosphorylé permet de rapprocher Csk de ses substrats majeurs que sont les Src kinases et d'inactiver les Src kinases par phosphorylation de leur résidu tyrosine carboxy-terminal (Zhao et al., 2006). L'interaction des membres de la famille Dok avec des PTKs est généralement perçue comme nécessaire pour leur phosphorylation, plusieurs études rapportant une régulation négative en retour de cette phosphorylation créant ainsi une sorte de boucle d'activation/inhibition, où les protéines Dok-1 et Dok-2 pourraient jouer un rôle de frein pour éviter l'activation anarchique de ces kinases.

Régulation du cytosquelette

La partie carboxy-terminale de Dok-1 et Dok-2 a également été impliquée dans leur interaction avec différentes molécules adaptatrices. Dok-1 et Dok-2 sont capables d'interagir avec les molécules Nck (Noguchi et al., 1999; Wick et al., 2001; Woodring et al., 2004; Zhao et al., 2001)(Dok-1) (Jones and Dumont, 1999; Jones et al., 1999b; Lock et al., 1999)(Dok-2) et Crk (Abramson et al., 2003). Crk doit certainement interagir avec les tyrosines contenues dans le motif YxxP. Dok-1 et Dok-2 interagissent avec le domaine SH2 de Nck via la tyrosine en position 362 (pour Dok-1) (Wick et al., 2001) ou en position 351 (pour Dok-2) (Lock et al., 1999). Dok-1 est également capable d'interagir avec CrkL (Martelli et al., 2001). Ces trois molécules font partie d'une superfamille de molécules adaptatrices constituées de domaines SH2 et SH3 ; un de leur rôle prépondérant correspond à leur capacité à promouvoir le réseau d'actine (Buday et al., 2002 ; Feller, 2001). L'interaction entre les membres de la famille Dok et des adaptateurs régulant la formation du cytosquelette suggère un rôle pour les membres de la famille Dok dans ce phénomène. Il a été

suggéré un rôle positif dans la migration cellulaire avec les molécules Doks se retrouvent associées à Nck (Jones et al., 1999b; Woodring et al., 2001). On peut imaginer que Dok-1 constitue une plateforme de recrutement pour adresser spécifiquement Nck au lieu de son action. D'ailleurs une étude intéressante fait état d'une surexpression de Dok-1 dans des cellules CHO-IR qui induit une augmentation de la migration en réponse à la fibronectine ou l'insuline. Cette stimulation nécessite la présence du domaine PH ainsi que la liaison à Nck pour fonctionner (Noguchi et al., 1999) (Fig.25).

Régulation du métabolisme lipidique et de la calcémie

Enfin, il a été montré des associations de Dok-1 et Dok-2 avec des enzymes régulant le métabolisme des lipides tels que PLC γ -1, la sous unité p85 de la PI3K ou la phosphatase SHIP-1 via leur domaine SH2 (van Dijk et al., 2000). De manière étonnante, il a été montré que l'association entre Dok-1 et SHIP-1 pouvait s'effectuer d'une part par le domaine PTB de Dok-1, mais d'autre part par le domaine SH2 de SHIP-1 sur les tyrosines phosphorylées de Dok-1, les deux interactions apparaissent d'ailleurs importantes pour l'activité du complexe (Dunant et al., 2000). Ces données suggèrent un rôle éventuel de Dok-1 et Dok-2 dans la régulation lipidique. Mais également la liaison de Dok-1 avec la PLC γ -1 observée dans les lymphocytes T (Harriague et al., 2000; Hubert et al., 1993) et les macrophages (Ott et al., 2002), suggère un rôle dans la régulation de la voie calcique. En effet, la surexpression de Dok-1 en plus d'inhiber la phosphorylation de la PLC γ -1, va freiner la mobilisation de calcium intracellulaire (Nemorin et al., 2001).

Les membres de la famille Dok sont capables d'interagir avec une quantité importante de molécules. Les domaines PH et PTB sont à l'heure actuelle plutôt impliqués dans des processus permettant le recrutement des molécules Dok à proximité de leur site d'action. La partie carboxy-terminale, par contre, semble impliquée dans le recrutement de différentes protéines à proximité de leur substrat. L'étude de la structure des membres de la famille Dok, et surtout l'identification de leurs partenaires a permis de comprendre plus précisément leur fonction dans différents processus cellulaires.

Dok-1 et Dok-2, molécules suppresseurs de tumeurs ?

Dok-1 et Dok-2 ont initialement été identifiés comme des substrats de l'oncoprotéine Bcr-Abl (Carpino et al., 1997; Di Cristofano et al., 1998a). En effet, les molécules Dok-1 et Dok-2 ont

ainsi été identifiés à l'origine comme des molécules hyperphosphorylées dans les leucémies myéloïdes chroniques (CML) (Carpino et al., 1997; Di Cristofano et al., 1998a). Il est admis que la plupart des patients atteints de CML possèdent une translocation t(9 :22) aboutissant à la génération d'une kinase chimérique constitutivement active Bcr-Abl. Le croisement entre des souris déficientes pour les gènes *dok-1* et *dok-2* avec des souris transgéniques pour la construction chimère Bcr-Abl, ont démontré une accélération dans la phase de crise blastique de la LMC, résultant ainsi en une mort plus rapide de ces souris (Niki et al., 2004; Yasuda et al., 2004). Cette observation suggérant un rôle tumeur suppresseur des molécules Dok-1 et Dok-2 dans ce type de pathologie. Ces molécules réguleraient Bcr-Abl de manière négative (Niki et al., 2004; Yasuda et al., 2004).

De plus, ces souris doublement invalidées pour les gènes *dok-1* et *dok-2* (Dok DKO) développent un syndrome myéloprolifératif assimilé aux leucémies myélo-monocytaires chroniques (LMMC), impliquant une splénomégalie ainsi qu'une hyperplasie des progéniteurs de granulocytes et des macrophages, ayant un potentiel leucémique (Niki et al., 2004; Yasuda et al., 2004). D'ailleurs de manière intéressante, les cellules myéloïdes de ces souris présentent une réponse proliférative plus importante en réponse à des cytokines (Yasuda et al., 2004), mais présentent également une augmentation de l'activation des MAPK Erk-1/Erk-2 (Niki et al., 2004). Ces dernières observations suggérant que Dok-1 et Dok-2 semblent jouer un rôle essentiel dans le contrôle de l'homéostasie du compartiment hématopoïétique et sans doute en tant que suppresseur de tumeur.

Dok-1 a également été impliqué dans d'autres types de leucémies. Le gène *dok-1* est présent sur le chromosome 2p13 chez l'homme. Cette région est impliquée dans la translocation t(2 :14) associée aux leucémies lymphoïdes chroniques (CLL) et aux leucémies lymphoïdes B aiguës (B-ALL). La présence du gène *dok-1* à proximité de ce point de translocation pourrait entraîner une dérégulation de l'expression de Dok1, ou de sa fonction (Nelms et al., 1998). Quant à lui *dok-2* est présent sur le chromosome 14 chez la souris, et lié au locus *hr* (*hairless*). Les souris homozygotes pour l'allèle *hairless* (locus *hairless* muté) (*hr/hr*) sont très susceptibles aux leucémies lymphocytaires et présentent une lymphoadénopathie ainsi qu'une splénomégalie (Cachon-Gonzalez et al., 1994).

De plus des tests *in vitro* de colonies en agar de cellules NIH-3T3, montrent que Dok-1 inhibe la transformation cellulaire induite par la PTK Src (Songyang Z. et al., JBC, 2001).

L'ensemble de ces observations suggère que Dok-1 et Dok-2 pourraient être de bon candidats en tant que suppresseur de tumeur et laissent à penser qu'une mutation génique ou une délétion

génique de *dok-1* et/ou *dok-2* pourrait aboutir à des phénomènes de cancérisation dans le système hématopoïétique.

Fonctions de Dok-1 et Dok-2 dans le lymphocyte T

Comme évoqué précédemment, Dok-1 et Dok-2 sont principalement exprimés au niveau des lymphocytes T. L'ensemble des fonctions décrites de Dok-1 et Dok-2, sur les voies de signalisations cellulaires, vont avoir un impact majeur sur les compartiments hématopoïétiques en général, mais sur le lymphocyte T en particulier, sur lequel je vais me focaliser ici (Fig.6).

Dok-1 et Dok-2 sont retrouvées phosphorylées suite à une stimulation du TCR, cet état de phosphorylation qui est d'ailleurs associée à sa fonction inhibitrice (Dong et al., 2006). De plus, les auteurs montrent que Dok-1 et Dok-2 font partie d'un complexe multimoléculaire, formé de SHIP-1, Grb2 et LAT. De manière intéressante, la phosphorylation de Dok-2 sous le TCR semble dépendante de l'expression de LAT et SHIP-1, suggérant ainsi que LAT pourrait s'associer au complexe multimoléculaire de Dok, en s'associant à SHIP-1 (Dong et al., 2006). Il avait déjà été précédemment suggéré un complexe inhibiteur Dok-SHIP-1-Grb2 (Damen et al., 1996). Enfin, de manière plus étonnante, ce complexe permettrait l'inhibition de kinases essentielles durant l'activation T, telles que ZAP-70 et AKT (Dong et al., 2006). Cette étude est la première à se focaliser sur la phosphorylation de Dok TCR-induite. Par le passé, Dok-1 et Dok-2 ont surtout été étudiés sous des molécules d'adhérence telles que CD2 (Boulay et al., 2005 ; Harriague et al., 2000; Nemorin and Duplay, 2000 ; Nemorin et al., 2001) ou CD28 (Klasen et al., 1998 ; Michel et al., 2001). On pensait d'ailleurs, que le signal inhibiteur observé pour Dok-1 et Dok-2 lors d'une réponse lymphocytaire T suite à l'engagement avec une APC était plus dû à l'activité de ces corécepteurs que du TCR lui-même.

Au niveau fonctionnel, les souris déplétées pour les deux gènes *dok-1* et *dok-2* (DKO) ont montré une réponse proliférative plus importante ainsi qu'une sécrétion cytokinique plus intense suite à une stimulation du TCR (Yasuda et al., 2007). De plus, les cellules CD4⁺ issues de souris déplétées en Dok-1 ou Dok-2 ont une prolifération plus élevée ainsi qu'une production d'IL-2 plus importante (Yasuda et al., 2007). Enfin, la surexpression de Dok-1 ou Dok-2 dans des cellules T stimulées par le TCR présentent une activation moindre de ZAP-70 engendrant une baisse de la phosphorylation de LAT et ERK (Yasuda et al., 2007).

L'ensemble de ces observations montrent que Dok-1 et Dok-2 sont des molécules importantes dans les boucles de rétro-contrôle du signal activateur induit par le TCR (Acuto et al., 2008; Mashima et

al., 2009). Reste cependant à déterminer la manière dont ces protéines vont être recruté sous le TCR activé. En effet, il est intéressant de noter, que la surexpression de deux protéines mutantes de Dok-1 dans un modèle cellulaire T, l'une déléetée de son domaine PH, l'autre mutée au niveau de la tyrosine de l'inter domaine (PH-PTB), sont capable de lever l'inhibition induite par la protéine entière ; tandis que la délétion de la partie terminale n'est pas suffisante pour lever l'inhibition (Yasuda et al., 2007). Ceci suggère donc deux types de recrutement, soit via l'utilisation du domaine PTB, qui aurait la capacité de se lier aux motifs ITAM phosphorylés ou à d'autres molécules telles que SHIP-1 notamment (Dong et al., 2006; Yasuda et al., 2007), soit via l'interaction de son domaine PH avec des ligands phospholipidiques (Zhao et al., 2001). Les deux domaines apparaissent essentiels à la fonction inhibitrice de Dok-1.

Résultats Expérimentaux

Article 1 :

Régulation des protéines Dok-1 et Dok-2 par le PtdIns5P durant l'activation lymphocytaire T

Introduction

Au tout début de ma thèse, les molécules Dok-1 et Dok-2 étaient clairement reconnues en tant que molécule à vocation inhibitrice lors d'une activation lymphocytaire T (Gerard et al., 2004; Nemorin et al., 2001). Mais les résultats du laboratoire, notamment sur les lignées T Jurkat (lignée leucémique humaine) et les cellules DWT6.11+/- (hybridome T murin transfecté de façon stable avec la molécule CD28 humaine (Pages et al., 1994), montraient une phosphorylation des molécules Dok-1 et Dok-2 principalement lors de l'engagement des molécules d'adhérence CD2 et CD28, et en moindre proportion sous le TCR (Klasen et al., 1998; Nunes et al., 1996; Yang et al., 1999). Ce sont ces modèles et concepts que j'ai manipulé au début de mon travail de thèse.

Les résultats bien établis dès mon arrivée faisaient état de l'importance fonctionnelle du domaine PH des molécules Dok-1 et Dok-2, suite à une costimulation CD3 + CD28 dans les cellules T Jurkat (Audrey Gérard). J'ai ainsi bénéficié, au début de ma thèse, d'une large gamme d'outils (constructions plasmiques diverses) pour l'étude de la fonction des molécules Dok-1 et Dok-2. La collaboration avec le laboratoire du Pr. Bernard Payrastre (Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan) avait déjà débuté, les résultats préliminaires en fat-blot permettaient d'exclure les PtdIns(3,4,5)P₃ comme ligand des domaines PH. Ce premier résultat n'était d'ailleurs pas vraiment attendu, car les résultats de la littérature (Zhao et al., 2001) soulignaient l'importance du PtdIns(3,4,5)P₃ pour le recrutement des molécules Dok-1 et Dok-2 au niveau de la membrane plasmique via leur domaine PH. D'ailleurs les premiers résultats *in vitro* indiquaient une liaison aux mono-PtdInsP où ce dessinait déjà la possibilité d'une relation avec lePtdIns5P.

Venant d'une formation d'immunologie, il est vrai que la première difficulté a été d'essayer d'appréhender du mieux possible ce nouveau monde qu'étaient les phosphoinositides. Deux articles fondamentaux ont permis de faire avancer énormément les connaissances sur le PtdIns5P et y contribuent toujours actuellement. Tout d'abord, la découverte de cette enzyme procaryote IpgD permettant de générer « artificiellement » du PtdIns5P, issues d'une collaboration entre les équipes françaises du Pr. Philippe Sansonetti (Institut Pasteur, Paris) et du Pr. Bernard Payrastre à Toulouse

(Niebuhr et al., 2002). L'année suivante, c'est un premier domaine de reconnaissance, le domaine PHD d'ING-2 qui est identifié par Or Gozani et ses collaborateurs (Gozani et al., 2003). A partir de là, tout semble réunit pour élucider les fonctions et localisations du PtdIns5P. La collaboration avec le laboratoire toulousain de Bernard Payrastra, nous a permis d'avoir accès à ces outils prometteurs.

Le but de notre projet était ainsi de confirmer les résultats obtenus *in vitro* pour déterminer la spécificité de ligand des domaines PH. Ceci par deux expériences *in vitro*, d'une part le fat-blot (dans ce cas, les phospholipides sont déposés sur une membrane de nitrocellulose), d'autre part, la résonance plasmonique de surface (dans ce cas, les phospholipides sont insérés dans des liposomes), dont l'accès nous a été possible grâce à la mise en place d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Pascale Zimmermann à l'Université de Louvain, Belgique. Grâce à la technique de dosage en masse, nous voulions également démontrer la production de PtdIns5P lors de l'engagement de TCR ou de la molécule CD28 en stimulant dans un premier temps des lignées cellulaires T avec des anticorps CD3 et/ou CD28. Enfin, démontrer des éventuels effets fonctionnels du PtdIns5P sur la fonction des molécules Dok.

Cependant, nous avons rencontré des problèmes dans les dosages du PtdIns5P dans les modèles cellulaires Jurkat et DWT6.11+/- . En effet, les résultats enregistrés ne semblaient pas vraiment reproductibles, mais surtout présentaient un taux basal important de PtdIns5P par rapport aux taux relevés sur des cellules au repos habituellement (c.à.d. quasi-indétectables). De plus, ces modèles cellulaires n'expriment pas les enzymes clés du métabolisme des phosphoinositides tels que PTEN et SHIP (Abraham and Weiss, 2004 ; Freeburn et al., 2002) ce phénotype explique d'ailleurs largement l'activation anormale d'AKT dans ces cellules. D'ailleurs, l'utilisation extensive de ces modèles cellulaires mutés pourrait expliquer pourquoi on n'a que peu de certitudes sur l'activité de la PI3K sous le TCR dont la réponse pourrait être altérée. C'est pourquoi nous avons opté pour l'utilisation du seul modèle cellulaire T présentant ces deux phosphatases non mutées à savoir les cellules HUT-78. Cette lignée nous a gracieusement été cédée grâce au Dr. Frédérique Michel (Institut Pasteur, Paris). L'intérêt de cette lignée résidait en plus dans le fait qu'elle exprimait Dok-2 phosphorylé lors de l'engagement du TCR (Dong et al., 2006).

Ainsi, nous avons pu démontrer une augmentation reproductible de PtdIns5P suite à une stimulation du TCR et ceci en corrélation complète avec la phosphorylation de Dok-2. De plus, l'utilisation d'IpgD nous a permis de démontrer la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 de façon PtdIns5P dépendante. Enfin, nous avons identifié les domaines PH de Dok-1 et Dok-2 comme des

ligands du PtdIns5P. La présence de ces domaines PH est importante dans la phosphorylation et la fonction inhibitrice de ces molécules Dok1 à la fois dans des lignées cellulaires T ou des lymphocytes T humains issus du sang périphérique, décrivant ainsi un rôle original du PtdIns5P dans les voies de signalisation lymphocytaire T.

Discussion et résultats complémentaires

Notre étude a permis de suggérer un rôle du PtdIns5P dans la régulation de la réponse lymphocytaire T, par le biais des molécules Dok-1 et Dok-2. C'est d'ailleurs la première fois qu'une étude se focalise de manière précise sur le ligand de ce type de domaine PH, son importance avait déjà été suggérée quant au recrutement de Dok-1 et Dok-2 sous des RTKs, tout comme le domaine PTB (cf. Introduction - partie III). Ainsi notre étude permet de suggérer le recrutement des protéines Dok-1 et Dok-2 au niveau de la membrane plasmique sous le TCR via leur domaine PH. Une partie de mon travail s'était dirigé vers l'étude par immunofluorescence de ce phénomène. Cependant, les outils que nous avons mis en place ne nous ont pas permis de valider totalement le recrutement direct des molécules Doks par le PtdIns5P. Ensuite, nous avons réalisé divers dosages sur les autres lignées lymphocytaires T dont DWT6.11+/-, ceux-ci montraient également une augmentation de PtdIns5P sous les diverses stimulations CD3, CD28 ou CD3 + CD28. Il pourrait s'avérer intéressant par la suite de comprendre le mode de régulation de la production de PtdIns5P. Les résultats complémentaires suivants, n'ont pas été inclus dans l'article, mais montrent la démarche entreprise pour répondre à ces questions.

Recrutement de Dok-1 et Dok-2 au niveau de la membrane plasmique en présence de PtdIns5P

Afin de relier le PtdIns5P au recrutement de Dok-1 et Dok-2 au niveau de la membrane plasmique, des expériences d'immunofluorescences ont été réalisées. Notamment, la transfection en cellules COS-7 de diverses constructions codant pour des protéines de fusion Dok-1 GFP, telles que la protéine entière, déléetée de son domaine PH ou le domaine PH seul. De plus, les cellules ont été co-transfectées ou non avec les constructions IpgD étiquetée épitope Myc ou un mutant inactif IpgD CS (Fig.26). Il semblerait d'après cette expérience que le domaine PH soit relocalisé au niveau de la membrane plasmique en présence d'IpgD WT et donc de PtdIns5P. Cependant, il reste difficile de conclure avec ce type d'expérience pour deux types de raisons. D'une part, on ne peut pas affirmer la réelle expression de ces constructions myc IpgD (WT ou CS). D'autre part, l'expression du domaine PH est relativement diffuse dans l'ensemble du cytoplasme, ne permettant pas de localiser précisément le ligand du domaine PH.

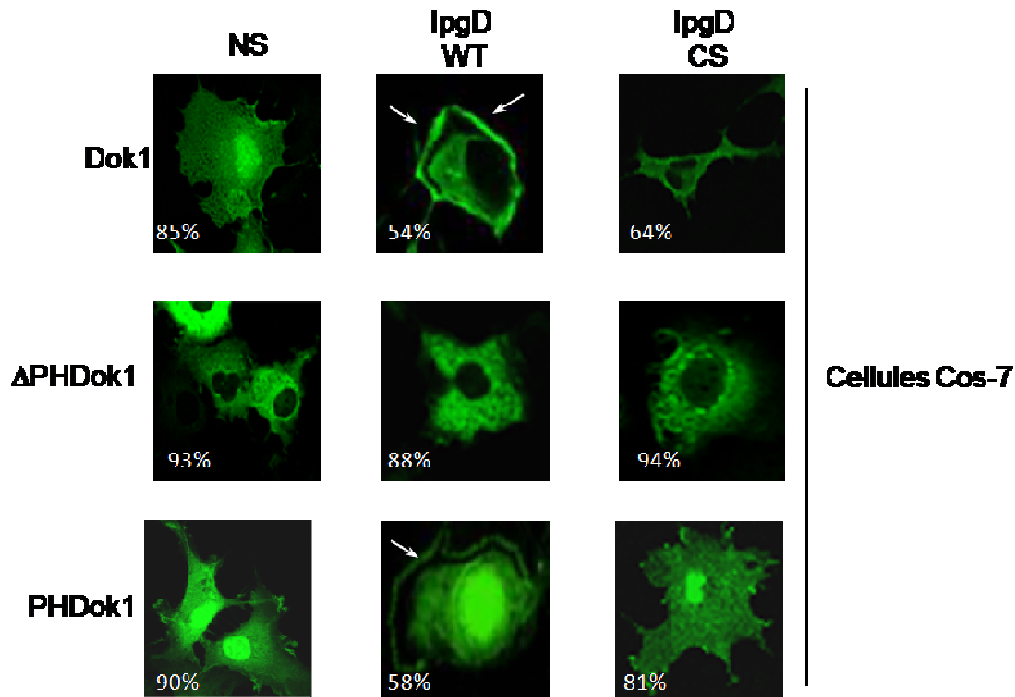


Fig.26. Recrutement du domaine PII de Dok-1 à la membrane plasmique suite à la surexpression d'IpgD.

Transfection des cellules Cos7 selon le cas avec Dok-1 GFP, ΔPHDok-1 GFP ou le PH de Dok-1 GFP. En plus est réalisée une co-transfection avec la construction IpgD WT ou IpgD CS (mutant inactif) pendant 12h. Le pourcentage indique la quantité de cellules présentant des caractéristiques équivalentes à la photo (n≥40). (Andrey Gérard)

C'est pour cela que nous avons tenté de fabriquer un nouvel outil plus précis de reconnaissance du PtdIns5P en créant une cassette contenant un tandem de domaine PH de Dok-2. Ce genre de stratégie est relativement admise pour permettre d'augmenter la spécificité de liaison aux phosphoinositides (en particulier dans les cas des domaines FYVE) (Gillooly et al., 2000). L'expression de cette construction 2x PH Dok-2-GFP se retrouve de manière étonnante au niveau de la membrane plasmique dans tous les modèles cellulaires testés (Hela, Hut-78, Jurkat, DWT6.11+/-) (Fig.27). Nous avons ainsi tenté le même type d'approche que précédemment, à savoir transfecter cette nouvelle construction en présence ou non de myc IpgD que nous avons détecté avec un anticorps anti-Myc épitope marqué avec le fluorophore Alexa 594 (rouge). En parallèle, nous avons utilisé en tant que contrôle positif la construction 3X-PHD ING-2 décrite dans la littérature (Gozani et al., 2003) (Fig.28).

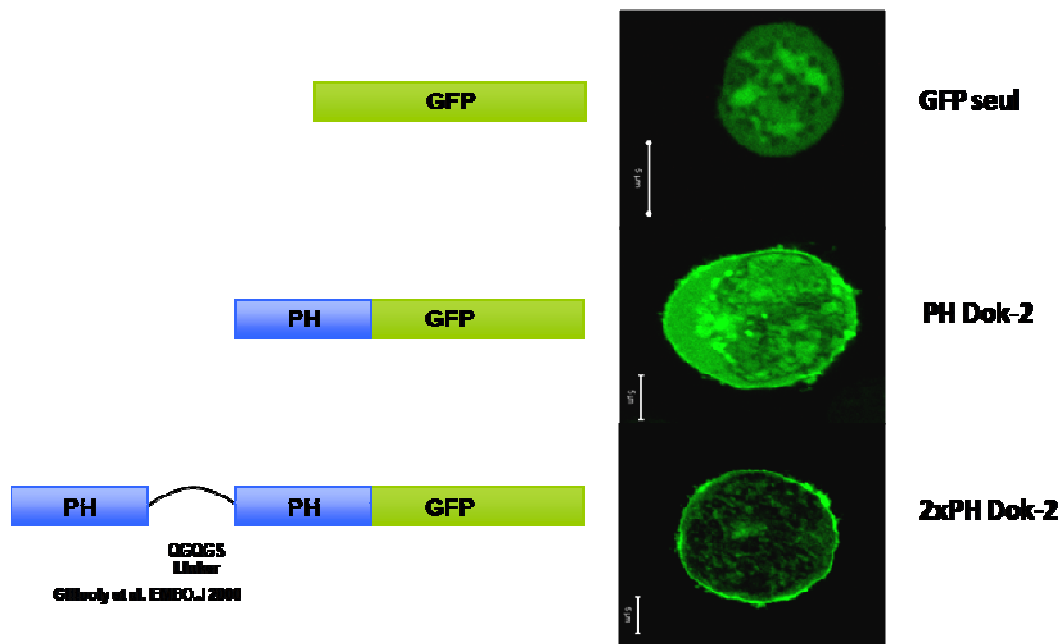


Fig.27. Expression des sondes de Dok-2 GFP dans la lignée cellulaire T, Jurkat (clone JA16). Transfections pendant 24h des constructions plasmidiques exprimant la GFP ou des protéines de fusion GFP : PH Dok-2 GFP ou 2xPH Dok-2 GFP par électroporation (20µg) (selon le protocole indiqué dans l'article).

Une relocalisation des deux sondes au niveau du cytosol est observée. Le 2xPH Dok-2 est à l'origine à la membrane plasmique (ou péri-membranaire), tandis que le 3xPHD ING2 à l'origine nucléaire se relocalise au niveau cytosolique voire une petite partie au niveau de la membrane plasmique, résultat en accord avec la littérature (Gozani et al., 2003). En fait, nous observons avec la sonde 2xPH Dok-2, l'effet inverse de celui attendu. Ceci implique peut être dû à un changement dans la reconnaissance de ligand avec la dimérisation des domaines PH. L'expression observée ainsi que la relocalisation s'apparentent clairement avec les résultats observés pour les sondes spécifiques des PtdIns(4,5)P₂. On peut ainsi argumenter sur le fait que, dans le cas de cette sonde, c'est plutôt la disparition de PtdIns(4,5)P₂ qui serait à l'origine de la relocalisation de notre sonde. Cela dit, il serait très intéressant de tout de même tester *in vitro* la liaison de ce tandem de domaines PH aux différents PIs. Enfin, il paraît clair dans l'ensemble de nos expériences réalisées de l'impact important de l'expression d'IpgD sur le cytosquelette de la cellule, qui a tendance à ne plus avoir sa morphologie caractéristique fusiforme, mais tend à s'arrondir (Fig.28).

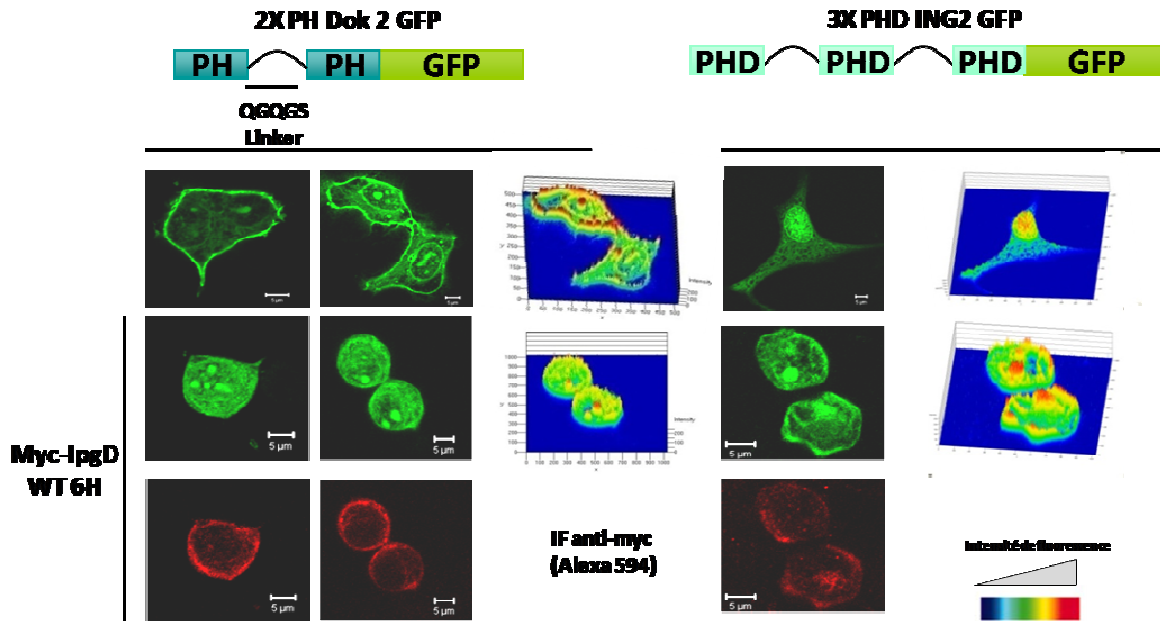


Fig.28. Relocalisation des sondes 2x PH Dok-2 et 3x PHD ING-2 en présence d'IpgD.
 Les cellules HeLa ont été transfectées (Lipofectamine) avec les constructions 2xPH Dok-2 et 3xPHD ING-2 pendant 24h. 18h après transfection, une deuxième transfection est réalisée avec la construction IpgD WT pendant 6h. Après fixation, les cellules ont subi un marquage en immunofluorescence avec un anticorps anti-Myc couplé au fluorophore Alexa 594. Les diagrammes à côté des photos représentent les intensités de fluorescence.

Dosage en masse de PtdIns5P dans les cellules DWT6.11+/-

Avant d'arriver à doser de manière reproductible les taux de PtdIns5P dans les cellules HUT-78 et avec toute l'aide de l'équipe du Pr. Bernard Payrastre, de nombreux dosages ont été réalisés sur les hybridomes T murins DWT6.11+/-, ces cellules avaient déjà été utilisées pour mesurer les taux de PtdIns(3,4,5)P₃, suite à l'engagement de la molécule CD28 (Pages et al., 1994). Comme mentionné précédemment, dans ce système, la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 est retrouvée de manière importante sous le corécepteur CD28 (Yang et al., 1999) plus faible sous stimulation du TCR et intermédiaire à la suite des deux stimulations (Fig.29). Nous avons ainsi tenté de mesurer les variations de PtdIns5P sous ces diverses stimulations. Malheureusement, malgré un grand nombre d'expériences différentes, il a été très difficile de trouver une régulation aussi fine dans ce modèle cellulaire. A noter, que les cellules HUT-78 n'expriment pas CD28, c'est pour cela que nous n'avons pas réalisé le même type d'expérience avec ce modèle. En tout état de cause, dans les cellules DWT6.11+/-, ainsi que les cellules Jurkat (clone JA16) (Audrey Gérard, Caroline Pendaries & Bernard Payrastre, données non publiées), il y a une tendance à une augmentation de PtdIns5P sous ces diverses stimulations. Cependant, même critique que

précédemment soulevé, les variations importantes mesurées entre les diverses expériences dans ces modèles cellulaires ne permettent pas de conclure statistiquement, sans doute dû au fait que le métabolisme des phosphoinositides est énormément touché par l'absence de PTEN et SHIP-1 dans le système, aboutissant à une régulation anarchique de la cellule.

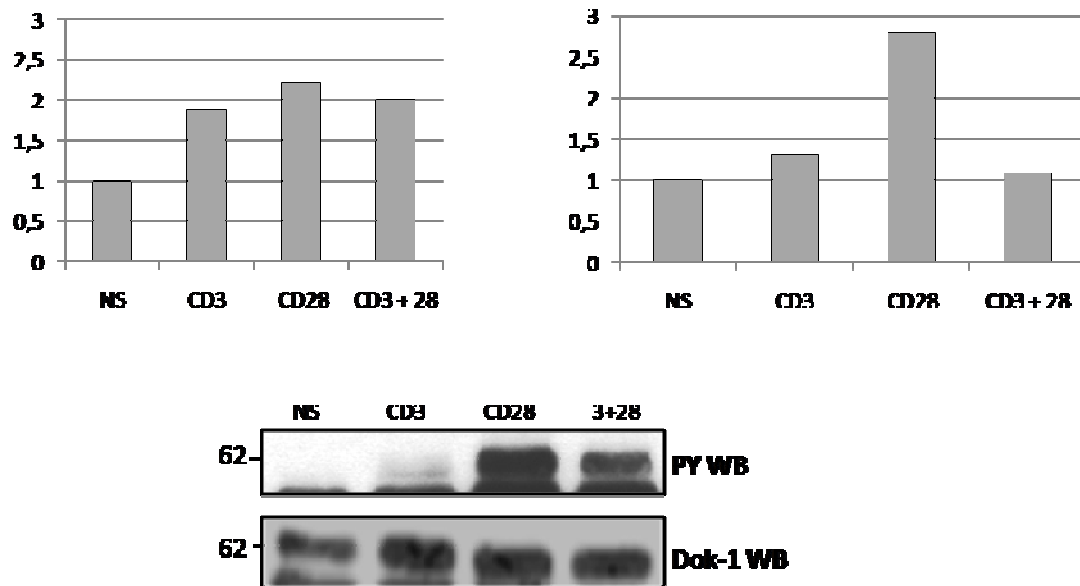


Fig.29. Dosages en masse de PtdIns5P réalisés dans des hybridomes T murins transfectés avec la molécule CD28 humaine, cellules DWT6.11+/-.
 Les cellules ont été stimulées par des anticorps dirigés contre CD3, CD28 ou CD3 + 28 pendant 2min à 37°C. Les deux mesures sont indépendantes et représentent la moyenne de 2 expériences chacune. Chaque histogramme représente le taux d'induction de PtdIns5P du point stimulé par rapport à la cellule au repos (non-stimulé: NS). Le Western blot représente la phosphorylation des molécules Dok-1 dans les mêmes conditions. Les dosages ont été réalisés au laboratoire du Pr. Bernard Payrastre (CPTP, Toulouse), et ont été réalisés comme décrit dans l'article (Guittard G. et al., J. Immunol., 2009).

Bien entendu, le système idéal pour observer ces variations serait l'utilisation de T primaires stimulés pour le dosage. Cependant, un obstacle de choix reste le nombre de cellules nécessaire pour faire un point de mesure (si $20 \cdot 10^6$ équivalents cellulaires sont utilisés par point en utilisant la lignée HUT-78, il faut au minimum inclure $200 \cdot 10^6$ équivalents cellulaires par point en utilisant des cellules T primaires). Une stratégie qui pourrait être envisagé à l'avenir, serait d'exprimer la molécule CD28 de manière stable dans les cellules HUT-78, en espérant se rapprocher le plus possible du modèle physiologique des T primaires. Ce type d'approche permettrait pourquoi pas d'étudier plus précisément les augmentations de PtdIns5P relevées suite aux stimulations CD3 et CD28.

En conclusion, nous avons montré dans notre article que le TCR stimulé provoque la production de PtdIns5P. Mais nos expériences menées dans les autres modèles cellulaires nous ont permis de suggérer que cet évènement n'est peut être pas exclusivement retrouvé sous le TCR, mais également suite à d'autres stimuli notamment lors de l'engagement de molécules de costimulation telles que la molécule CD28.

Conclusion, perspectives :

A la suite de cette étude, il reste plusieurs questions qui restent en suspens. Notamment, quelle est la kinase qui va engendrer la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2? De plus, il semble étonnant de voir que dans notre système, que la molécule PtdIns5P est capable de réguler un mécanisme inhibiteur, tandis que dans d'autres systèmes cellulaires, celle-ci est capable de favoriser des voies de signalisation activatrices telles que la voie de survie PI3K/AKT.

Enfin, la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 suite à la stimulation du TCR est très rapide et intense dans des cinétiques inférieures ou égales à 2 min, pour décroître par la suite à un niveau presque basal à 10 min de stimulation. Ceci suggère deux choses, d'une part, la kinase phosphorylant Dok est très rapidement recrutée sous le TCR, et comme on l'a vue le candidat idéal à la phosphorylation de Dok dans un tel système s'avèrerait être les PTKs de la famille Src. D'autre part, même constat pour la production de PtdIns5P, celle-ci s'effectue très rapidement suite à la stimulation du TCR, suggérant également qu'une lipide kinase ou phosphatase va se retrouver recrutée sous le TCR ou à proximité, et permettra la synthèse précoce de PtdIns5P. D'ailleurs cette production très précoce privilégie l'hypothèse selon laquelle il existerait un pool de PtdIns5P au niveau de la membrane plasmique.

Pour conclure, nous pensions avoir trouvé un domaine pouvant lier le PtdIns5P de manière très spécifique au vue des expériences de fat-blot. Cependant, les résultats en BIAcore, technique plus sensible pour la mesure des affinités, a montré une double spécificité PtdIns5P et PtdIns4P. Il n'en reste pas moins que le PtdIns5P va clairement influencer sur la régulation de la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2.

Article 2 :

Le PtdIns5P, un acteur des voies de transduction activatrices durant la stimulation lymphocytaire T

Introduction

A la suite du premier article, nous avons décidé de nous intéresser de manière plus générale à l'impact du PtdIns5P sur les voies de signalisation lymphocytaire T. Etant donné que le PtdIns5P augmente sous une stimulation du TCR, nous avons tenté de déterminer son influence sur les acteurs des complexes initiateurs du signal TCR, en particulier les PTKs de la famille Src, ZAP-70 et son substrat, la protéine adaptatrice, LAT. De plus, lors de notre collaboration avec P. Zimmermann pour nos expériences de BIAcore, nous avons testé l'ensemble des domaines PH des membres de la famille Dok exprimé dans les lymphocytes T activés à savoir Dok-1, 2, 4 et 5. De manière intéressante, cette étude *in vitro* nous a permis d'identifier le domaine PH de Dok-5 comme un ligand sélectif du PtdIns5P. Ainsi, pour cette seconde étude, nous avons décidé de sonder les voies de signalisation lymphocytaire T, à l'aide de deux outils, d'une part, IpgD afin d'étudier l'impact du PtdIns5P, d'autre part, nous avons utilisé ce nouveau domaine PH de Dok-5 comme un outil, pour la séquestration du PtdIns5P sous une stimulation du TCR.

De manière surprenante, il nous a été possible d'identifier une induction de la phosphorylation des Src kinases et AKT suite à la transfection d'IpgD et la stimulation du TCR, observation inversée lors de la co-expression du domaine PH de Dok-5. Cette phosphorylation induite par l'augmentation de PtdIns5P semble très caractéristique, car elle n'engendre pas la phosphorylation de ZAP-70 et de son substrat, LAT ainsi que les MAPK, ERK-1/2. L'ensemble de ces résultats suggérant un rôle activateur du PtdIns5P dans l'activation lymphocytaire T. Ici sont rassemblées toutes les données, permettant une soumission prochaine à JBC Accelerated publication.

Phosphatidylinositol 5-phosphate (PtdIns5P) increase in T cell activation: evidence for a positive role in signal transduction pathways.

Geoffrey Guittard ^{1,2,3}, Eva Mortier ⁵, Hélène Tronchère ⁴, Guylène Firaguay ^{1,2,3}, Audrey Gérard ^{1,2,3,6}, Pascale Zimmermann ⁵, Bernard Payrastra ⁴, and Jacques A. Nunès ^{1,2,3,7}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, F-13009, Marseille, France ; ² Institut Paoli-Calmettes, F-13009 Marseille, France ; ³ Univ Méditerranée, F-13007, Marseille, France ; ⁴ Inserm, Unité 563, CPTP, Département d'Oncog  n  se, Signalisation et Innovation thérapeutique; Université Toulouse III Paul Sabatier and Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse F-31400, France ; ⁵ Laboratory for Signal Integration in Cell Fate Decision, Department of Human Genetics, K.U.Leuven , B-3000 Leuven, Belgium.

⁶ Present address: University of California, San Francisco, 513 Parnassus Avenue, San Francisco, CA 94143-0511, USA.

⁷ Corresponding author jacques.nunes@inserm.fr

Summary

PtdIns5P is emerging as a potential lipid messenger involved in several cell types, from plants to mammals. Accordingly, PtdIns5P level have been recently reported to increase during T cell activation. Here, we investigated PtdIns5P impact on T cell signaling by expressing IpgD a PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatase from *Shigella flexnerii*, which promotes intracellular PtdIns5P production. Our results show that IpgD expression induces Src-kinase and Akt activation, but not ERK activation and enhances IL-2 promoter activity in T cells. Moreover we identify the PH domain adaptor protein Dok-5 as a new potent PtdIns5P binding domain. Expression of this PtdIns5P interacting domain blocks IpgD-induced T cell activation and selective signaling molecules downstream to TCR triggering. Altogether, these data suggest that PtdIns5P may play a sensor function in setting the threshold of T cell activation and contributing to maintain T cell homeostasis.

Introduction

Phosphoinositides (PIs) are constituents of cell membranes playing a critical role in cell signaling pathways. Their biosynthesis is tightly regulated by several lipid kinases and phosphatases, which disruption can give rise to several pathologies (1) . Among PIs, PtdIns5P is emerging as a potential lipid messenger (2-3). Indeed, enhanced tyrosine phosphorylation reveals detectable cellular PtdIns5P levels in epithelial cells (4). Moreover, stimulation of some receptor tyrosine kinases such as the insulin receptor induces a PtdIns5P increase (5). In hematopoietic cells, it has been reported an increase in PtdIns5P levels in cells expressing the oncogenic tyrosine kinase nucleophosmin anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK), a chimeric protein found in the large majority of anaplastic large cell lymphomas (ALCLs) (6). In blood platelet, thrombin stimulation can also increase PtdIns5P production (7). Different pools of PtdIns5P have been identified such as the plasma membrane, endosomal compartments and the nucleus (3). Altogether, these data suggest that PtdIns5P is entering in the large investigation field of signalling pathways.

The PtdInsPs species mediate signals through their binding to proteins containing specific interaction domains (8). Interestingly, we found that Dok-1/Dok-2 pleckstrin homology (PH) domains bind *in vitro* to PtdIns5P (9). Previous studies had identified ATX1 and ING2 plant homeo domain (PHD) as PtdIns5P binding module (10-11). However it remains still essential to identify more and selective PtdIns5P binder modules in order to better characterize its function. In this study, we identify a more specific PtdIns5P partner harboring a strong binding for PtdIns5P species, the PH domain of another Dok family member, Dok-5.

The nature of PtdIns5P effectors is still poorly known. Bacterial infection by *Shigella flexnerii* generates, via the virulence factor IpgD, PtdIns5P at the plasma membrane of the host cells leading to Akt activation (12-13).

T cells are a major cell type from the adaptive immune system that is involved in controlling the immune response. T cell activation is initiated by the stimulation of the T cell receptor (TCR). Production of the PIs species such as PtdIns(3,4,5)P₃ has been reported to act as a key checkpoint in T cell signaling (14). Recently, we observed that PtdIns5P is produced in T cells upon TCR triggering and leads to Dok-1 and Dok-2 tyrosine phosphorylation, suggesting that PtdIns5P is a second messenger downstream of TCR stimulation (9).

Using PH-Dok-5 as a tool to sequester cognate PtdIns5P, as well as IppD to artificially increase the pool of PtdIns5P, we found that PtdIns5Ps are indeed required for T-cell signaling. Altogether our data argue for an early impact of PtdIns5P during T cell activation. PtdIns5P seems to be a newly identified key player in T cell signaling as PtdIns5P is able to activate Src family tyrosine kinases and the Akt pathway that are crucial in T cell activation.

Experimental procedures

Culture cells and transfection

Hut-78 T cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % heat inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, and 1 mM sodium-pyruvate. Hut-78 T cells (10×10^6) were electroporated at 960 μ F and 250 V using the GenePulser XcellTM (BioRad) during indicated time.

Plasmid constructs

The construct β DNA4HADok-5 corresponding to the wild-type (WT) full-length human Dok-5 cDNA tagged with HA epitope in the 5' end, was generated by subcloning of pGEM-T easy vector containing HA tagged Dok-5, described previously (15), into the β DNA4 vector, using the restriction site NotI. The Dok-4 and Dok-5 PH domains fused to the GST protein were obtained by PCR amplification from human Dok-4 (16) or human Dok-5 tagged HA epitope both in β DNA4 expression vector. The PCR products were sequenced and cloned in pGEX-4T3 (Amersham Biosciences Limited, England, UK).

The Dok-5 PH domain tagged GFP construct was generated by PCR amplification from pGEX-4T3 PH-Dok-5 using the following primers sense 5'-ggcgcctcgagatggcctccaattttaatgacatagtgaagcaaggg-3'(XhoI site added) and antisense 5'-gcggcgaattccttgatccgtgttcctacacactccatctg-3' (EcoRI site added). The PCR products were sequenced and cloned in pEGFP-N1 XhoI/EcoRI (Clontech, Palo Alto, CA). The Myc epitope tagged IpgD WT and IpgD-C438S, a phosphatase-dead mutant in pRK5 expression vector were described previously (12).

Antibodies and western blotting

CD3 mAb (clone 289) recognizing CD3 ϵ subunit of the CD3-TCR complex was reported previously (17). Anti-Myc epitope mAb, 9E10 and anti-phosphotyrosine mAb, 4G10 were purchased from

Millipore (Billerica, MA). Anti-GFP mAbs were purchased from Roche (Meylan, France). The rabbit polyclonal antibodies: AKT (# 9272), phospho-LAT (Tyr191) (# 3584), phospho-ZAP-70 (Tyr493) (# 2704), phospho-SRC family (Tyr416) (# 2101) and rabbit mAbs: phospho-p44/42 MAPK (ERK-1/2) (Thr202/Tyr204) (# 4376), phospho-Akt (Ser473) (# 4058) were purchased from Cell signaling technology, Inc. Anti-GST mAb ND2.1 was a kind gift of Dr. J. L. Teillaud (Inserm U 872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France).

For Western blotting, samples were resolved by standard 12% SDS-polyacrylamide gels. Membranes were blocked and probed with specific antibodies. Blots were then incubated with the appropriate second antibodies, anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG, both conjugated with horseradish peroxidase (DAKO Denmark A/S). Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences Limited, England, and UK).

Stimulation and cell lysis

Hut-78 T cells ($10 \cdot 10^6$) were stimulated at 37 °C in RPMI 50mM Hepes. Stimulations were carried out for the indicated times using CD3 mAb 289 at 10µg/ml. The cells were pelleted in a microcentrifuge and lysed in buffer containing 50 mM Hepes (pH 7.4), 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 20 mM iodoacetamide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml protease inhibitors (protease inhibitors cocktail, Sigma, St Louis, MO) and 1 mM Na_3VO_4 for 10 min at 4°C, then centrifugated at 13000 rpm for 10 min at 4°C.

Phospholipids binding assays

Protein lipid-blot assays were carried out as described (18). “PIP strip” membranes were purchased from Echelon biosciences Inc. To reveal PIs – GST PH domains interactions, anti-GST mAb was used in immunoblotting.

BiaCore ®/ Surface plasmon resonance (SPR) experiments

Detailed protocols for SPR experiments were described previously (19). Briefly, the binding of 1 μM protein to lipid layers containing 90% DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Sigma) and 10% PtdIns or mono-PtdInsP (Echelon biosciences Inc.) was measured. Binding of protein (PtdIns and mono-PtdInsP) were measured at the same time and all proteins were tested on the same fresh lipid layers (at least 6000 RU was coupled). Proteins were removed from the layers by addition of 20 μl 25 μM NaOH at a flow rate of 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Here is represented the relative binding of mono-PtdInsP with PtdIns score of binding subtraction.

Luciferase assays

The promoter assay plasmids pIL-2-Luc composed of IL-2 promoter, fused to firefly luciferase reporter gene and p β -actin-Rluc composed of β -actin promoter, fused with *Renilla* luciferase gene were previously reported and luciferase assay was performed as previously described (20). PMA was purchased from Sigma (St Louis, MO).

Phospho flow by FACS Analysis

Phospho flow analysis was performed by cytometry as previously described (21). Briefly, phospho-Src Tyr416 (# 2101) antibodies were added with Hut-78 fixed and permeabilized cells. Then, biotinylated secondary antibodies specific to primary Abs IgG were applied. Finally, revelation is performed using a solution containing streptavidin coupled to phycoerythrin (PE).

RESULTS AND DISCUSSION

PtdIns5P increase is sufficient to trigger downstream cell signalling in T cells

Ectopic IpgD expression induces high PtdIns5P production in eukaryotic cells and activation of the PI 3-kinase /Akt pathway (12-13). To study the impact of IpgD and thereby of PtdIns5P increase on T cell signalling, Hut-78 T cells were transfected with Myc-tagged IpgD WT or a C438S (CS) mutant as control. Hut-78 T cell line was used because it is not mutated in key enzymes of the PI metabolism, such as phosphatase and tensin homologue deleted in chromosome 10 (PTEN) or SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5'-phosphatase (SHIP) as observed in Jurkat cells for instance (22). IpgD expression in epithelial cell lines induces a strong Akt activation detected by its phosphorylation at serine position 473 (13). As shown in Fig1A, IpgD WT expression but not its phosphatase-dead version leads to AKT phosphorylation at serine 473 as early as 4h of IpgD expression. Thus, IpgD expression is also able to trigger signalling events in this T cell line.

TCR ligation activates protein tyrosine kinases (PTKs) like Src kinase family members and ZAP-70, which regulate several signalling events such as MAP kinases and PI3-kinase/Akt pathways (23). In order to determine whether PtdIns5P production could regulate some of the TCR-mediated signalling events, activation of several PTKs was analyzed by anti-phosphoproteins immunoblots in IpgD WT or IpgD CS expressing cells (Fig. 1B). Pervanadate treatment of Hut-78 T cells was used as a positive control. The Src kinase family members, but not ZAP-70 were tyrosine phosphorylated upon IpgD expression. These results are in accordance with previous data demonstrating that IpgD enhances the tyrosine phosphorylation of Src kinase substrates in T cells such as Dok-1 and Dok-2 proteins (9,24). Moreover, the tyrosine phosphorylation of a ZAP-70 substrate, LAT was not increased in presence of IpgD WT, confirming that PtdIns5P production does not lead to ZAP-70 activation. The phosphorylation status of other signalling proteins such as ERK-1/2, was not altered by IpgD. The activation of signalling pathways in T cells results in the production of several

cytokines including interleukin (IL)-2, a key cytokine involved into the T cell development and proliferation during an adoptive immune response. It has been reported that Akt can positively regulate the transcriptional activity of IL-2 (25). To assay the role of PtdIns5P in T cell signaling, we measured IL-2 promoter activity status in Hut-78 T cells (Fig. 1C). To this aim, Hut-78 T cells were co-transfected with an IL-2 promoter-dependent luciferase reporter plasmid and IpgD WT or IpgD CS. We used as a positive control, phorbol myristate acetate (PMA) plus ionomycin treatment to determine the highest induction of IL-2 promoter activity in this cell system. Interestingly, we were able to detect a great IL-2 promoter enhancement upon IpgD WT transfection compared to IpgD CS. Altogether, these data suggest that PtdIns5P increase induces positive activation events in T cells.

Identification of a new PtdIns5P binding module: the PH domain of Dok-5 protein

In order to prove that PtdIns5P enhances some T cell signaling events, we sought to identify a strong, specific PtdIns5P interacting domain, which could be used to sequester endogenous PtdIns5Ps generated by TCR stimulation. We previously described Dok-1 and Dok-2 PH domain binding-specificity (9). These PH domains have a double specificity for PtdIns4P and PtdIns5P with a preference for PtdIns5P in fat blotting (9). However PtdIns5P clearly enhances Dok-1 and Dok-2 phosphorylation levels. Here, we checked the lipid binding properties of the PH domains from two other Dok family members also expressed in T cells (15), Dok-4 and Dok-5 by fat blotting (Fig. 2 A) and SPR analysis (Fig.2 B).

To establish whether both Dok-4 and Dok-5 PH domains have phospholipid-binding properties, we tested 15 lipids including phosphoinositides in a protein lipid-blot (Fig. 2A). After incubation with recombinant GST-PH Dok-5, a signal is detectable with phosphatidylinositol monophosphate species, PtdIns4P and PtdIns5P. The spectrum of binding of the GST-PH Dok-4 is a bit larger, since it recognizes also PtdIns3P. To further establish the Dok-4 and Dok-5 PH domain binding

properties, we used , SPR analysis, a sensitive method to detect PI binding. SPR biosensor analysis revealed that Dok-5 PH domain is able to strongly bind PtdIns5P compared to other tested PIs (Fig. 2B and supplemental figure S1). Dok-4 PH domain is also able to bind PtdIns5P to a lesser extent . As positive controls, different known PI protein interactors were tested, GST-2X-FYVE Hrs (26), GST-PH OSBP (27) and GST-2X PHD ING-2 (11) which bind respectively PtdIns3P, PtdIns4P and PtdIns5P (supplemental figure S1). In our experiments, 2X PHD ING-2 fusion proteins failed to efficiently bind PtdInsPs *in vitro* contrary to the two other controls. Altogether, our *in vitro* data revealed a stronger interaction between Dok-5 PH domain and PtdIns5P than with any other yet identified PtdIns5P binding domain. Therefore, Dok-5 PH domain is a strong binding module for PtdIns5P *in vitro*, using SPR technique.

The Dok-5 PH domain expression blocks T cell signalling events

To validate the ability of the Dok-5 PH domain to block functional events induced by PtdIns5P increase in T cells, we next investigated IL-2 promoter activity in IpgD-transfected T cells in the presence or absence of Dok-5 PH domain (Fig. 3A). To this aim, Hut-78 cells were co-transfected with IL-2 promoter–dependent luciferase reporter plasmid and with IpgD WT or IpgD CS. Moreover, constructs encoding for the GFP alone or the Dok-5 PH domain fused with GFP were co-transfected. Cells transfected with GFP alone showed expected feature with enhanced IL-2 promoter activity in the presence of IpgD WT, in the same magnitude than previously observed (Fig. 1C). Importantly, cells co-transfected with IpgD WT and PH Dok-5 GFP, did not show any significant increase of the IL-2 promoter activity. This observation suggests that the PH domain of Dok-5 can sequester PtdIns5P preventing IpgD-induced IL-2 promoter activity. Thus, the Dok-5 PH domain expression blocks cellular effects induced by PtdIns5P increase, acting as a “PtdIns5P-downstream signalling inhibitor”. Endogenous TCR ligation induced by CD3 mAbs stimulates transiently a cellular PtdIns5P in Hut-78 T cells (9). We investigated the impact of Dok-5 PH domain expression

on TCR-induced signalling events. Hut-78 T cells were transfected or not with the GFP tagged Dok-5 PH domain, then stimulated by CD3 mAbs. Signalling proteins phosphorylation status was evaluated upon TCR engagement by immunoblotting (Fig. 3B). As expected, TCR triggering led to activation of PTKs such as Src family members, and activation of both ERK-1/2 and Akt. The presence of Dok-5 PH domain blocked some TCR-induced tyrosine phosphorylation events detected by anti-phosphotyrosine blots (Fig.3B). TCR-induced Src kinase family members and Akt phosphorylation, but not ERK-1/2 phosphorylation, were largely decreased by the presence of the PH domain of Dok-5. These inhibitory effects on proximal TCR-activated PTKs (Src family kinases) were confirmed by a second set of experiments involving anti-phospho Src (Tyr416) antibodies in immunoblots (Fig. 3C) or phosphoflow cytometry analysis (Fig. 3D). By both experimental approaches, TCR-induced Src family kinases activation signal was reduced in presence of Dok-5 PH domain. The results correlate with data presented in Figure 1, confirming that PtdIns5P selectively regulates Src kinases and Akt.

Altogether our findings suggest that PtdIns5P increase regulates signalling events in T cells. Some of them such as the Akt activation have been previously reported in epithelial cells (13). Two kinds of regulatory mechanisms have been suggested where PtdIns5P increase prevents Akt dephosphorylation through an inhibition of the PP2A phosphatase (28) or through a PTK activation that will phosphorylate YxxM motif-containing proteins involved in the PI3-kinase class IA activation (13). Here, we show that at least in T cells, the PtdIns5P increase induces an activation of Src family members, where two of them, Lck and Fyn, being largely involved in T cell signalling, (23). The activity of these Src kinases is regulated within lipid rafts structures in T cells (29). As it has been reported that some PIs signalling events occur in the raft nanodomains (30), it is tempting to investigate the role of PtdIns5P located at the plasma membrane, in the context of a lipid raft disruption by using inhibitors of the sphingolipid and cholesterol metabolism. As other intracellular PtdIns5P pools have been described in late endosomes and nucleus (31-32), we cannot exclude a

participation of these pools in the regulation of late T cell activation events such as the cytokine promoter activities.

However, another point that will be critical to solve, is to identify enzymes that directly produce PtdIns5P in T cells. Few enzymes have been identified in the metabolism of PtdIns5P (3). Mammalian PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases have been described, which are involved in EGF-R receptor degradation (33). The genes encoding for these two 4-phosphatases are expressed in lymphoid cells. But also the PtdIns 5-kinase, PIKfyve, or the PtdIns 3-phosphatase MTM1 which are both involved directly or indirectly in PtdIns5P synthesis (34-35). The analysis of the functions of these enzymes in immune system, will help to understand how the lipid messenger, PtdIns5P, participates in the fine-tuning of T cell signalling.

REFERENCES

1. Pendaries, C., Tronchere, H., Plantavid, M., and Payrastre, B. (2003) *FEBS Lett* **546**, 25-31
2. Rameh, L. E., Toliás, K. F., Duckworth, B. C., and Cantley, L. C. (1997) *Nature* **390**, 192-196
3. Coronas, S., Ramel, D., Pendaries, C., Gaits-Iacovoni, F., Tronchere, H., and Payrastre, B. (2007) *Biochem Soc Symp*, 117-128
4. Wilcox, A., and Hinchliffe, K. A. (2008) *FEBS Lett* **582**, 1391-1394
5. Sbrissa, D., Ikononov, O. C., Strakova, J., and Shisheva, A. (2004) *Endocrinology* **145**, 4853-4865
6. Coronas, S., Lagarrigue, F., Ramel, D., Chicanne, G., Delsol, G., Payrastre, B., and Tronchere, H. (2008) *Biochem Biophys Res Commun* **372**, 351-355
7. Morris, J. B., Hinchliffe, K. A., Ciruela, A., Letcher, A. J., and Irvine, R. F. (2000) *FEBS Lett* **475**, 57-60
8. Lemmon, M. A. (2008) *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 99-111
9. Guittard, G., Gerard, A., Dupuis-Coronas, S., Tronchere, H., Mortier, E., Favre, C., Olive, D., Zimmermann, P., Payrastre, B., and Nunes, J. A. (2009) *J Immunol* **182**, 3974-3978
10. Alvarez-Venegas, R., Sadder, M., Hlavacka, A., Baluska, F., Xia, Y., Lu, G., Firsov, A., Sarath, G., Moriyama, H., Dubrovsky, J. G., and Avramova, Z. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6049-6054
11. Gozani, O., Karuman, P., Jones, D. R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A. A., Baird, C. L., Zhu, H., Field, S. J., Lessnick, S. L., Villasenor, J., Mehrotra, B., Chen, J., Rao, V. R., Brugge, J. S., Ferguson, C. G., Payrastre, B., Myszkka, D. G., Cantley, L. C., Wagner, G., Divecha, N., Prestwich, G. D., and Yuan, J. (2003) *Cell* **114**, 99-111
12. Niebuhr, K., Giuriato, S., Pedron, T., Philpott, D. J., Gaits, F., Sable, J., Sheetz, M. P., Parsot, C., Sansonetti, P. J., and Payrastre, B. (2002) *Embo J* **21**, 5069-5078

13. Pendaries, C., Tronchere, H., Arbibe, L., Mounier, J., Gozani, O., Cantley, L., Fry, M. J., Gaits-Iacovoni, F., Sansonetti, P. J., and Payrastre, B. (2006) *Embo J* **25**, 1024-1034
14. Fruman, D. A., and Bismuth, G. (2009) *Immunol Rev* **228**, 253-272
15. Favre, C., Gerard, A., Clauzier, E., Pontarotti, P., Olive, D., and Nunes, J. A. (2003) *Genes Immun* **4**, 40-45
16. Gerard, A., Ghiotto, M., Fos, C., Guittard, G., Compagno, D., Galy, A., Lemay, S., Olive, D., and Nunes, J. A. (2009) *J Immunol* **182**, 7681-7689
17. Nunes, J., Klasen, S., Ragueneau, M., Pavon, C., Couez, D., Mawas, C., Bagnasco, M., and Olive, D. (1993) *Int Immunol* **5**, 311-315
18. Dowler, S., Kular, G., and Alessi, D. R. (2002) *Sci STKE* **2002**, PL6
19. Mortier, E., Wuytens, G., Leenaerts, I., Hannes, F., Heung, M. Y., Degeest, G., David, G., and Zimmermann, P. (2005) *EMBO J* **24**, 2556-2565
20. Gerard, A., Favre, C., Garcon, F., Nemorin, J. G., Duplay, P., Pastor, S., Collette, Y., Olive, D., and Nunes, J. A. (2004) *Oncogene* **23**, 1594-1598
21. Firaguay, G., and Nunes, J. A. (2009) *Sci Signal* **2**, pl3
22. Freeburn, R. W., Wright, K. L., Burgess, S. J., Astoul, E., Cantrell, D. A., and Ward, S. G. (2002) *J Immunol* **169**, 5441-5450
23. Acuto, O., and Cantrell, D. (2000) *Annu Rev Immunol* **18**, 165-184
24. Shah, K., and Shokat, K. M. (2002) *Chem Biol* **9**, 35-47
25. Kitaura, J., Asai, K., Maeda-Yamamoto, M., Kawakami, Y., Kikkawa, U., and Kawakami, T. (2000) *J Exp Med* **192**, 729-740
26. Gaullier, J. M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H., and Aasland, R. (1998) *Nature* **394**, 432-433
27. Levine, T. P., and Munro, S. (2002) *Curr Biol* **12**, 695-704
28. Ramel, D., Lagarrigue, F., Dupuis-Coronas, S., Chicanne, G., Leslie, N., Gaits-Iacovoni, F., Payrastre, B., and Tronchere, H. (2009) *Biochem Biophys Res Commun* **387**, 127-131
29. Ilangumaran, S., Arni, S., van Echten-Deckert, G., Borisch, B., and Hoessli, D. C. (1999) *Mol Biol Cell* **10**, 891-905
30. Lasserre, R., Guo, X. J., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A. M., Soudja, S. M., Lenne, P. F., Rigneault, H., Olive, D., Bismuth, G., Nunes, J. A., Payrastre, B., Marguet, D., and He, H. T. (2008) *Nat Chem Biol* **4**, 538-547
31. Jones, D. R., Bultsma, Y., Keune, W. J., Halstead, J. R., Elouarrat, D., Mohammed, S., Heck, A. J., D'Santos, C. S., and Divecha, N. (2006) *Mol Cell* **23**, 685-695
32. Sbrissa, D., Ikononov, O. C., Deeb, R., and Shisheva, A. (2002) *J Biol Chem* **277**, 47276-47284
33. Ungewickell, A., Hugge, C., Kisseleva, M., Chang, S. C., Zou, J., Feng, Y., Galyov, E. E., Wilson, M., and Majerus, P. W. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18854-18859
34. Sbrissa, D., Ikononov, O. C., and Shisheva, A. (1999) *J Biol Chem* **274**, 21589-21597
35. Tronchere, H., Laporte, J., Pendaries, C., Chaussade, C., Liaubet, L., Pirola, L., Mandel, J. L., and Payrastre, B. (2004) *J Biol Chem* **279**, 7304-7312

FOOTNOTES

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Association pour la Recherche contre le Cancer (# 4202). G. Guittard was supported by fellowships from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale / Région Provence-Alpes Côte d'Azur (PACA) and the Ligue Nationale Contre le Cancer. A. Gérard was supported by fellowships from by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Ligue Nationale Contre le Cancer. We would like to thank Dr. Frédérique Michel, Dr. Jean Luc Teillaud and Dr. Or Gozani for providing some reagents.

FIGURES & LEGENDS

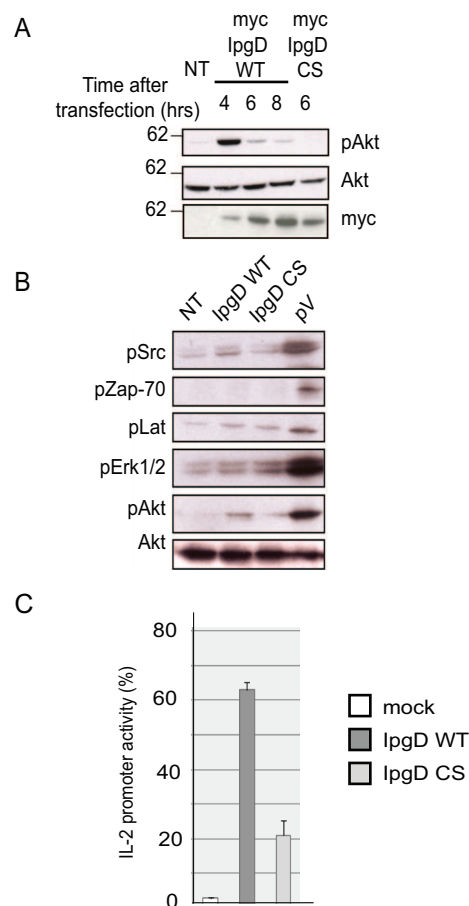


Fig. 1. T cell signalling upon PtdIns5P increase. **A** Akt is phosphorylated at ser 473 upon PtdIns5P increase. Hut-78 cells were transfected or not with myc-tagged IpgD WT or the kinase dead construct IpgD CS during indicated time. Cell lysates from Hut-78 cells were examined in parallel for Akt, Akt phosphorylation at ser 473 (PAkt S473) or myc tag by Western Blot. **B.** Specific phosphorylation induction during PtdIns5P increase. Hut-78 cells were transfected or not with myc-tagged IpgD WT or the kinase dead construct IpgD CS during 4h. Cell lysates were examined with indicated phospho-antibodies. **C.** PtdIns5P increase induce IL-2 promoter activity. Hut-78 T cells were transfected with a luciferase reporter construct for IL-2 promoter activity plus tagged-myc IpgD WT, IpgD CS constructs or empty vector (mock). Luciferase activity was measured 6 hours after transfection. Here Results are represented as the percentage of phorbol myristate acetate

(PMA) plus ionomycin treatment induction of IL-2 promoter. Data shown are the average of three independent experiments \pm s.d.

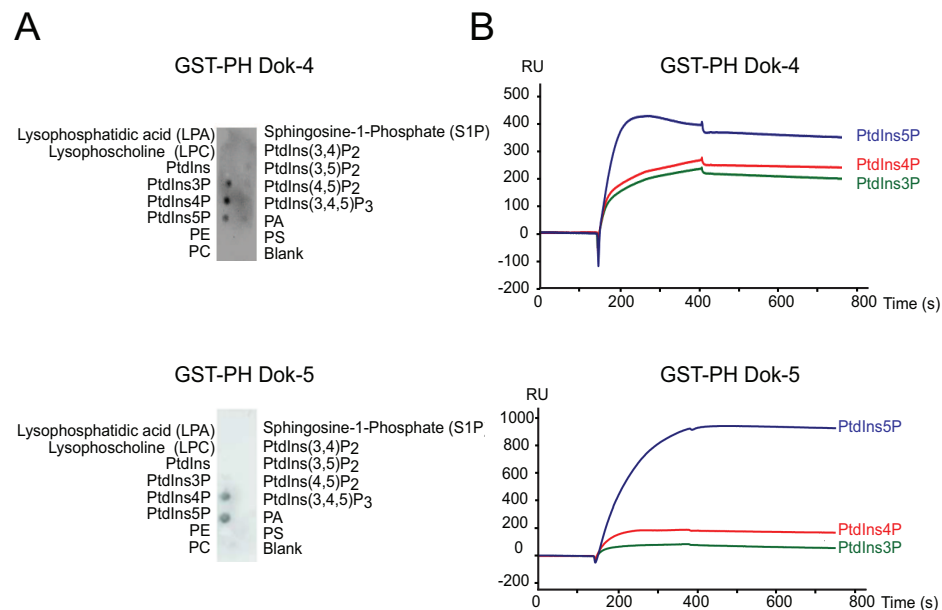


Fig. 2. Dok-4 and Dok-5 PH domain lipid binding measurement. **A.** Dok-5 PH domain binds preferentially to PtdIns4P and PtdIns5P. The PH domain of Dok-5 fused to GST were purified and incubated at 0,5 μ g/ml with PIP strips. PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine. **B.** The PH domain of Dok-4 and Dok-5 PH domains bind to PtdIns5P containing liposomes in SPR. Sensorgrams showing the binding of 1 μ M GST-PH Dok-4 (upper part) and GST-PH Dok-5 (lower part) to reconstituted liposomes containing 90% DOPC (1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, purchased from Sigma) and 10% PtdIns or mon-PtdInsPs. Note that both PH domains bind preferentially for PtdIns5P, but Dok-5 PH domain binds clearly exclusively to PtdIns5P.

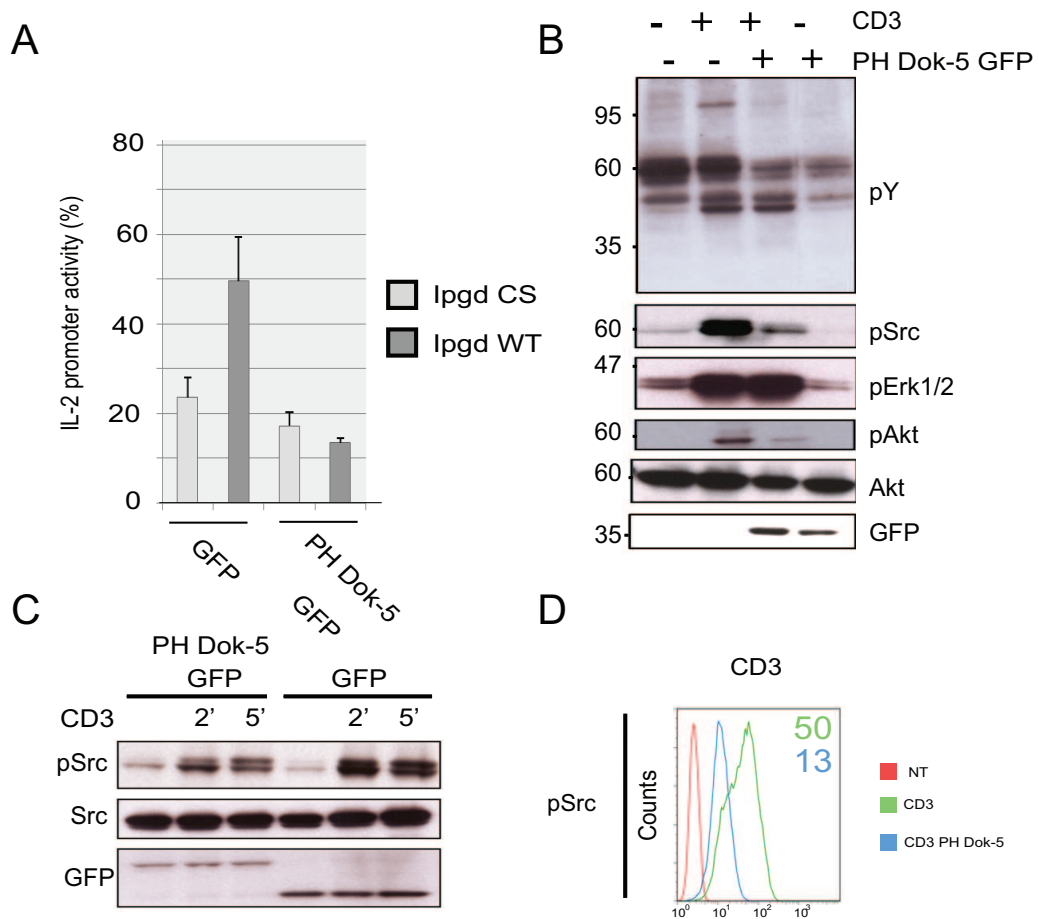
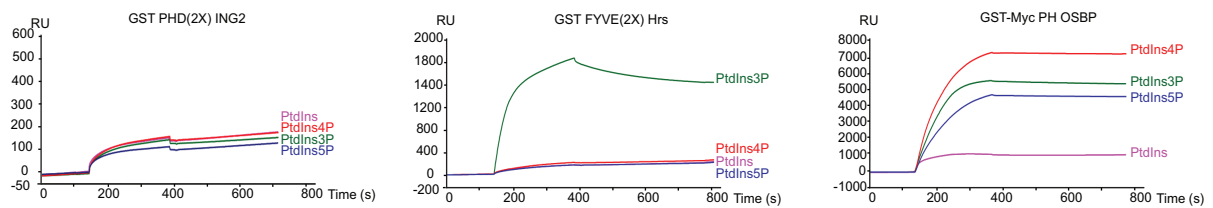


Fig. 3. Dok-5 PH expression blocks T cell signaling events .A.Dok-5 PH domain expression prevents IL-2 promoter activity induction upon PtdIns5P increase. Hut-78 T cells were transfected with a luciferase reporter construct for IL-2 promoter activity and GFP Dok-5 PH domain or GFP alone (mock) during 24hours. As indicated cells were also transfected with myc IpgD WT, IpgD CS constructs for 6 hours. L uciferase activity was measured 6 hours after transfection. Here Results are represented as a percentage of phorbol myristate acetate (PMA) plus ionomycin treatment induction of IL-2 promoter . Data shown are the average of three independent experiments \pm s.d. **B.** Dok-5 PH domain expression during T cell activation prevents signaling events. Hut-78 T cells were left unstimulated (NS) or were stimulated with CD3 mAbs for 2 min with or without GFP Dok-5 PH

domain transfection . Cell lysates were separated by SDS-PAGE and probed in Western Blot with anti phosphotyrosine (phosphotyrosine), Akt, GFP, P Akt Ser 473, P Src Y416 or P Erk-1/Erk-2 antibodies. Similar results were obtained from three independent experiments. *C.* Hut-78 T cells were left unstimulated (NS) or were stimulated with CD3 mAbs for indicated time with or without GFP Dok-5 PH domain or GFP alone transfection during indicated time. Observed results observed in 3B are the same at different time of stimulation. *D.* Dok-5 PH domain expression blocks the same signaling event in Phosphoflow cytometry as observed in Western Blot. Hut-78 T cells were left unstimulated (NS) or were stimulated with CD3 mAbs for 2 min. Depending on the case cells were transfected with or without GFP Dok-5 PH domain. Briefly, primary phosphoSrc Y416 antibodies were added with Hut-78 fixed and permeabilized cells. Then, biotinylated secondary antibodies specific to primary Abs IgG were applied. Finally, revelation is performed using Streptavidin-PE solution. GFP Dok-5 PH domain expression reduce notably PhosphoSrc Y416 signal.

Supplemental figure.



As positive controls, different known monophosphorylated-PIs protein interactors were tested in SPR, GST 2X-FYVE Hrs (1), GST-PH OSBP (2) and 2X PHD ING-2 (3) which bind respectively to PtdIns3P, PtdIns4P and PtdIns5P. Here is represented absolute binding for each probe. The binding of 4 μ M for GST PHD-ING2 was tested, whereas 1 μ M was used for other probes. In our experiments, 2X PHD ING-2 fusion proteins failed to bind monoPtdIns and PtdIns *in vitro* contrary to other fusion proteins control.

1. Gaullier, J. M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H., and Aasland, R. (1998) *Nature* 394, 432-433
2. Levine, T. P., and Munro, S. (2002) *Curr Biol* 12, 695-704
3. Gozani, O., Karuman, P., Jones, D. R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A. A., Baird, C. L., Zhu, H., Field, S. J., Lessnick, S. L., Villasenor, J., Mehrotra, B., Chen, J., Rao, V. R., Brugge, J. S., Ferguson, C. G., Payrastra, B., Myszka, D. G., Cantley, L. C., Wagner, G., Divecha, N., Prestwich, G. D., and Yuan, J. (2003) *Cell* 114, 99-111

Discussion et résultats complémentaires

Notre première étude nous avait permis de montrer une augmentation de PtdIns5P dans l'activation lymphocytaire T, ainsi qu'une régulation particulière des protéines Dok-1 et Dok-2. Notre objectif dans cette seconde étude a été d'élucider plus largement le rôle du PtdIns5P suite à une stimulation du TCR. Sa production précoce au niveau du TCR, nous permettait d'envisager une régulation d'acteurs proximaux de cette réponse. Le fait de retrouver AKT phosphorylé suite à l'expression d'IpgD nous permet de valider notre approche en utilisant IpgD comme outil pour l'observation d'évènements de signalisation, dans un modèle cellulaire T. La phosphorylation de la tyrosine activatrice des Src kinases, nous permet d'envisager une régulation positive de cet enzyme et donc de la réponse T de manière très précoce. De plus, l'activation du promoteur de l'IL-2 suite à cette augmentation de PtdIns5P nous permet d'envisager également un rôle dans l'induction génique et la sécrétion cytokinique du lymphocyte T. Enfin, l'utilisation du PH de Dok-5 permet de contrebalancer ces effets observés ceci confirmant l'effet spécifique du PtdIns5P dans ces phénomènes. D'ailleurs, j'ai réalisé des constructions de sondes pour la localisation du PtdIns5P utilisant les propriétés de la protéine Dok-5. De plus, il pourrait être intéressant de définir de manière plus extensive les évènements de phosphorylations engendrés par cette augmentation de PtdIns5P dans le lymphocyte T. Les résultats complémentaires suivants, n'ont pas été inclus dans l'article, mais montrent la démarche entreprise pour répondre à ces questions.

Localisation du PH de Dok-5

Comme dans la première étude, l'intérêt d'avoir un outil spécifique de ce PtdIns5P est d'une part son utilisation en tant que sequestrateur spécifique, mais d'autre part, va permettre sa localisation. Nous avons ainsi ici également construit des sondes du PH-Dok-5 couplées aux protéines fluorescentes GFP ou mCherry (Shaner et al., 2004). L'expression de cette sonde est, à l'image du 2X-PH de Dok-2, essentiellement membranaire. Tandis que de l'expression de la protéine entière Dok-5 se localise au niveau de compartiments punctiformes dispersés dans toute la cellule ainsi qu'au niveau membranaire (Fig.30). Ce type de localisation punctiforme ressemblant fortement aux marquages endosomaux observés lors de l'utilisation de sondes spécifiques du PtdIns3P, comme lors de l'utilisation du domaine FYVE de la protéine EEA1 (cf. Fig.9).

L'expression du domaine PH de Dok-5 GFP semble presque exclusivement restreinte à la membrane plasmique suggérant également comme pour la sonde 2x PH Dok-2 un marquage du PtdIns(4,5)P₂ abondant au niveau de la membrane plasmique. Cependant, la sonde mCherry présente un marquage relativement similaire à celui observé pour la protéine entière, même si là aussi, une grosse partie de cette sonde s'accumule au niveau membranaire (Fig.31). La différence d'expression entre les deux sondes GFP ou mCherry, peut s'expliquer par deux faits, d'une part, de l'oligomérisation due aux protéines GFP par rapport aux nouvelles protéines fluorescentes identifiées telles que mCherry qui restent quant à elles monomériques (Shaner et al., 2004), d'autre part, l'émission de fluorescence qui semble plus intense pour la protéine mCherry par rapport à la protéine GFP (Shaner et al., 2004). Nous avons ainsi utilisé plus intensément cette sonde PH Dok-5 mCherry lors de nos expériences en immunofluorescence.

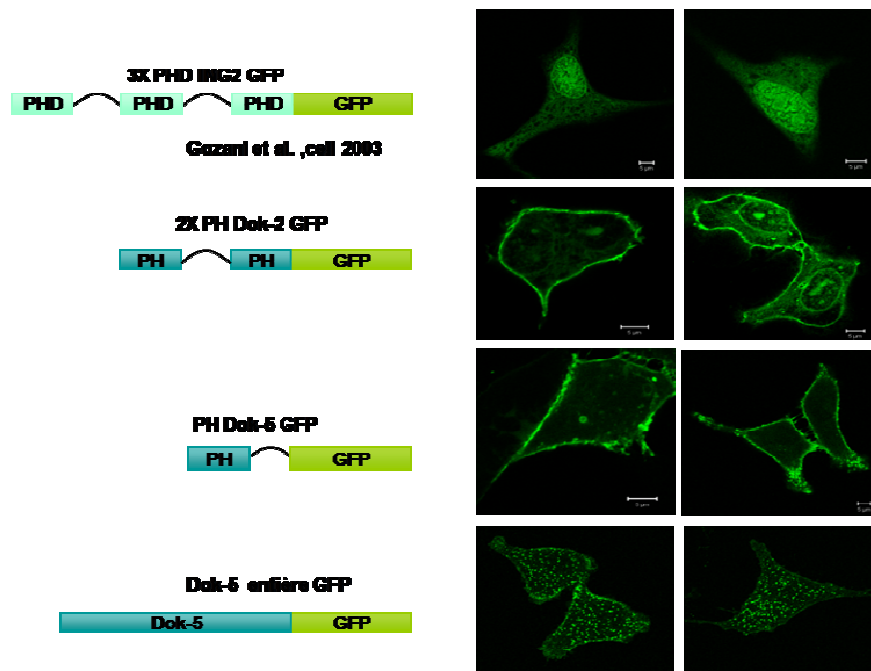


Fig 30. Expression des constructions reconnaissant le PtdIns5P en cellules HeLa. Transfections pendant 24h des constructions 3xPHD ING2 GFP, 2xPH Dok-2 GFP, PH Dok-5 GFP et Dok-5 GFP entier par lipofection.

Nous avons également réalisé des expériences de co-expression avec IpgD WT ou CS dans des cellules HeLa. Dans ces expériences, nous avons utilisé des enzymes couplées au GFP pour valider leur expression. Cependant, il faut souligner la faible expression de ces constructions dans notre modèle cellulaire. Comme observé dans la figure, l'expression d'IpgD WT GFP va permettre la relocalisation de notre sonde PH-Dok-5 mCherry presque exclusivement au niveau de ces compartiments punctiformes, décollant là aussi la sonde de la membrane, tandis que ce n'est pas ou

peu le cas lors de l'utilisation de la sonde IpgD CS GFP (Fig.31). L'ensemble de ces observations ne permettant pas réellement de trancher entre toutes nos observations. En effet, nous nous attendions ici aussi à un effet plutôt inverse dans la localisation de cette sonde. Vu les augmentations de PtdIns5P observées sous différents RTKs ou comme dans notre étude sous le TCR, on aurait pu imaginer une localisation du PtdIns5P au niveau membranaire lors de sa production. Ce genre de localisation laisse ainsi à penser que notre sonde pourrait éventuellement reconnaître un autre ligand tel que le PtdIns(4,5)P₂ ou se fixer de manière aspécifiques aux phospholipides membranaires. Cependant, on peut également imaginer que la localisation d'IpgD (dans nos expériences, plutôt cytoplasmique) va provoquer cette relocalisation de la sonde qui n'est pas une relocalisation « normale » du PtdIns5P de par l'expression diffuse d'IpgD WT GFP. Afin de valider notre sonde *in vivo*, il pourrait ainsi être intéressant d'utiliser des sondes IpgD localisé dans des compartiments précis tels que la membrane plasmique, et voir si le sonde PH Dok-5 est recrutée spécifiquement dans ces compartiments. L'utilisation d'enzymes comportant un site de mirystoylation ou d'enzymes relocalisés au niveau de la membrane plasmique de manière rapamycin-inductible, pourrait également être envisagée (Varnai et al., 2006).

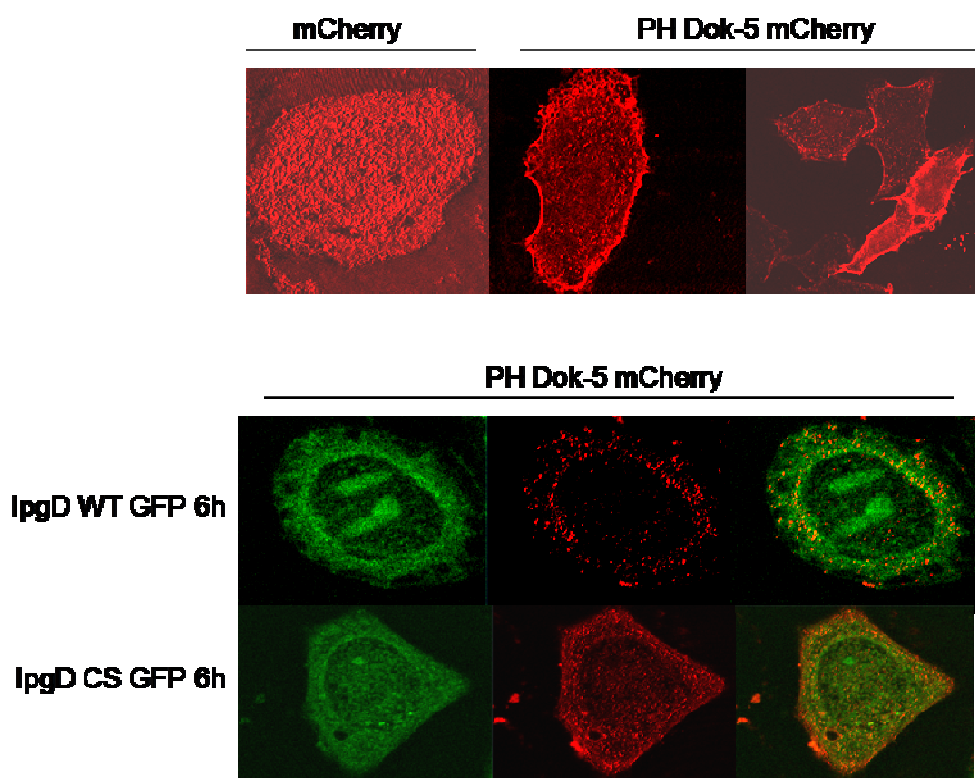


Fig.31. Relocalisation de la sonde PH Dok-5 mCherry en présence d'IppD.
Les cellules HeLa ont été transfectées (lipofectamine) avec le PH Dok-5 mCherry pendant 24h.18h après la première transfection, une deuxième transfection est réalisée pendant 6h avec la construction IppD WT ou CS (phosphatase-dead) « étiquetée » GFP.

Il faudrait également à l'avenir tenter des expériences de relocalisation de notre sonde suite à divers stimulus. Dans notre cas, il serait important de tenter des expériences de contact cellule T- APC en présence du PH de Dok-5, par exemple dans des T primaires stimulées par des APCs (Cellules dendritiques), ou plus simplement via l'utilisation de « capping » CD3 dans nos modèles cellulaires T, HUT-78.

En tout état de cause, les résultats préliminaires observés *in vivo* pour cette sonde pourtant prometteuse *in vitro*, ne permettent pas de conclure pour une localisation précise de pools de PtdIns5P dans les compartiments cellulaires ou à la membrane plasmique. Cependant, il faut tout de même souligner que notre observation à l'état basal au niveau membranaire et punctiforme au niveau du cytosol ressemblant à un marquage de type endosomal, colle relativement bien à l'hypothèse faite précédemment que le PtdIns5P se trouverait localisé au niveau des endosomes tardifs et à la membrane plasmique, ou peut être au niveau d'un compartiment intermédiaire important pour le trafic, tels que les exosomes ou les lysosomes (Lecompte et al., 2008). Même si cette dernière étude découle d'une étude phylogénétique, il n'en reste pas moins que la localisation

du PH-Dok 5 mcherry est troublante. Il faudrait ainsi à l'avenir continuer la caractérisation de cette sonde *in vivo*.

Phosphorylations dépendantes de l'augmentation du PtdIns5P dans le lymphocyte T

Comme observés dans notre étude, les Src kinase et AKT sont phosphorylés suite à une augmentation de PtdIns5P ou sous une stimulation TCR. L'expression du PH Dok-5 lors d'une stimulation TCR nous permet de voir en Western Blot, une certaine inhibition de la phosphorylation de ces protéines, nous avons d'ailleurs observés ce même résultat par cytométrie de flux (Phosphoflow analysis), même s'il semble plus difficile à observer cet effet pour la phosphorylation d'AKT. De manière intéressante, cette inhibition est retrouvée également lors d'un traitement au pervanadate (pV) de nos cellules. Une étude récente faisait état d'une production de PtdIns5P suite à un traitement au pervanadate de cellules Hela (Wilcox and Hinchliffe, 2008) (Fig.32). Notre étude suggère ainsi que la production de PtdIns5P va cibler spécifiquement les protéines Src, AKT, Dok-1 et Dok-2, suggérant ainsi un modèle de régulation original dont nous discuterons par la suite.

Enfin, il reste étonnant de voir également que l'utilisation du PH de Dok-5 va inhiber la tyrosine phosphorylation TCR induite ou *via* le traitement au pV. Cette observation suggère un impact important du PtdIns5P sur les phénomènes de tyrosine phosphorylations cellulaires. Ainsi, suite à cette observation nous avons entrepris une étude en spectroscopie de masse. Le but de cette expérience est la détection de tous les peptides phosphorylés sur résidus tyrosine, sérine ou thréonine, suite à une augmentation de PtdIns5P induite par IpgD WT dans nos cellules HUT-78. Pour le moment, nos échantillons sont en cours de traitement par nos collaborateurs (plateforme IbiSA – CRCM). Gageons qu'il ressortira de cette étude un patron de phosphorylation plus précis induit par le PtdIns5P.

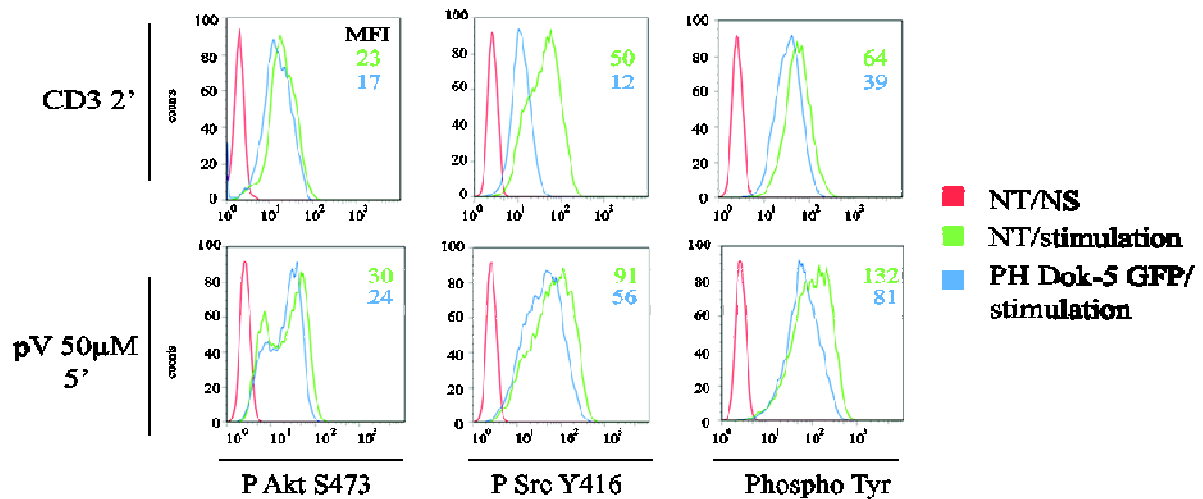


Fig.32. L'expression du PH-Dok-5 bloque les événements de phosphorylation induits par une stimulation CD3.

Les cellules HUT-78 ont été stimulées par CD3 ou non (NS) pendant 2min à 37°C. Selon le cas, les cellules ont été transfectées par une construction exprimant PH-Dok-5 GFP. La révélation de la phosphorylation s'est effectuée par cytométrie en flux (Finaguay G. et al. Sci. Signal. 2009). Brièvement, les anticorps primaires reconnaissant les protéines Akt (pSer473) (Cell Signaling Tech., # 3787), Src (pTyr416) (Cell Signaling Tech., # 2101) ou protéine tyrosine phosphorylées (Santa Cruz, sc 18832) ont été ajoutés après fixation et perméabilisation des cellules. Puis, un anticorps secondaire biotinylé a été employé reconnaissant l'isotype de l'anticorps primaire. Ce marquage est révélé par la suite en utilisant une solution streptavidin-PE.

Conclusion, perspectives :

L'ensemble de nos travaux permettant de suggérer un rôle important du PtdIns5P en tant que nouveau messenger lipidique des voies de signalisations lymphocytaires T. Nous discuterons par la suite de cette régulation originale de la réponse du TCR par le PtdIns5P. Concernant notre seconde étude, la caractérisation du PH de Dok-5 semble essentielle pour déterminer la localisation éventuelle de pools de PtdIns5P. L'utilisation de cette sonde pourra s'avérer intéressante à l'avenir pour caractériser certains nouveaux effets du PtdIns5P. Enfin, l'étude en spectroscopie de masse que nous avons entreprise pourrait permettre de caractériser plus précisément le type de régulation dépendant du PtdIns5P dans un modèle lymphocytaire T.

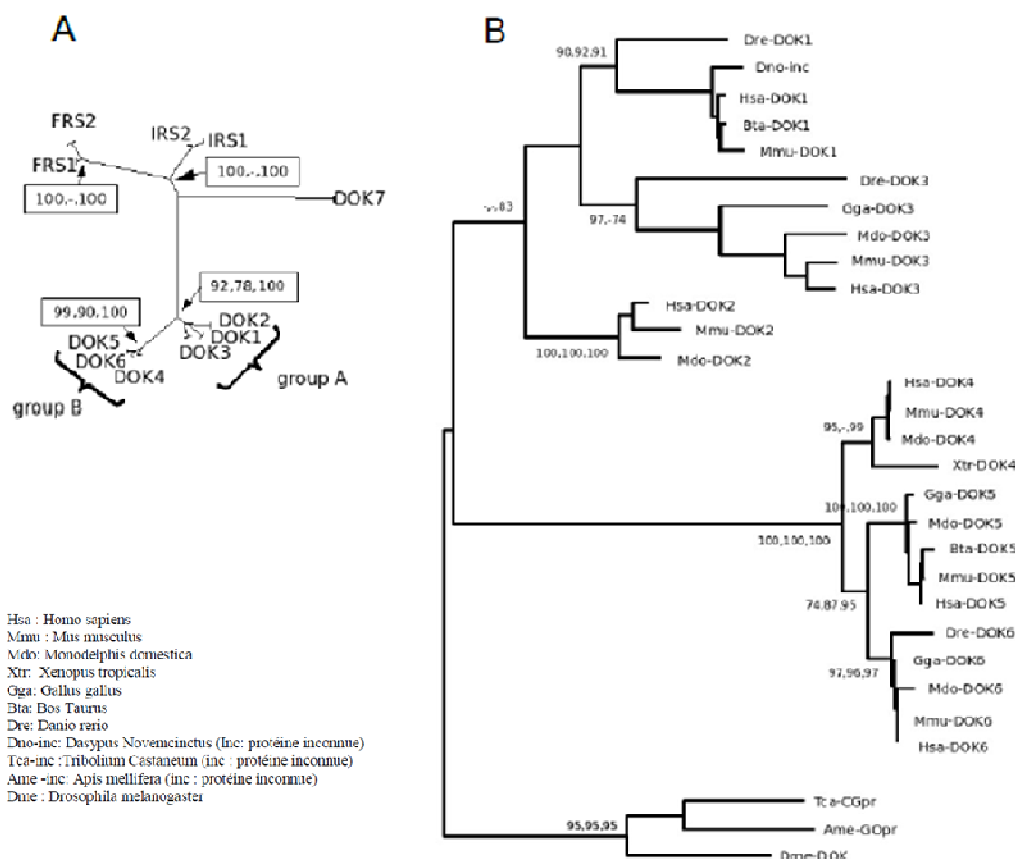


Fig.33. Étude des gènes *dok* et phylogénie identification de 2 groupes excluant DOK7.
(A) Arbre phylogénétique des membres de la famille Dok humain et murin. L'arbre est réalisé sur le domaine PTB les IRS et l'IRS servant de groupes extérieurs. Deux groupes sont dénotés groupe A et B. Les valeurs de bootstrap au noeud sont exprimées en pourcentage (la première valeur est obtenue par la méthode de maximum de vraisemblance, la deuxième par la méthode de distance et la troisième par la parcimonie). **(B)** Arbre phylogénétique inter-espèce des molécules Dok. Le groupe des insectes a été utilisé pour enraciner l'arbre. Les valeurs de bootstrap au noeud sont exprimées en pourcentage de la même manière que pour A.

Travaux du laboratoire sur la Famille Dok

Parallèlement à mes travaux principaux de thèse, il m'a été possible de pouvoir participer à deux autres études sur les membres de la famille Dok. Une première étude que je présenterai brièvement sera soumise très prochainement à publication. Une autre étude du laboratoire,

présentant Dok-4 comme un acteur inhibiteur des voies de signalisation lymphocytaire T a récemment été publiée (Gerard et al., 2009), cette étude sera présentée en annexe.

Article 3 :

Etude comparative et développementale de l'expression des gènes *dok* durant l'activation lymphocytaire T

Résumé : (étude en cours d'écriture pour soumission à *Dev. Comp. Immunol.*)

L'analyse de l'expression tissulaire et cellulaire des Dok-1 à Dok-5 montre que les membres du groupe A sont présents dans les cellules hématopoïétiques (Dok-1, Dok-2 et Dok-3) alors que les membres du groupe B sont plutôt confinés au système nerveux central (Dok-4 et Dok-5) (Crowder et al., 2004; Grimm et al., 2001). Les deux derniers membres Dok-6 et Dok-7 ont été identifiés récemment (Crowder et al., 2004; Okada et al., 2006).

Ainsi le but de cette étude est :

- l'étude et la comparaison par des arbres phylogénétiques de la famille Dok dans son ensemble, et dans différentes espèces, mais également la comparaison des structures "intron-exon" des gènes de la famille Dok (Fig.33 & 34).
- l'étude de l'expression tissulaire et cellulaire des membres de la famille à l'aide de PCR quantitative, avec notamment un focus au niveau des lymphocytes T stimulés ou non (Fig.34).

Les résultats obtenus grâce à l'étude phylogénétique et à l'analyse des structures "intron-exon" nous permettent de suggérer que Dok-7 ne ferait pas partie de la famille des molécules Dok d'un point de vue évolutif et Dok-6 constituerait quant à lui un nouveau membre du groupe B (Fig. 32 & 33). L'étude de l'expression tissulaire et cellulaire des protéines Doks révèle que tous les membres de la famille à l'exception de Dok-7 sont exprimés dans les lymphocytes T activés du sang périphérique (Fig.35). Dok-7 lui n'est exprimé que dans le cœur. Enfin, cette étude permet également d'identifier une nouvelle tyrosine phosphorylable chez les membres du groupe B.

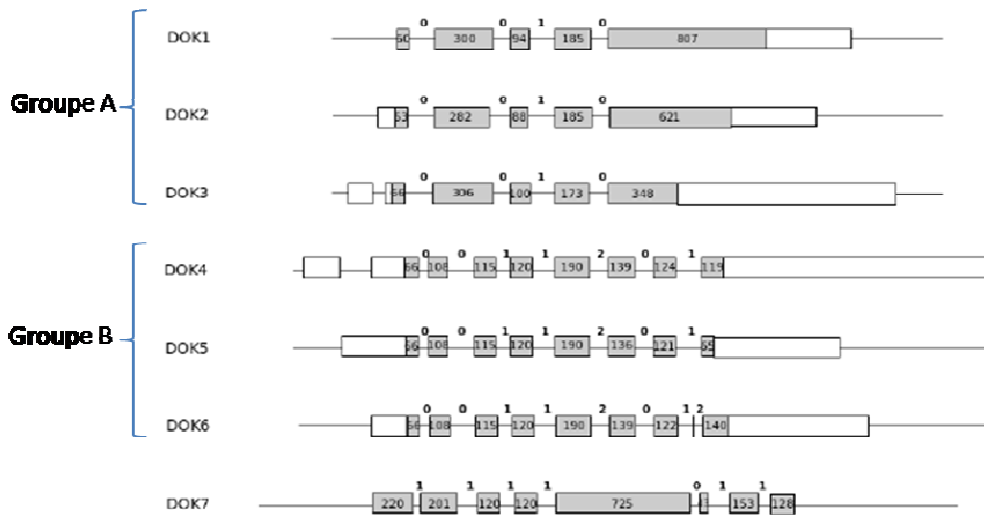


Fig.34. Schéma montrant la comparaison des structures génomiques des membres de la famille Dok chez l'homme.

Les exons sont représentés par les boîtes et les parties codantes sont en gris, les introns sont représentés par les lignes qui les relient. Les nombres dans les boîtes indiquent la longueur des exons en paire de bases. Les extrémités 5'UTR et 3'UTR ne sont pas représentées. Les introns ne sont pas dessinés à l'échelle. Les chiffres entre les boîtes indiquent les phases d'intron.

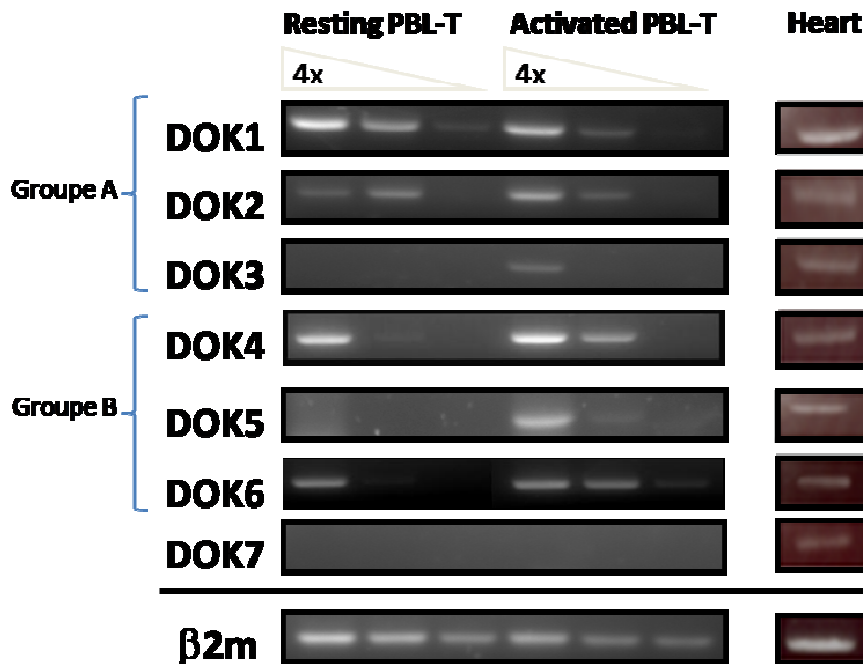


Fig.35. Expression tissulaire et cellulaire chez l'homme des gènes de la famille Dok déterminée par RT-PCR.

Dans le cas des lymphocytes T isolés à partir de sang périphérique humain (PBL-T) activés (3+28 pendant 48h) ou non, une RT-PCR quantitative a été réalisée, suivie d'une réaction de PCR avec des amorces spécifiques de chaque gène DOK, avec une dilution de la matrice de 4 fois entre chaque condition. Sur le panel de droite, on peut voir l'expression dans le cœur des divers membres de la famille Dok. La β 2-microglobuline a été utilisée comme gène contrôle positif.

Comparative and developmental study of *dok* genes expression regulated upon T cell activation.

Magda Rodrigues^{a,b,c,1}, Geoffrey Guittard^{a,b,c}, Camille Fos^{a,b,c,2}, François Coulier^{a,b,c,*} and Jacques A. Nunès^{a,b,c,*}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, F-13009, France ; ^b Institut Paoli-Calmettes, Marseille, F-13009, France ; ^c Univ Méditerranée, F-13007, Marseille, France.

Running title: DOK genes and T cell activation

* Equal contribution, to whom the correspondence should be addressed, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, INSERM UMR 891, 27 bd Leï Roure, 13009 Marseille, France. Tel: 33 491 758 414, Fax: 33 491 260 364, E-mail address: francois.coulier@inserm.fr, jacques.nunes@inserm.fr

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Association pour la Recherche sur le Cancer (# 4202). G. Guittard was supported by fellowships from the Inserm / Région Provence-Alpes Côte d'Azur and the Ligue Nationale Contre le Cancer. C. Fos was supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Fondation pour la Recherche Médicale.

¹Current address: INSERM, U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Section Dynamique moléculaire des interactions lymphocytaires, Toulouse, France.

²Current address: La Jolla Institute for Allergy & Immunology, Division of Cellular Biology, 9420 Athena Circle Drive, La Jolla, CA 92037, USA.

Abstract

Among the adaptor proteins involved in lymphocyte activation, Dok (for downstream of tyrosine tyrosine kinases) proteins are considered as negative regulators. Dok-1, Dok-2, Dok-3 and Dok-4 are both tyrosine phosphorylated in response to lymphocyte stimulation and they inhibit lymphocyte activation. Finally, seven Dok proteins (Dok-1 to Dok-7) have been reported. Here, we classify these seven DOK genes based on analysis of phylogenetic trees and exon/intron structure. Two groups can be draw, group A including DOK1, DOK2 and DOK3 and group B including DOK4, DOK5 and DOK6. However, DOK7 cannot be linked to the other DOK genes. These two groups are also present in invertebrates. Moreover, a novel tyrosine based motif can be identified in the group B across all the species.

All the members of the group B are expressed in T cells, especially in activated T cells. Perhaps their expression in activated T cells correlates with the ability to downregulate cellular activation, similar to the group A of Dok proteins.

Discussion générale et perspectives

Ce travail a confirmé l'importance de ces molécules adaptatrices Dok dans la mise en place de boucles de rétrocontrôle dans l'encodage du signal induit par le récepteur à l'antigène. Mes travaux de thèse se sont ainsi tournés vers l'analyse de la spécificité des domaines PH des membres de la famille de Dok présents dans le lymphocyte T. La recherche de partenaires phospholipidiques ces domaines PH, a permis d'identifier un nouveau médiateur lipidique dans la signalisation lymphocytaire T, lePtdIns5P. Ce phosphoinositide monophosphorylé apparaît comme un ligand de ces domaines PH des molécules Dok, spécialement du domaine PH de Dok-5. Nos études ont permis de découvrir de nouveaux outils qui aideront à la caractérisation ce nouveau messenger cellulaire. Pour la première fois, des augmentations de PtdIns5P ont été détectées lors de l'activation cellulaire T. Un vaste champ d'investigation s'ouvre à nous pour définir précisément l'impact de ce PtdIns5P dans les voies de signalisations lymphocytaires T. Gageons que nous avons pu ouvrir une brèche pour comprendre de nouveaux mécanismes et pourquoi pas de nouvelles régulations qui s'avèreront essentielles dans certaines fonctions importantes du lymphocyte T.

Modèle d'activation des molécules Doks par le PtdIns5P

Lors de l'engagement du TCR, une production de PtdIns5P et une phosphorylation sur résidus tyrosine des molécules Dok-1 et Dok-2 de manière très rapide (<2min) sont détectées (Guittard et al., 2009). Si nos données montrent l'association entre le domaine PH de ces molécules avec le PtdIns5P, nous n'avons pas pu conclure si ces interactions interviennent dans le recrutement de ces molécules adaptatrices au niveau de la membrane plasmique. Cependant la présence de ces domaine PH reste essentielle à la phosphorylation des molécules Dok-1 et Dok-2.

Ainsi à la suite de notre étude, nous pouvons extrapoler un modèle de régulation présenté dans la figure 36, où le PtdIns5P serait à la base de la régulation de la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2, ceci étant dépendant du domaine PH de ces molécules. Restent cependant plusieurs questions en suspens à la suite de cette étude, d'une part quelle PTK pourrait être responsable de la phosphorylations des molécules Doks. Mais surtout quel est le mécanisme qui engendre la production de PtdIns5P ? La production de PtdIns5P est-elle postérieure ou antérieure à la phosphorylation des motifs ITAMs du TCR permettant induire les complexes d'initiation du signal activateur T ?

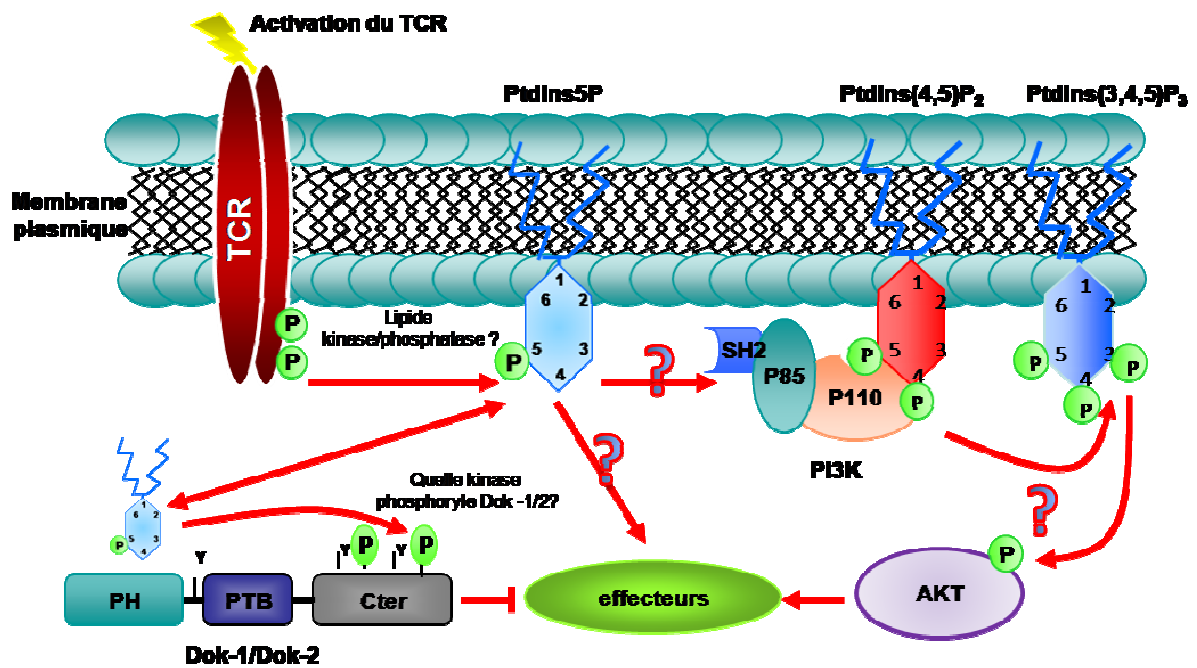


Fig 36. Modèle de régulation des molécules Dok-1 et Dok-2 par le PtdIns5P suite à une stimulation du TCR.

Sur les bases de nos travaux (Guittard G. et al., J. Immunol. 2009), les questions principales sont

- le mode exact de recrutement de Dok-1 et Dok-2 (directement par le PtdIns5P?),
- la PTK qui phosphoryle Dok-1 et Dok-2 ?
- Quel enzyme métabolise le PtdIns5P?
- Quels sont les autres effecteurs du PtdIns5P? (Akt retrouvé phosphorylé dans les cellules épithéliales (Pendaries et al. 2006), semble le candidat le plus probable).

Nature des PTKs impliquées dans la phosphorylation des protéines Dok

Le fait que le domaine PH de Dok-1 et Dok-2 ne reconnaisse pas le PtdIns(3,4,5)P₃ lors de nos études *in vitro*, implique que les protéines Doks semblent phosphorylées via un mécanisme PI3K-indépendant, d'ailleurs diverses expériences réalisées au laboratoire sous divers stimuli en présence d'inhibiteur de la PI3K n'a pas engendré de différence de phosphorylation de Dok-1 (données non publiées). Cependant, Dok-1 est capable d'être phosphorylé par des PTKs qui peuvent être régulées par la voie PI3K, les PTKs de la famille Tec qui contiennent un domaine PH sensible aux augmentations de PtdIns(3,4,5)P₃ (Gerard et al., 2004; Yang et al., 2001). Cependant d'autres PTKs dont leur régulation ne dépend pas de l'activation de PI3K, sont présentes dans le lymphocyte T : les membres de la famille Src, en particulier Lck et Fyn (Nemorin and Duplay, 2000) ou Abl (Gu et al., 2007; Master et al., 2003). Il serait intéressant de tester l'impact de notre PtdIns5P sur l'ensemble de ces candidats potentiels, cela dit, l'étude réalisée par la suite montre que Lck et Fyn restent les candidats principaux pour la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 induits par l'augmentation de PtdIns5P dans les cellules T.

Enzymes responsables de la production de PtdIns5P suite à l'engagement du TCR

Trois types d'enzymes eucaryotes ont à ce jour été identifiés pour la production de PtdIns5P : la 5-kinase PIKfyve , les 3-phosphatases (MTM1, MTMR2 ou MTMR3) et les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases de types I et II (cf Introduction – partie II). Vu la rapidité d'apparition du PtdIns5P lors de la stimulation du TCR, notre hypothèse irait plutôt vers un enzyme capable de générer du PtdIns5P au niveau de la membrane plasmique. Cependant, PIKfyve ainsi que les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases de types I et II ne semblent exprimées qu'au niveau cytoplasmique notamment dans les membranes endosomales. Ce type de localisation quasi exclusive ne permet pas d'en faire de bons candidats pour la production précoce de PtdIns5P suite à une stimulation du TCR.

En revanche, concernant les enzymes de la famille des MTMs (myotubularines), un recrutement au niveau de compartiments spécifiques de la membrane plasmique de la myotubularine a été identifié (Laporte et al., 2002). Ce recrutement semble dépendant de l'activation de la protéine Rac et/ou de la PI3K. Il semble cependant difficile d'imaginer le recrutement de cette enzyme au niveau de la membrane plasmique étant donné notamment, la faible quantité voire l'absence de ses substrats PtdIns3P et notamment du PtdIns(3,5)P₂ qui serait le substrat essentiel pour la production de PtdIns5P par les MTMs. Cependant, les auteurs de cette étude suggèrent que ce recrutement pourrait être dû à une association avec la PI3K ou des GEFs. De plus, il a été fait état d'une production massive de PtdIns5P, dans les cellules T Jurkat suite à la transfection de MTM1 (Tronchere et al., 2004), même si ce résultat ne nous permet pas d'apprécier la localisation des pools de PtdIns5P générés, ceci reste les seules données publiées concernant le lymphocyte T permettant d'envisager la production de PtdIns5P par des enzymes eucaryotes déjà identifiées.

Les connaissances actuelles ne permettent pas à mon avis de déterminer quelle enzyme sera capable de synthétiser le PtdIns5P au niveau de la membrane plasmique. L'hypothèse la plus plausible reste cependant la production de PtdIns5P à partir des pools de PtdIns(4,5)P₂ en abondance au niveau de la membrane plasmique, par une 4-phosphatase, à l'image d'IpgD ou de ses orthologues les PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatases de types I et II. Cependant rien ne nous permet actuellement d'envisager une telle hypothèse. Etant donné la localisation intracellulaire de cette dernière, enzyme il ne semble pas possible de trouver un recrutement au niveau de la membrane plasmique.

Cela dit, il a déjà été fait mention auparavant de recrutement de lipides kinases au niveau des membranes plasmiques suite à une activation du TCR par un anticorps anti-CD3. Il a d'ailleurs été montré une association de PI4KII β avec les chaînes ζ du CD3 suite à une stimulation du TCR (Srivastava et al., 2006). L'idée suggérée est ainsi est que PI4KII β ferait partie intégrante du signal de transduction sous le TCR après activation (Fernandis and Subrahmanyam, 1998; Inokuchi and Imboden, 1990). Cela a d'ailleurs également déjà été suggéré pour la PI3K sous les chaînes ζ du TCR (Exley et al., 1994), de plus un recrutement des sous-unités adaptatrices de la PI3K IA est visible lors de l'engagement du TCR (Fabre et al., 2005). On pourrait pourquoi pas imaginer le même type de mécanisme pour le recrutement de l'enzyme responsable de la synthèse de PtdIns5P suite à une stimulation via le TCR.

En tout état de cause, nous ne pouvons qu'imaginer à ce jour les éventuels enzymes agissant sur la production de PtdIns5P dans le lymphocyte T, il n'en reste pas moins que plusieurs indices font des enzymes MTMs les candidats les plus sérieux pour le moment, étant donné que leur expression dans le lymphocyte T provoque la production de PtdIns5P, mais également leur recrutement possible au niveau membranaire suite à une activation de la PI3K. Il n'en reste pas moins étonnant qu'une telle voie soit responsable de la production de PtdIns5P. Il serait intéressant de tester la fonction et la localisation de ces diverses enzymes candidates dans un modèle cellulaire T suite à l'engagement du TCR.

Le PtdIns5P, un inducteur des voies de transduction cellulaire T

D'après nos données non publiées, il semblerait que le PtdIns5P soit capable d'agir sur des voies de signalisations clés telles que la voie PI3K/AKT et la voie des Src kinases. Comme on l'a vu précédemment, il n'y a que peu de données concernant la régulation réelle de la PI3K sous une stimulation du TCR. En revanche la régulation des Src kinases est relativement bien établie, et apparaît activée de manière très précoce lors de l'activation du TCR, pour aboutir à la phosphorylation des motifs ITAMS et engendrer l'activation de complexes de signalisation. L'augmentation de PtdIns5P dans le lymphocyte T pourrait provoquer :

- Soit l'activation de ces deux voies se fait de manière indépendante, à savoir la PI3K est activée par un mécanisme indépendant des Src kinases, par exemple le recrutement par un corécepteur du TCR tel que CD4 (Prasad et al., 1993b), par d'autres récepteur tels que TRIM (Bruyns et al., 1998) ou des protéines transmembranaires telles que LAT (Fukazawa et al., 1995).

- Soit on peut imaginer un mode de régulation de la PI3K Src dépendant, ceci de manière directe, il a notamment été montré que la kinase Lck pouvait recruter la PI3K au niveau du corécepteur du TCR CD4, ceci par l'intermédiaire du domaine SH3 de Lck se liant aux motifs proline riches de la sous unité p85 de la PI3K (Prasad et al., 1993b). Ou un recrutement de manière indirect *via* ses domaines SH2 par des partenaires phosphorylés au préalable par les Srcs kinases, comme par exemple la fixation de p85 à ZAP-70 ou aux diverses chaînes CD3 phosphorylées comme le TCR ζ (Exley et al., 1994) et les chaînes CD3 γ, δ, ϵ (de Aoz et al., 1997; Osman et al., 1996).

Il apparaît cependant beaucoup plus probable que les Src kinases, une fois activées, agissent sur le recrutement et l'activité de la PI3K, vraisemblablement de manière indirecte. On aurait pu imaginer un autre type de régulation avec la PI3K régulant l'activité des Src kinases. Cependant, cette hypothèse ne semble pas possible pour diverses raisons évidentes, notamment l'inhibition de la PI3K, n'empêche pas la synapse immunologique de se mettre en place et n'inhibe pas certains événements liés à l'activation, comme l'augmentation des tyrosines phosphorylées, l'expression de CD25 ou la production d'IL-2 (Costello et al., 2002; Harriague and Bismuth, 2002). Ainsi il semble acquis que si ces deux voies ne sont pas indépendantes, les Src kinases seraient bien évidemment en amont des PI3K.

De plus, la phosphorylation des molécules Dok, quoique précoce, semblerait cette fois-ci sans nul doute dû à l'activation des Src kinases. Cette phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 apparaît par ailleurs indépendante de la voie PI3K (données non publiées). En tout état de cause il semblerait ainsi que les Src kinases agissent comme un interrupteur de la signalisation du TCR certes, mais également il semblerait que le PtdIns5P puisse jouer un rôle, du moins en partie, sur l'activité de ces Src kinases, car la présence d'IpgD dans les cellules T, est capable d'induire une augmentation de phosphorylation du résidu tyrosine logé dans la boucle d'activation de ces PTKs.

Le fait que la production de PtdIns5P soit suffisante pour induire une activité des Src kinases laisse à penser que la production de PtdIns5P serait antérieure à l'activation des Src kinases. Par conséquent il s'agit de s'intéresser, à la nature du mécanisme responsable d'un tel phénomène, et surtout par quel moyen la lipide/kinase phosphatase capable de synthétiser le PtdIns5P va se retrouver recrutée suite à l'activation du TCR (Fig.37).

Il existe des précédents de recrutement d'enzyme du métabolisme des phosphoinositides au niveau notamment du TCR ζ ceci dans un contexte activé (Exley et al., 1994 ; Srivastava et al., 2006). Or si dans notre modèle, le PtdIns5P est produit avant l'activation des Src kinases cela implique qu'un tel

recrutement ne serait pas possible dans un premier temps. D'autres types de régulation de ces enzymes doivent être envisagés, par exemple les recrutements par des co-récepteurs tels que CD4 ou directement par Lck (PI4KII β ,PI3K,...) (Fernandis and Subrahmanyam, 2000; Pertile and Cantley, 1995 ; Prasad et al., 1993b).

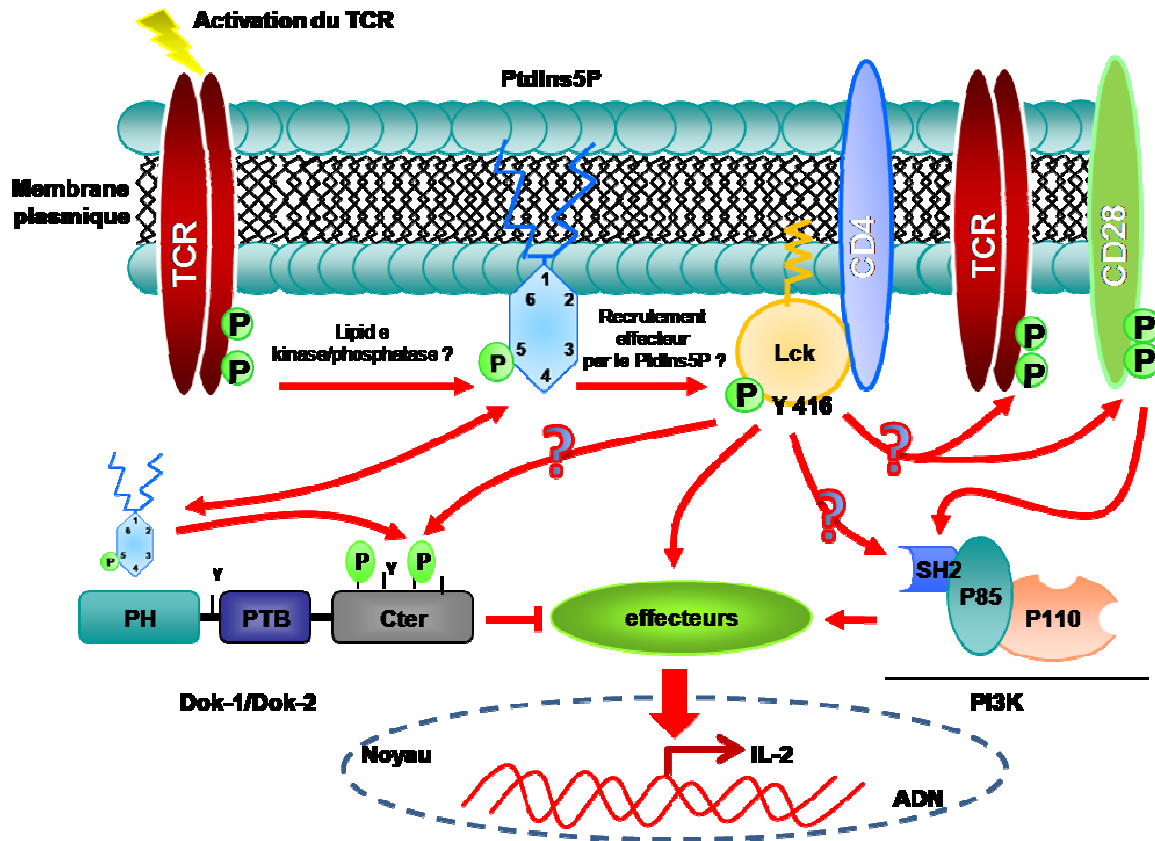


Fig.37. Le PtdIns5P un nouveau messager clé des voies de signalisation sous le TCR: hypothèses.
 A la suite de nos travaux on peut identifier quatre cibles du PtdIns5P dans la cellule T: Dok-1 et Dok-2, ainsi que la voie PI3K/AKT et les Src kinases. La phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 semble Src-dépendante. Le mode de régulation des Src kinases et de la voie PI3K/AKT est pour le moment inconnu. L'idée la plus probable serait une régulation Src dépendante de la voie PI3K/AKT. Ainsi les Src Kinases seraient en amont des activations induites par le PtdIns5P. Reste cependant à savoir le mode d'activation de cette kinase par le PtdIns5P. L'une des hypothèse qui peut être suggérée est le recrutement d'un effecteur intermédiaire par le PtdIns5P au niveau de la membrane qui va agir directement ou via le recrutement d'une kinase/phosphatase sur l'activité de Src. On peut également se demander l'impact que pourrait avoir une augmentation de PtdIns5P sur la phosphorylation des motifs ITAM des récepteurs du TCR ou sur d'autres corécepteurs activateurs, tels que CD28, qui pourrait permettre la production de PtdIns5P.

Quant au mécanisme d'action engendrant l'activité des Src kinases via l'augmentation des taux de PtdIns5P, il semble relativement prématuré d'extrapoler un mécanisme précis. On peut cependant envisager simplement le recrutement d'une protéine à domaine PH reconnaissant le PtdIns5P, influant de manière positive sur l'activité des Src kinases. Un candidat pourrait être la protéine SKAP55 par exemple, qui possède un domaine PH central. Cette protéine est recrutée au niveau de

la membrane plasmique sous la phosphatase transmembranaire CD45 suite à une stimulation TCR dans les cellules Jurkat (Wu et al., 2002). SKAP55 ferait ainsi le lien entre CD45 et les Src kinases, auxquelles elles se lient, pour engendrer la déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice des Src kinases permettant ainsi l'ouverture de la molécule et leur permettant de se transphosphoryler et donc de s'activer (Wu et al., 2002). Bien entendu ce mécanisme reste totalement hypothétique, mais a pour objet d'illustrer qu'une telle régulation reste possible par le PtdIns5P.

Enfin, l'augmentation de PtdIns5P va ainsi permettre l'activation d'une part de voies de transductions activatrice sous le TCR, mais également va permettre la mise en place de signaux inhibiteurs ou en tout cas, régulateurs de cette activation. D'ailleurs, il semble étonnant dans notre étude que l'activation des Src kinases ne permet pas la phosphorylation d'événements en aval des Src kinases telles que celles de ZAP-70 ou LAT. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que Dok-1 et Dok-2 soient déjà retrouvés activés par l'augmentation de PtdIns5P. En effet, il a récemment été fait état d'un contrôle négatif des molécules Dok-1 et Dok-2 notamment sur Zap-70 et son substrat LAT (Dong et al., 2006). En tout état de cause, il semble que le PtdIns5P émerge comme un messager non négligeable des voies de signalisation induites par le TCR.

Localisation des phosphoinositides et recherche d'outils

Le passage des données *in vitro* à *in vivo* reste relativement controversable et difficile à apprécier quant on parle de découvrir une nouvelle sonde sur les phosphoinositides. L'analyse *in vitro* nécessite souvent plusieurs confirmations avant de pouvoir déterminer la réelle affinité d'un domaine pour son ligand lipidique. De plus, chaque technique employée va avoir sa part d'inconvénients, ainsi le but sera d'éliminer le plus de bruit de fond possible pour déterminer une spécificité relative, quant on utilise les Fat-Blots par exemple ou plus quantitative lorsque l'on utilise la SPR. Il existe d'autres techniques utilisant, notamment des billes recouvertes en phosphoinositides ou des liposomes, s'en suit un pull-down pour détecter les éventuels interacteur. Il est bien évident que le but dans ces techniques et de se rapprocher le plus possible de la réalité, notamment pour la technique du « liposome- binding » ou la SPR, le but est de recréer artificiellement une membrane cellulaire. Cependant il est bien évident, que ce genre de techniques présente les limites de ne pas pouvoir reproduire exactement les membranes plasmiques, avec leurs compositions en phospholipides et protéines diverses.

On peut supposer dans nos expériences, que ce passage *in vitro* à *in vivo* est clairement entravé par ces interactions que nous n'avons pas *in silico*. Ces interactions expliqueraient ainsi par

exemple la localisation au niveau membranaire de nos sondes, sans aucune stimulation. Ainsi il pourrait être intéressant, notamment dans le cas de la sonde PH Dok-5 mCherry pour augmenter sa spécificité et son affinité *in vivo* pour le PtdIns5P, d'abolir ces interactions « aspécifiques » aux protéines et autres phospholipides membranaires (liaisons électrostatiques et hydrophobes), afin d'améliorer cet outil. Vu les progrès réalisés dans la compréhension de la biologie structurale des interactions des phosphoinositides avec leur effecteurs, il semblerait possible de concevoir génétiquement de telles sondes (Lemmon, 2003, 2008). Enfin, comme on l'a essayé dans nos expériences, pour augmenter l'avidité de la sonde, une oligomérisation de la sonde peut aboutir à de très bons résultats dans certains cas (Gillooly et al., 2000; Gozani et al., 2003). Cependant dans notre étude, on peut imaginer que cela n'a fait qu'amplifier *in vivo* les liaisons aux protéines et phospholipides membranaires.

Enfin le fait que l'expression de ces domaines de liaisons puisse altérer la physiologie de la cellule, comme dans nos expériences de séquestrations, et également toucher les pools de lipides, prouve qu'il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres outils altérant moins la physiologie de la cellule. Par exemple, le développement récent d'anticorps spécifiques des phosphoinositides (PtdIns4,5P₂ essentiellement) ou encore l'utilisation de domaine de liaisons aux phosphoinositides couplés à la GST, la reconnaissance se faisant via un anticorps dirigé contre le GST (Watt et al., 2004; Watt et al., 2002). Cependant ces études se font sur des cellules fixées, ce qui permet certes d'analyser les échantillons sans contraintes de temps ou perte rapide de signal, mais engendrent là aussi son lot d'incertitudes dépendant notamment du protocole employé et plus particulièrement le mode de fixation. Une étude récente fait d'ailleurs état de l'utilité de tels outils, notamment des anticorps directement dirigés contre les phosphoinositides, mais démontre de manière étonnante les variations de localisations qui peuvent être relevé en fonction du protocole employé (Hammond et al., 2009).

En tout état de cause, l'imagerie sur des cellules vivantes « non-fixées », est devenu la technique standard pour la localisation de pools de phosphoinositides via l'utilisation de sonde protéiques spécifiques. D'ailleurs les progrès importants réalisés viennent notamment du fait d'une amélioration de la qualité des étiquettes fluorescentes, qui ne s'oligomérisent plus ou présentent moins de diffusion du signal (Shaner et al., 2004). D'autres systèmes sont d'ailleurs mis en place et actuellement en développement tels que l'association de la tétra cystéine avec les domaines de reconnaissance et une révélation qui se fera *via* une « coloration » au biarsenic, en rouge ReAsh ou vert FlAsh (Zhang et al., 2002a) (Fig.38). Ce nouveau fluorochrome a l'avantage d'être beaucoup plus petit (CCPGCC), comparé aux protéines fluorescentes habituelles telles que la GFP (25 kDa),

et ne présente aucune fluorescence au repos. Cet outil est toujours en cours de développement, car il présente encore beaucoup de bruit de fond dû à l'administration du biarsenic, et nécessite l'utilisation d'un « antidote » l'éthanedithiol (EDT) pour limiter la toxicité du biarsenic non lié. Il n'en reste pas moins que le développement d'outils beaucoup plus sophistiqués n'influent que très peu sur la structure tridimensionnelle d'un domaine de reconnaissance pourrait s'avérer essentiel à l'avenir.

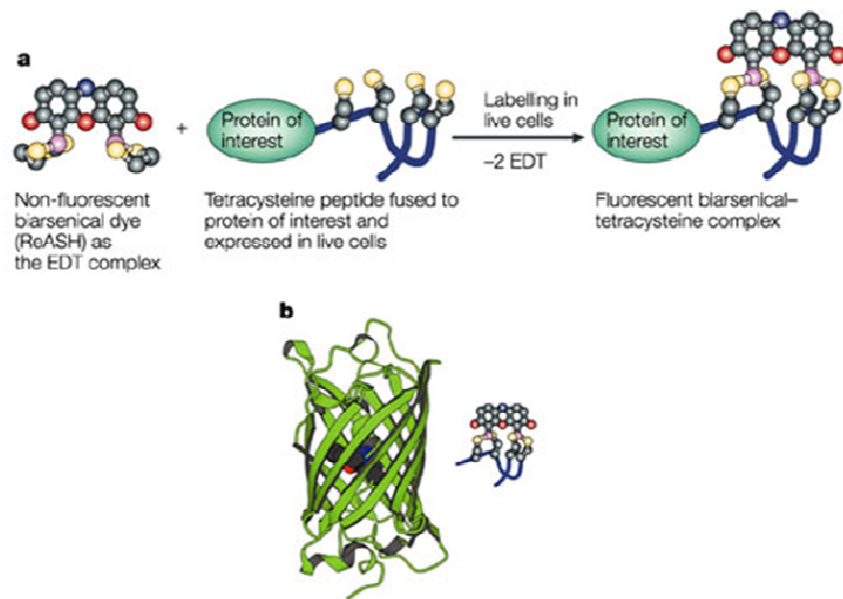


Fig.38. Schéma du marquage tétracystéines-biarsenic.

(a) Présentation du biarsenic comme un colorant non-fluorescent et pouvant traverser les membranes (ReAsH). Ce biarsenic va former un liaison covalente fluorescente avec toutes les protéines intracellulaires présentant un peptide tétracystéine (CCPGCC) qui a au préalable été génétiquement inclus à notre protéine d'intérêt. Le neutralisant, éthanedithiol est utilisé en parallèle du biarsenic pour minimiser la toxicité des colorants non-liés. (b) Comparaison de la taille de la GFP avec la taille du complexe tétracystéine-ReAsH.

**Jim Zhang, Robert E. Campbell Alice Y. Ting & Roger Y. Tsien
Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002)**

Pour conclure, un système utile pour poursuivre ce travail serait un moyen qui permettrait la quantification de la reconnaissance de ces phosphoinositides qui n'est pour le moment que qualitative. Il a ainsi été développé des systèmes utilisant la technologie de FRET (fluorescence resonance energy transfer) , où les domaines de reconnaissance aux PIs sont couplés à deux fluorophores (par exemple CFP et YFP) (Ananthanarayanan et al., 2005; Sato et al., 2003) (Fig.39). Va s'en suivre un processus non radiatif par lequel de l'énergie d'un fluorophore donneur à l'état excité est transmis à un fluorophore accepteur à proximité immédiate (distance < 10 nm), ceci va

d'ailleurs avoir pour conséquence d'augmenter l'intensité de fluorescence de l'accepteur. Ainsi, cette association sera quantifiable notamment en faisant des mesures de ratios donneur/accepteur (Ananthanarayanan et al., 2005; Sato et al., 2003). Au final, des animaux transgéniques pourraient être générés où ces diverses sondes seraient exprimées dans toutes cellules à un niveau qui n'interfère pas avec les fonctions cellulaires normales. Ces animaux pourront d'ailleurs permettre l'étude de cellules qui sont habituellement difficiles à transfecter dans leur environnement tissulaire normal. Ces divers outils en cours de développement ou en projet futur permettront ainsi certainement des avancées déterminantes quant à la localisation normale et la fonction de ces phosphoinositides.

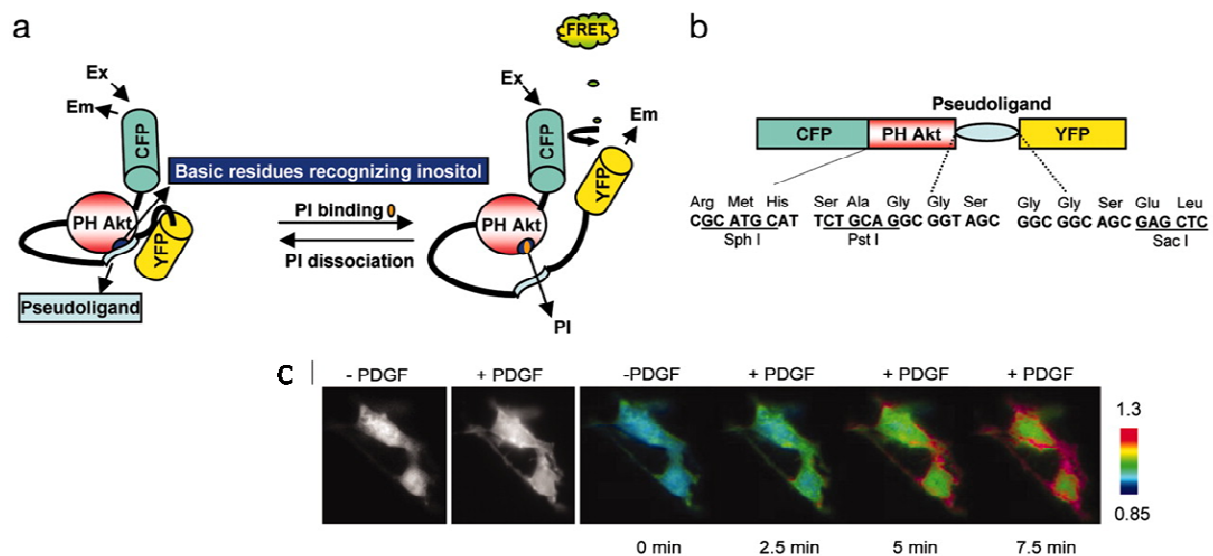


Fig.39. Présentation de la technique de FRET appliquée pour quantifier les pools de PtdIns(3,4,5)P₃. Une sonde du PH-AKT est couplée à deux fluorophores CFP (donneur) et YFP (accepteur). (a) représentation schématique de la construction, et de sa modification structurale dû à la liaison au PI, ce qui va rapprocher les deux fluorophores et permettre leur collaboration. (b) Structure précise de la construction, comportant notamment une partie pseudoligand favorisant « la liberté » structurale du fluorophore YFP. (c) Exemple d'application réalisable grâce à cette technique de FRET, avec une stimulation au PDGF de cellules HEK 293, où l'on peut suivre et quantifier les pools de PtdIns(3,4,5)P₃.

Ananthanarayanan B, Ni Q, Zhang J.
(Proc Natl Acad Sci U S A, 2005)

Manipulation des taux de PIs dans la cellule à la recherche de la meilleure alternative

Il est difficile d'altérer le taux de PIs et d'étudier ses conséquences immédiates. La plupart des approches couramment utilisées requièrent une « exposition » prolongée de la cellule au

changement lipidique désiré. Ainsi comme dans nos études, on peut surexprimer une enzyme d'intérêt (IpgD dans notre cas) ou réaliser des délétions des enzymes d'intérêt pour toucher les pools de PIs. Le problème lors d'une surexpression de l'enzyme est notamment qu'il se passera entre 4h et plusieurs jours avant de réaliser l'effet désiré. On peut imaginer que durant cette période le processus qui devait être affecté au départ, a initié une quantité de processus divers, et il reste très difficile de déduire lequel de nos effets est relié de manière directe à ce changement des pools de PIs. La solution optimale de ces problèmes serait bien entendu l'utilisation d'inhibiteur spécifique de nos enzymes, pour faire varier ces taux en PIs. La meilleure démonstration est d'ailleurs l'explosion énorme qu'a connu le domaine de l'activité PI3K après la découverte d'inhibiteurs relativement spécifiques (Arcaro and Wymann, 1993), qui ont d'ailleurs conduit au développement important de thérapies anticancéreuses (Liu et al., 2009). Malheureusement, il n'existe que trop peu d'inhibiteurs spécifiques des enzymes du métabolisme des PIs. Ce problème a ainsi abouti à la conception de nouveaux outils avec lesquels les taux de PIs vont pouvoir être modifiés dans des compartiments donnés de la cellule. Cette méthode est basée sur le fait que les enzymes retrouvés au niveau cytosolique ont un impact limité sur les lipides des membranes, cependant ceci change radicalement lorsque l'enzyme est recruté au niveau des membranes où se situe son substrat. C'est un peu le problème que nous avons rencontré avec l'expression d'IpgD dans nos modèles cellulaires, qui semble énormément localisé de manière diffuse au niveau du cytosol, cette localisation ne permettrait ainsi pas d'apprécier la localisation précise de notre sonde PH Dok-5 mCherry.

Il a ainsi été développé des outils permettant le recrutement au niveau de la membrane plasmique d'une enzyme d'intérêt et ceci de manière inductible. Ce recrutement est basé sur l'hétérodimérisation du domaine FRB de mTOR et de la protéine FKBP12 en présence de rapamycine ou un analogue approprié (Belshaw et al., 1996). Ainsi, la fusion de l'enzyme d'intérêt avec la protéine FKBP12, ainsi que l'adressage de la protéine FRB au niveau des membranes cellulaires, via une myristoylation par exemple, va permettre en présence de rapamycine de recruter l'enzyme au niveau des membranes d'intérêt. Cette méthode a d'ailleurs été utilisée avec succès pour observer les conséquences de la disparition de PtdIns(4,5)P₂ au niveau de la membrane plasmique et observer l'effet sur l'activité des canaux ioniques (Varnai et al., 2006) (Fig.40). Cette approche pourrait être étendue à diverses enzymes, notamment dans notre cas IpgD, ce qui nous permettrait de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'expression diffuse d'IpgD GFP va empêcher la localisation précise de notre sonde PtdIns5P.

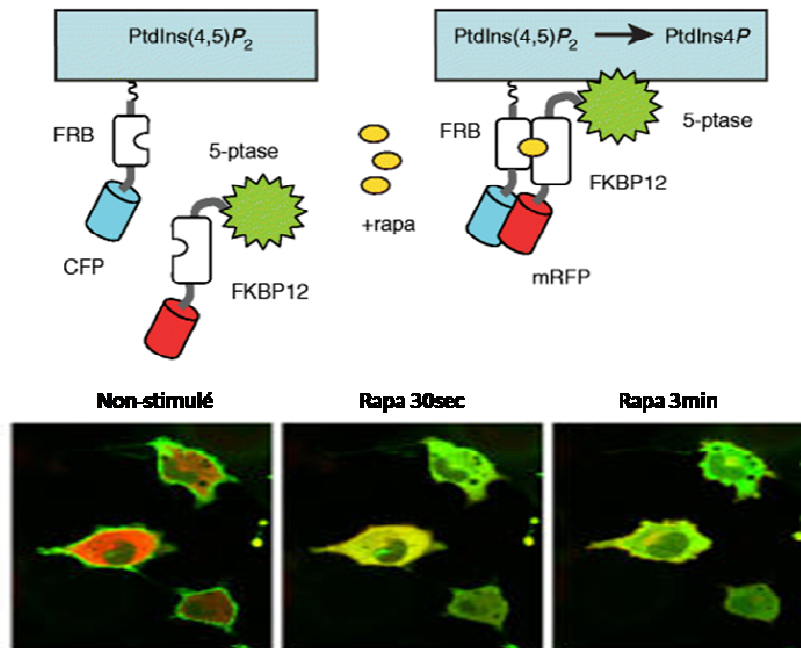


Fig.40. Hétérodimérisation du domaine FRB de mTOR et de la protéine FKBP12 couplée à une enzyme 5-phosphatase en présence de rapamycine.
(en haut) Représentation schématique des deux constructions, FRB est myristoylée (membranaire) et couplée à la protéine fluorescente CFP. La construction FKBP12 est couplée d'une part à une enzyme PtdIns(4,5)P₂ 5-phosphatase, et d'autre part à la protéine fluorescente mRFP. L'ajout de rapamycine, va permettre l'association FRB-FKBP12 et ainsi la localisation de l'enzyme à la membrane plasmique. (En bas) Illustration de l'utilisation de ces sondes en cellules COS-7, conjointement avec la construction PLCδ PH-GFP qui reconnaît le PtdIns(4,5)P₂. L'ajout de 100nM de rapamycine induit la translocation de l'enzyme, ce qui provoque la perte d'expression membranaire de la PLCδ PH-GFP, même après seulement 30sec après translocation de l'enzyme.

Varnai P, Thyagarajan B,
 Rohacs T, Balla T.
 (J Cell Biol., 2006)

Une méthode alternative pour augmenter le taux de PIs dans la cellule est de délivrer des PIs synthétiques pouvant passer la membrane plasmique les chaînes d'acides gras étant raccourcies pour limiter l'hydrophobicité ou en combinant le PIs avec des protéines polyamines ou polybasiques (Panaretou et al., 1997). Cette méthode présente l'avantage de la simplicité des ces « navettes » de PIs et peut permettre le test de divers isomères du PI d'intérêt. L'inconvénient principal sera la localisation anarchique de ce PI dans les divers compartiments cellulaires, faisant voler en éclats les fonctions pouvant être observée localement. Il sera également très difficile ici aussi de déterminer quelles voies de signalisation peuvent être réellement touché et quelle est la protéine spécifiquement atteinte.

Conclusion générale

Il semble ainsi évident que les phosphoinositides ont un impact énorme sur l'ensemble des processus de signalisation en association avec les diverses membranes des compartiments cellulaires. Un nombre de recherche croissant sur ces lipides ces 30 dernières années a amélioré grandement notre compréhension de la signalisation cellulaire. Cependant le nombre pléthorique d'étude sur ces lipides est difficile à centraliser et appréhender. Il reste en fait des vides fondamentaux sur la fonction de ces phosphoinositides et les détails mécanistiques permettant de mieux comprendre comment ils régulent la dynamique membranaire. L'amélioration d'outils de recherche ainsi que le développement d'inhibiteurs spécifiques pourrait nous permettre d'élucider certaines incertitudes. Bien qu'au départ, ce champ de recherche était souvent guidé par une curiosité conduisant à des recherches uniquement dans le champs théorique, cette recherche a finalement débouché sur des applications en thérapeutique. En effet, il y a 10 ans, les inhibiteurs de PI3K n'étaient qu'uniquement considérés que comme des outils scientifiques de recherche, désormais, il y a des études cliniques permettant le ciblage de pathologies telles que le cancer, l'autoimmunité, l'allergie et les désordre métabolique (Kim et al., 2008; Liu et al., 2009; Marone et al., 2008; Oak and Fruman, 2007). A l'heure actuelle, la recherche translationnelle ne comprend pas l'utilité du développement par exemple d'un inhibiteur des PI4K. Cependant, cela peut rapidement changer par exemple la PI4KIII α a été identifié comme un effecteur essentiel dans l'assemblage du virus de l'hépatite C au niveau du foie, comme décrit dans trois études récentes indépendantes (Berger et al., 2009; Trotard et al., 2009; Vaillancourt et al., 2009). Cette découverte suggère ainsi que cet enzyme pourrait être une cible intéressante pour l'utilisation d'inhibiteur. Il y a ainsi énormément de raisons permettant d'espérer que le large investissement réalisé dans le champ des phosphoinositides va déboucher des applications importantes en recherche clinique.

Concernant le PtdIns5P, nous montrons dans nos travaux, qu'il pourrait également être un messenger important des voies de signalisation du lymphocyte T. Vu le nombre actuel de fonctions émergentes sur ce nouveau type de PI, il semble essentiel d'approfondir cette recherche qui aboutira sans nul doute à la meilleure compréhension des voies d'activation du TCR. Enfin, son rôle suggéré dernièrement dans la lymphomagenèse justifie de l'intérêt porté sur ce PtdIns5P et laisse entrevoir un rôle potentiel de ce PtdIns5P dans le processus d'oncogenèse (Coronas et al., 2008). Cette observation permettant par là même d'envisager une utilité dans le futur de ces recherches sur le PtdIns5P, en thérapeutique.

Annexes

Table des abréviations

Abl :	Abelson kinase
Ac:	Anticorps
Ag:	Antigène
AP-1:	Activation protein-1
AML:	Acute myeloid Leukemia
APC:	Antigen Presenting Cell
BCR:	B cell receptor
Bcr-Abl:	Breakpoint cluster region-Abelson chimera
Cbl:	Casitas B cell lymphoma
Cbp :	Csk-binding protein
CLL:	Chronic Lymphoid Leukaemia
CML:	Chronic Myeloid Leukaemia
Csk :	C-terminal Src Kinase
Crk:	CT10 regulator of kinase
Crk-L:	Crk ligand
CTLA-4:	Cytotoxic Lymphocyte antigen-4
DAG :	Diacylglycérol
DKH:	Dok Homology
EEA1:	Early Endosome antigen-1
EGF :	Epidermal growth factor
EGF-R:	Epidermal-Growth Factor Receptor
ERK :	Extracellular signal-Regulated Kinase
ERM:	Ezrin-Radixin-Moesin
FAPP1:	Four-phosphate-adaptor protein
FYVE:	Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1
GADS:	GRB2-related adaptor proteins
GDP:	Guanosine diphosphate

GEF:	Guanosine Exchange Factor
GEM:	Glycosphingolipid enriched microdomains
GFP:	Green Fluorescent protein
GLUT-4:	Glucose transporter-4
GRB2:	Growth Factor-Receptor bound Protein 2
GRP:	General receptor for phosphoinositides
GST:	Glutathione S-transferase
GTP:	Guanosine triphosphate
IL:	interleukine
IP ₃ :	Inositol-tri phosphate
IR:	Insulin Receptor
IRS:	Insulin receptor substrate
ITAM:	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM:	Immunoreceptor Tyrosine-based inhibition Motif
Itk:	IL-2 inducible T-cell Kinase
JNK:	C-Jun aminoterminal kinase
kDa:	KiloDalton
KO :	Knockout
LAT:	Linker for Activation of T cell
LFA-1:	Leukocyte function associated antigen-1
LIME:	Lck-interacting molecule
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEF:	mouse embryonic fibroblast
MEN:	Multiple endocrine neoplasia
MTOC:	Microtubule-organizing center
NF-AT:	Nuclear factor of activated T cell
NF-κB:	Nuclear factor kappa B
PAG:	Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid-enriched microdomains
PDGF-R:	Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PH:	Pleckstrin Homology domain
PHD:	Plant homeo-domain
PI3K:	Phosphoinositide-3 Kinase
PI4K:	Phosphoinositide-4 Kinase
PIPKs:	Phosphatidylinositol phosphate kinases
PKC:	Protéines Kinases C
PLC:	Phospholipase C
PTB:	Phosphotyrosine Binding
PtdIns:	Phosphatidylinositol
PTEN:	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PTK:	Protéine Tyrosine Kinase
PTP:	Protéine Tyrosine Phosphatase
RasGAP:	RasGTPase-activation protein
RASGRP:	RAS guanyl nucleotide-releasing protein
RNAi:	Rna interference
RTKs:	Récepteurs à activité Tyrosine Kinase
SH:	Src Homology
SHP:	SH2-domain containing tyrosine phosphatase
SHIP:	SH2 domain containing inositol 5'-phosphatase
SLP-76:	SH2 domain containing Leukocyte Protein of 76 kDa
SOS:	Son-of-sevenless
STAT:	Signal transducer and activator of transcription
TCR:	T cell receptor
TRIM:	T cell receptor interacting protein
ZAP-70:	Zeta-associated protein of 70 kDa

Bibliographie

- Abraham, R.T., and Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol* 4, 301-308.
- Abramson, J., Rozenblum, G., and Pecht, I. (2003). Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fcepsilon receptor. *Eur J Immunol* 33, 85-91.
- Acuto, O., Bartolo, V.D., and Michel, F. (2008). Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat Rev Immunol* 8, 699-712.
- Albanell, J., Dalmases, A., Rovira, A., and Rojo, F. (2007). mTOR signalling in human cancer. *Clin Transl Oncol* 9, 484-493.
- Alcazar, I., Marques, M., Kumar, A., Hirsch, E., Wymann, M., Carrera, A.C., and Barber, D.F. (2007). Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in T cell receptor-induced T cell activation. *J Exp Med* 204, 2977-2987.
- Allaoui, A., Menard, R., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1993). Characterization of the *Shigella flexneri* ipgD and ipgF genes, which are located in the proximal part of the mxi locus. *Infect Immun* 61, 1707-1714.
- Alvarez-Venegas, R., Sadder, M., Hlavacka, A., Baluska, F., Xia, Y., Lu, G., Firsov, A., Sarath, G., Moriyama, H., Dubrovsky, J.G., *et al.* (2006). The Arabidopsis homolog of trithorax, ATX1, binds phosphatidylinositol 5-phosphate, and the two regulate a common set of target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6049-6054.
- Ananthanarayanan, B., Ni, Q., and Zhang, J. (2005). Signal propagation from membrane messengers to nuclear effectors revealed by reporters of phosphoinositide dynamics and Akt activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15081-15086.
- Arcaro, A., and Wymann, M.P. (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 296 (Pt 2), 297-301.
- Asperti-Boursin, F., Real, E., Bismuth, G., Trautmann, A., and Donnadieu, E. (2007). CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J Exp Med* 204, 1167-1179.
- Astoul, E., Edmunds, C., Cantrell, D.A., and Ward, S.G. (2001). PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models. *Trends Immunol* 22, 490-496.
- Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L., and Vogt, P.K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 5, 921-929.
- Balla, A., and Balla, T. (2006). Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol* 16, 351-361.
- Banfic, H., Tang, X., Batty, I.H., Downes, C.P., Chen, C., and Rittenhouse, S.E. (1998). A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol 3-phosphate in platelets. *J Biol Chem* 273, 13-16.
- Barlow, C.A., Laishram, R.S., and Anderson, R.A. (2009). Nuclear phosphoinositides: a signaling enigma wrapped in a compartmental conundrum. *Trends Cell Biol*.
- Barrero-Villar, M., Barroso-Gonzalez, J., Cabrero, J.R., Gordon-Alonso, M., Alvarez-Losada, S., Munoz-Fernandez, M.A., Sanchez-Madrid, F., and Valenzuela-Fernandez, A. (2008). PI4P5-kinase Ialpha is required for efficient HIV-1 entry and infection of T cells. *J Immunol* 181, 6882-6888.
- Barve, V., Ahmed, F., Adsule, S., Banerjee, S., Kulkarni, S., Katiyar, P., Anson, C.E., Powell, A.K., Padhye, S., and Sarkar, F.H. (2006). Synthesis, molecular characterization, and biological activity of novel synthetic derivatives of chromen-4-one in human cancer cells. *J Med Chem* 49, 3800-3808.

- Bedirian, A., Baldwin, C., Abe, J., Takano, T., and Lemay, S. (2004). Pleckstrin homology and phosphotyrosine-binding domain-dependent membrane association and tyrosine phosphorylation of Dok-4, an inhibitory adapter molecule expressed in epithelial cells. *J Biol Chem* 279, 19335-19349.
- Behnia, R., and Munro, S. (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438, 597-604.
- Belshaw, P.J., Ho, S.N., Crabtree, G.R., and Schreiber, S.L. (1996). Controlling protein association and subcellular localization with a synthetic ligand that induces heterodimerization of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4604-4607.
- Berger, K.L., Cooper, J.D., Heaton, N.S., Yoon, R., Oakland, T.E., Jordan, T.X., Mateu, G., Grakoui, A., and Randall, G. (2009). Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7577-7582.
- Berger, P., Schaffitzel, C., Berger, I., Ban, N., and Suter, U. (2003). Membrane association of myotubularin-related protein 2 is mediated by a pleckstrin homology-GRAM domain and a coiled-coil dimerization module. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12177-12182.
- Berridge, M.J. (1986). Regulation of ion channels by inositol trisphosphate and diacylglycerol. *J Exp Biol* 124, 323-335.
- Berridge, M.J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 56, 159-193.
- Berridge, M.J., Heslop, J.P., Irvine, R.F., and Brown, K.D. (1984). Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor. *Biochem J* 222, 195-201.
- Bilodeau, P.S., Urbanowski, J.L., Winistorfer, S.C., and Piper, R.C. (2002). The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* 4, 534-539.
- Blondeau, F., Laporte, J., Bodin, S., Superti-Furga, G., Payrastre, B., and Mandel, J.L. (2000). Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Hum Mol Genet* 9, 2223-2229.
- Bolino, A., Bolis, A., Previtali, S.C., Dina, G., Bussini, S., Dati, G., Amadio, S., Del Carro, U., Mruk, D.D., Feltri, M.L., *et al.* (2004). Disruption of Mtmr2 produces CMT4B1-like neuropathy with myelin unfolding and impaired spermatogenesis. *J Cell Biol* 167, 711-721.
- Bolino, A., Muglia, M., Conforti, F.L., LeGuern, E., Salih, M.A., Georgiou, D.M., Christodoulou, K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Mandich, P., Schenone, A., *et al.* (2000). Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet* 25, 17-19.
- Boomer, J.S., and Tan, T.H. (2005). Functional interactions of HPK1 with adaptor proteins. *J Cell Biochem* 95, 34-44.
- Boronkov, I.V., and Anderson, R.A. (1995). The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases. *J Biol Chem* 270, 2881-2884.
- Boulay, I., Nemorin, J.G., and Duplay, P. (2005). Phosphotyrosine binding-mediated oligomerization of downstream of tyrosine kinase (Dok)-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced Dok phosphorylation. *J Immunol* 175, 4483-4489.
- Brauweiler, A., Tamir, I., Marschner, S., Helgason, C.D., and Cambier, J.C. (2001). Partially distinct molecular mechanisms mediate inhibitory FcγRIIB signaling in resting and activated B cells. *J Immunol* 167, 204-211.
- Bruyns, E., Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H., Sagolla, K., Shevchenko, A., Mann, M., Autschbach, F., Bensussan, A., Meuer, S., and Schraven, B. (1998). T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *J Exp Med* 188, 561-575.

- Bubeck Wardenburg, J., Pappu, R., Bu, J.Y., Mayer, B., Chernoff, J., Straus, D., and Chan, A.C. (1998). Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* 9, 607-616.
- Buday, L., Wunderlich, L., and Tamas, P. (2002). The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* 14, 723-731.
- Buj-Bello, A., Laugel, V., Messaddeq, N., Zahreddine, H., Laporte, J., Pellissier, J.F., and Mandel, J.L. (2002). The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15060-15065.
- Bunce, M.W., Boronenkov, I.V., and Anderson, R.A. (2008). Coordinated activation of the nuclear ubiquitin ligase Cul3-SPOP by the generation of phosphatidylinositol 5-phosphate. *J Biol Chem* 283, 8678-8686.
- Cachon-Gonzalez, M.B., Fenner, S., Coffin, J.M., Moran, C., Best, S., and Stoye, J.P. (1994). Structure and expression of the hairless gene of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7717-7721.
- Calderwood, D.A., Fujioka, Y., de Pereda, J.M., Garcia-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B., McGlade, C.J., Liddington, R.C., and Ginsberg, M.H. (2003). Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2272-2277.
- Call, M.E., and Wucherpennig, K.W. (2007). Common themes in the assembly and architecture of activating immune receptors. *Nat Rev Immunol* 7, 841-850.
- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., and Der, C.J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17, 1395-1413.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Carpino, N., Turner, S., Mekala, D., Takahashi, Y., Zang, H., Geiger, T.L., Doherty, P., and Ihle, J.N. (2004). Regulation of ZAP-70 activation and TCR signaling by two related proteins, Sts-1 and Sts-2. *Immunity* 20, 37-46.
- Carpino, N., Wisniewski, D., Strife, A., Marshak, D., Kobayashi, R., Stillman, B., and Clarkson, B. (1997). p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* 88, 197-204.
- Carrera, A.C., Rodriguez-Borlado, L., Martinez-Alonso, C., and Merida, I. (1994). T cell receptor-associated alpha-phosphatidylinositol 3-kinase becomes activated by T cell receptor cross-linking and requires pp56lck. *J Biol Chem* 269, 19435-19440.
- Carricaburu, V., Lamia, K.A., Lo, E., Favereaux, L., Payrastra, B., Cantley, L.C., and Rameh, L.E. (2003). The phosphatidylinositol (PI)-5-phosphate 4-kinase type II enzyme controls insulin signaling by regulating PI-3,4,5-trisphosphate degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9867-9872.
- Castellino, A.M., Parker, G.J., Boronenkov, I.V., Anderson, R.A., and Chao, M.V. (1997). A novel interaction between the juxtamembrane region of the p55 tumor necrosis factor receptor and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J Biol Chem* 272, 5861-5870.
- Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W., and Weiss, A. (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649-662.
- Chardin, P., Camonis, J.H., Gale, N.W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M.H., and Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338-1343.
- Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H., and Riley, J.L. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 173, 945-954.
- Ciruela, A., Hinchliffe, K.A., Divecha, N., and Irvine, R.F. (2000). Nuclear targeting of the beta isoform of type II phosphatidylinositol phosphate kinase (phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase) by its alpha-helix 7. *Biochem J* 346 Pt 3, 587-591.

- Clague, M.J., and Lorenzo, O. (2005). The myotubularin family of lipid phosphatases. *Traffic* 6, 1063-1069.
- Clarke, J.H. (2003). Lipid signalling: picking out the PIPs. *Curr Biol* 13, R815-817.
- Clement, S., Krause, U., Desmedt, F., Tanti, J.F., Behrends, J., Pesesse, X., Sasaki, T., Penninger, J., Doherty, M., Malaisse, W., *et al.* (2001). The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 409, 92-97.
- Clements, J.L., Yang, B., Ross-Barta, S.E., Eliason, S.L., Hrstka, R.F., Williamson, R.A., and Koretzky, G.A. (1998). Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 281, 416-419.
- Cockcroft, S. (2007). Trafficking of phosphatidylinositol by phosphatidylinositol transfer proteins. *Biochem Soc Symp*, 259-271.
- Cong, F., Yuan, B., and Goff, S.P. (1999). Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling. *Mol Cell Biol* 19, 8314-8325.
- Coronas, S., Lagarrigue, F., Ramel, D., Chicanne, G., Delsol, G., Payrastre, B., and Tronchere, H. (2008). Elevated levels of PtdIns5P in NPM-ALK transformed cells: implication of PIKfyve. *Biochem Biophys Res Commun* 372, 351-355.
- Coronas, S., Ramel, D., Pendaries, C., Gaits-Iacovoni, F., Tronchere, H., and Payrastre, B. (2007). PtdIns5P: a little phosphoinositide with big functions? *Biochem Soc Symp*, 117-128.
- Cossart, P., and Sansonetti, P.J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304, 242-248.
- Costello, P.S., Gallagher, M., and Cantrell, D.A. (2002). Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nat Immunol* 3, 1082-1089.
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M.R., Luthi, A., Kim, W.T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S.B., Flavell, R.A., *et al.* (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99, 179-188.
- Crowder, R.J., Enomoto, H., Yang, M., Johnson, E.M., Jr., and Milbrandt, J. (2004). Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth. *J Biol Chem* 279, 42072-42081.
- Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6, 184-192.
- Currie, R.A., Walker, K.S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C.P., Cohen, P., Alessi, D.R., and Lucocq, J. (1999). Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J* 337 (Pt 3), 575-583.
- Damen, J.E., Liu, L., Rosten, P., Humphries, R.K., Jefferson, A.B., Majerus, P.W., and Krystal, G. (1996). The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1689-1693.
- Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y. (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 523-544.
- de Aos, I., Metzger, M.H., Exley, M., Dahl, C.E., Misra, S., Zheng, D., Varticovski, L., Terhorst, C., and Sancho, J. (1997). Tyrosine phosphorylation of the CD3-epsilon subunit of the T cell antigen receptor mediates enhanced association with phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 272, 25310-25318.
- De Matteis, M.A., Di Campli, A., and Godi, A. (2005). The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* 1744, 396-405.
- De Matteis, M.A., and Godi, A. (2004a). PI-loting membrane traffic. *Nat Cell Biol* 6, 487-492.
- De Matteis, M.A., and Godi, A. (2004b). Protein-lipid interactions in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* 1666, 264-274.

- de Vries-Smits, A.M., Burgering, B.M., Leever, S.J., Marshall, C.J., and Bos, J.L. (1992). Involvement of p21ras in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* *357*, 602-604.
- Deane, J.A., and Fruman, D.A. (2004). Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* *22*, 563-598.
- Denny, M.F., Kaufman, H.C., Chan, A.C., and Straus, D.B. (1999). The Ick SH3 domain is required for activation of the mitogen-activated protein kinase pathway but not the initiation of T-cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* *274*, 5146-5152.
- Di Bartolo, V., Montagne, B., Salek, M., Jungwirth, B., Carrette, F., Fournane, J., Sol-Foulon, N., Michel, F., Schwartz, O., Lehmann, W.D., *et al.* (2007). A novel pathway down-modulating T cell activation involves HPK-1-dependent recruitment of 14-3-3 proteins on SLP-76. *J Exp Med* *204*, 681-691.
- Di Cristofano, A., Carpino, N., Dunant, N., Friedland, G., Kobayashi, R., Strife, A., Wisniewski, D., Clarkson, B., Pandolfi, P.P., and Resh, M.D. (1998a). Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins. *J Biol Chem* *273*, 4827-4830.
- Di Cristofano, A., Kotsi, P., Peng, Y.F., Cordon-Cardo, C., Elkon, K.B., and Pandolfi, P.P. (1999). Impaired Fas response and autoimmunity in Pten^{+/-} mice. *Science* *285*, 2122-2125.
- Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (1998b). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* *19*, 348-355.
- Di Lello, P., Nguyen, B.D., Jones, T.N., Potempa, K., Kobor, M.S., Legault, P., and Omichinski, J.G. (2005). NMR structure of the amino-terminal domain from the Tfb1 subunit of TFIIH and characterization of its phosphoinositide and VP16 binding sites. *Biochemistry* *44*, 7678-7686.
- Divecha, N., Banfic, H., and Irvine, R.F. (1991). The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J* *10*, 3207-3214.
- Divecha, N., Brooksbank, C.E., and Irvine, R.F. (1992). Purification and characterization of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases. *Biochem J* *288* (Pt 2), 637-642.
- Divecha, N., Truong, O., Hsuan, J.J., Hinchliffe, K.A., and Irvine, R.F. (1995). The cloning and sequence of the C isoform of PtdIns4P 5-kinase. *Biochem J* *309* (Pt 3), 715-719.
- Dong, S., Corre, B., Foulon, E., Dufour, E., Veillette, A., Acuto, O., and Michel, F. (2006). T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J Exp Med* *203*, 2509-2518.
- Dove, S.K., Cooke, F.T., Douglas, M.R., Sayers, L.G., Parker, P.J., and Michell, R.H. (1997). Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* *390*, 187-192.
- Dowler, S., Currie, R.A., Campbell, D.G., Deak, M., Kular, G., Downes, C.P., and Alessi, D.R. (2000). Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem J* *351*, 19-31.
- Dreikhausen, U.E., Gorf, K., Resch, K., and Szamel, M. (2003). Protein kinase Cbeta1, a major regulator of TCR-CD28-activated signal transduction leading to IL-2 gene transcription and secretion. *Int Immunol* *15*, 1089-1098.
- Dunant, N.M., Wisniewski, D., Strife, A., Clarkson, B., and Resh, M.D. (2000). The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP1 associates with the dok1 phosphoprotein in bcr-Abl transformed cells. *Cell Signal* *12*, 317-326.
- Dustin, M.L., and Chan, A.C. (2000). Signaling takes shape in the immune system. *Cell* *103*, 283-294.

- Eberhard, D.A., Cooper, C.L., Low, M.G., and Holz, R.W. (1990). Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP. *Biochem J* 268, 15-25.
- Edmunds, C., Parry, R.V., Burgess, S.J., Reaves, B., and Ward, S.G. (1999). CD28 stimulates tyrosine phosphorylation, cellular redistribution and catalytic activity of the inositol lipid 5-phosphatase SHIP. *Eur J Immunol* 29, 3507-3515.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606-619.
- Essen, L.O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., and Williams, R.L. (1996). Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* 380, 595-602.
- Exley, M., Varticovski, L., Peter, M., Sancho, J., and Terhorst, C. (1994). Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent on T cell activation. *J Biol Chem* 269, 15140-15146.
- Fabre, S., Lang, V., Harriague, J., Jobart, A., Unterman, T.G., Trautmann, A., and Bismuth, G. (2005). Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FoxO1 nuclear exclusion and cell growth control. *J Immunol* 174, 4161-4171.
- Fan, Q.W., Knight, Z.A., Goldenberg, D.D., Yu, W., Mostov, K.E., Stokoe, D., Shokat, K.M., and Weiss, W.A. (2006). A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell* 9, 341-349.
- Faris, M., Kokot, N., Lee, L., and Nel, A.E. (1996). Regulation of interleukin-2 transcription by inducible stable expression of dominant negative and dominant active mitogen-activated protein kinase kinase kinase in jurkat T cells. Evidence for the importance of Ras in a pathway that is controlled by dual receptor stimulation. *J Biol Chem* 271, 27366-27373.
- Favre, C., Gerard, A., Clauzier, E., Pontarotti, P., Olive, D., and Nunes, J.A. (2003). DOK4 and DOK5: new Dok-related genes expressed in human T cells. *Genes Immun* 4, 40-45.
- Feller, S.M. (2001). Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* 20, 6348-6371.
- Feng, X., Hara, Y., and Riabowol, K. (2002). Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol* 12, 532-538.
- Fernandis, A.Z., and Subrahmanyam, G. (1998). Concanavalin A modulates tyrosine phosphorylation and activation of a type II phosphatidylinositol 4-kinase in rat splenic lymphocytes. *Mol Immunol* 35, 935-941.
- Fernandis, A.Z., and Subrahmanyam, G. (2000). Tyrosyl phosphorylation and activation of a type II phosphatidylinositol 4-kinase by p56(lck) in concanavalin A stimulated rat splenic lymphocytes. *Mol Immunol* 37, 273-280.
- Feshchenko, E.A., Smirnova, E.V., Swaminathan, G., Teckchandani, A.M., Agrawal, R., Band, H., Zhang, X., Annan, R.S., Carr, S.A., and Tsygankov, A.Y. (2004). TULA: an SH3- and UBA-containing protein that binds to c-Cbl and ubiquitin. *Oncogene* 23, 4690-4706.
- Fooksman, D.R., Shaikh, S.R., Boyle, S., and Edidin, M. (2009). Cutting edge: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate concentration at the APC side of the immunological synapse is required for effector T cell function. *J Immunol* 182, 5179-5182.
- Ford, M.G., Pearse, B.M., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 291, 1051-1055.
- Fos, C., Salles, A., Lang, V., Carrette, F., Audebert, S., Pastor, S., Ghiotto, M., Olive, D., Bismuth, G., and Nunes, J.A. (2008). ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *J Immunol* 181, 1969-1977.

- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., and Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668.
- Freeburn, R.W., Wright, K.L., Burgess, S.J., Astoul, E., Cantrell, D.A., and Ward, S.G. (2002). Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors. *J Immunol* 169, 5441-5450.
- Fukazawa, T., Reedquist, K.A., Panchamoorthy, G., Soltoff, S., Trub, T., Druker, B., Cantley, L., Shoelson, S.E., and Band, H. (1995). T cell activation-dependent association between the p85 subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase and Grb2/phospholipase C-gamma 1-binding phosphotyrosyl protein pp36/38. *J Biol Chem* 270, 20177-20182.
- Fyodorov, D.V., and Kadonaga, J.T. (2002). Dynamics of ATP-dependent chromatin assembly by ACF. *Nature* 418, 897-900.
- Garcon, F., Patton, D.T., Emery, J.L., Hirsch, E., Rottapel, R., Sasaki, T., and Okkenhaug, K. (2008). CD28 provides T-cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer. *Blood* 111, 1464-1471.
- Geiger, B., Rosen, D., and Berke, G. (1982). Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol* 95, 137-143.
- Genot, E.M., Arrieumerlou, C., Ku, G., Burgering, B.M., Weiss, A., and Kramer, I.M. (2000). The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositide 3-kinase. *Mol Cell Biol* 20, 5469-5478.
- Gerard, A., Favre, C., Garcon, F., Nemorin, J.G., Duplay, P., Pastor, S., Collette, Y., Olive, D., and Nunes, J.A. (2004). Functional interaction of RasGAP-binding proteins Dok-1 and Dok-2 with the Tec protein tyrosine kinase. *Oncogene* 23, 1594-1598.
- Gerard, A., Ghiotto, M., Fos, C., Guittard, G., Compagno, D., Galy, A., Lemay, S., Olive, D., and Nunes, J.A. (2009). Dok-4 is a novel negative regulator of T cell activation. *J Immunol* 182, 7681-7689.
- Germain, R.N. (2001). The T cell receptor for antigen: signaling and ligand discrimination. *J Biol Chem* 276, 35223-35226.
- Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton, R.G., and Stenmark, H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J* 19, 4577-4588.
- Gills, J.J., Holbeck, S., Hollingshead, M., Hewitt, S.M., Kozikowski, A.P., and Dennis, P.A. (2006). Spectrum of activity and molecular correlates of response to phosphatidylinositol ether lipid analogues, novel lipid-based inhibitors of Akt. *Mol Cancer Ther* 5, 713-722.
- Goodnow, C.C. (2007). Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell* 130, 25-35.
- Gorska, M.M., Stafford, S.J., Cen, O., Sur, S., and Alam, R. (2004). Unc119, a novel activator of Lck/Fyn, is essential for T cell activation. *J Exp Med* 199, 369-379.
- Gozani, O., Karuman, P., Jones, D.R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A.A., Baird, C.L., Zhu, H., Field, S.J., Lessnick, S.L., *et al.* (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114, 99-111.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Gray, A., Olsson, H., Batty, I.H., Priganica, L., and Peter Downes, C. (2003). Nonradioactive methods for the assay of phosphoinositide 3-kinases and phosphoinositide phosphatases and selective detection of signaling lipids in cell and tissue extracts. *Anal Biochem* 313, 234-245.

- Grimm, J., Sachs, M., Britsch, S., Di Cesare, S., Schwarz-Romond, T., Alitalo, K., and Birchmeier, W. (2001). Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J Cell Biol* 154, 345-354.
- Gu, H., Maeda, H., Moon, J.J., Lord, J.D., Yoakim, M., Nelson, B.H., and Neel, B.G. (2000). New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biol* 20, 7109-7120.
- Gu, J.J., Zhang, N., He, Y.W., Koleske, A.J., and Pendergast, A.M. (2007). Defective T cell development and function in the absence of Abelson kinases. *J Immunol* 179, 7334-7343.
- Guittard, G., Gerard, A., Dupuis-Coronas, S., Tronchere, H., Mortier, E., Favre, C., Olive, D., Zimmermann, P., Payrastre, B., and Nunes, J.A. (2009). Cutting edge: Dok-1 and Dok-2 adaptor molecules are regulated by phosphatidylinositol 5-phosphate production in T cells. *J Immunol* 182, 3974-3978.
- Gupta, S., Fanzo, J.C., Hu, C., Cox, D., Jang, S.Y., Lee, A.E., Greenberg, S., and Pernis, A.B. (2003). T cell receptor engagement leads to the recruitment of IBP, a novel guanine nucleotide exchange factor, to the immunological synapse. *J Biol Chem* 278, 43541-43549.
- Hammond, G.R., Schiavo, G., and Irvine, R.F. (2009). Immunocytochemical techniques reveal multiple, distinct cellular pools of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P(2). *Biochem J* 422, 23-35.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A., and Broek, D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279, 558-560.
- Harder, T., and Engelhardt, K.R. (2004). Membrane domains in lymphocytes - from lipid rafts to protein scaffolds. *Traffic* 5, 265-275.
- Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S., and Fesik, S.W. (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371, 168-170.
- Harriague, J., and Bismuth, G. (2002). Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells. *Nat Immunol* 3, 1090-1096.
- Harriague, J., Debre, P., Bismuth, G., and Hubert, P. (2000). Priming of CD2-induced p62Dok tyrosine phosphorylation by CD3 in Jurkat T cells. *Eur J Immunol* 30, 3319-3328.
- Hay, J.C., Fiset, P.L., Jenkins, G.H., Fukami, K., Takenawa, T., Anderson, R.A., and Martin, T.F. (1995). ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca(2+)-activated secretion. *Nature* 374, 173-177.
- Helgason, C.D., Damen, J.E., Rosten, P., Grewal, R., Sorensen, P., Chappel, S.M., Borowski, A., Jirik, F., Krystal, G., and Humphries, R.K. (1998). Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev* 12, 1610-1620.
- Hermiston, M.L., Xu, Z., and Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21, 107-137.
- Hilgard, P., Klenner, T., Stekar, J., Nossner, G., Kutscher, B., and Engel, J. (1997). D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. *Eur J Cancer* 33, 442-446.
- Hilgemann, D.W. (2004). New insights into the molecular and cellular workings of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1167-1172.
- Hilpela, P., Vartiainen, M.K., and Lappalainen, P. (2004). Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. *Curr Top Microbiol Immunol* 282, 117-163.
- Hiragun, T., Peng, Z., and Beaven, M.A. (2005). Dexamethasone up-regulates the inhibitory adaptor protein Dok-1 and suppresses downstream activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Mol Pharmacol* 67, 598-603.
- Hirst, J., Motley, A., Harasaki, K., Peak Chew, S.Y., and Robinson, M.S. (2003). EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. *Mol Biol Cell* 14, 625-641.

- Holdorf, A.D., Green, J.M., Levin, S.D., Denny, M.F., Straus, D.B., Link, V., Changelian, P.S., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (1999). Proline residues in CD28 and the Src homology (SH)3 domain of Lck are required for T cell costimulation. *J Exp Med* *190*, 375-384.
- Horowitz, L.F., Hirdes, W., Suh, B.C., Hilgemann, D.W., Mackie, K., and Hille, B. (2005). Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca²⁺ requirement, and regulation of M current. *J Gen Physiol* *126*, 243-262.
- Hosooka, T., Noguchi, T., Nagai, H., Horikawa, T., Matozaki, T., Ichihashi, M., and Kasuga, M. (2001). Inhibition of the motility and growth of B16F10 mouse melanoma cells by dominant negative mutants of Dok-1. *Mol Cell Biol* *21*, 5437-5446.
- Hubert, P., Debre, P., Boumsell, L., and Bismuth, G. (1993). Tyrosine phosphorylation and association with phospholipase C gamma-1 of the GAP-associated 62-kD protein after CD2 stimulation of Jurkat T cell. *J Exp Med* *178*, 1587-1596.
- Huppa, J.B., Gleimer, M., Sumen, C., and Davis, M.M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat Immunol* *4*, 749-755.
- Inokuchi, S., and Imboden, J.B. (1990). Antigen receptor-mediated regulation of sustained polyphosphoinositide turnover in a human T cell line. Evidence for a receptor-regulated pathway for production of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* *265*, 5983-5989.
- Irving, B.A., Chan, A.C., and Weiss, A. (1993). Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med* *177*, 1093-1103.
- Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Katagiri, H., Yazaki, Y., Asano, T., and Oka, Y. (1996). Cloning of cDNAs encoding two isoforms of 68-kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J Biol Chem* *271*, 23611-23614.
- Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Wada, T., Yazaki, Y., Asano, T., and Oka, Y. (1998). Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* *273*, 8741-8748.
- Itoh, T., Ijuin, T., and Takenawa, T. (1998). A novel phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase (phosphatidylinositol-phosphate kinase IIgamma) is phosphorylated in the endoplasmic reticulum in response to mitogenic signals. *J Biol Chem* *273*, 20292-20299.
- Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S., and Takenawa, T. (2001). Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* *291*, 1047-1051.
- Ivetac, I., Munday, A.D., Kisseleva, M.V., Zhang, X.M., Luff, S., Tigani, T., Whisstock, J.C., Rowe, T., Majerus, P.W., and Mitchell, C.A. (2005). The type Ialpha inositol polyphosphate 4-phosphatase generates and terminates phosphoinositide 3-kinase signals on endosomes and the plasma membrane. *Mol Biol Cell* *16*, 2218-2233.
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J., Holmes, A.B., and Alessi, D.R. (1996). Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J* *315* (Pt 3), 709-713.
- Ji, H., Rintelen, F., Waltzinger, C., Bertschy Meier, D., Bilancio, A., Pearce, W., Hirsch, E., Wymann, M.P., Ruckle, T., Camps, M., *et al.* (2007). Inactivation of PI3Kgamma and PI3Kdelta distorts T-cell development and causes multiple organ inflammation. *Blood* *110*, 2940-2947.
- Jimenez, C., Jones, D.R., Rodriguez-Viciano, P., Gonzalez-Garcia, A., Leonardo, E., Wennstrom, S., von Kobbe, C., Toran, J.L., L, R.B., Calvo, V., *et al.* (1998). Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J* *17*, 743-753.
- Jones, D.R., Bultsma, Y., Keune, W.J., Halstead, J.R., Elouarrat, D., Mohammed, S., Heck, A.J., D'Santos, C.S., and Divecha, N. (2006). Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: an in vivo role for PIP4Kbeta. *Mol Cell* *23*, 685-695.

- Jones, D.R., Gonzalez-Garcia, A., Diez, E., Martinez, A.C., Carrera, A.C., and Merida, I. (1999a). The identification of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate in T-lymphocytes and its regulation by interleukin-2. *J Biol Chem* 274, 18407-18413.
- Jones, N., and Dumont, D.J. (1999). Recruitment of Dok-R to the EGF receptor through its PTB domain is required for attenuation of Erk MAP kinase activation. *Curr Biol* 9, 1057-1060.
- Jones, N., Master, Z., Jones, J., Bouchard, D., Gunji, Y., Sasaki, H., Daly, R., Alitalo, K., and Dumont, D.J. (1999b). Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *J Biol Chem* 274, 30896-30905.
- Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2007). Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity* 27, 173-178.
- Kabouridis, P.S., Magee, A.I., and Ley, S.C. (1997). S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J* 16, 4983-4998.
- Kalkhoven, E., Teunissen, H., Houweling, A., Verrijzer, C.P., and Zantema, A. (2002). The PHD type zinc finger is an integral part of the CBP acetyltransferase domain. *Mol Cell Biol* 22, 1961-1970.
- Kane, L.P., Mollenauer, M.N., and Weiss, A. (2004). A proline-rich motif in the C terminus of Akt contributes to its localization in the immunological synapse. *J Immunol* 172, 5441-5449.
- Kashiwada, M., Cattoretti, G., McKeag, L., Rouse, T., Showalter, B.M., Al-Alem, U., Niki, M., Pandolfi, P.P., Field, E.H., and Rothman, P.B. (2006). Downstream of tyrosine kinases-1 and Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase are required for regulation of CD4+CD25+ T cell development. *J Immunol* 176, 3958-3965.
- Kavran, J.M., Klein, D.E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S.J., Skolnik, E.Y., and Lemmon, M.A. (1998). Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 273, 30497-30508.
- Kiefer, F., Tibbles, L.A., Anafi, M., Janssen, A., Zanke, B.W., Lassam, N., Pawson, T., Woodgett, J.R., and Iscove, N.N. (1996). HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway. *EMBO J* 15, 7013-7025.
- Kim, M.S., Radinger, M., and Gilfillan, A.M. (2008). The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology. *Trends Immunol* 29, 493-501.
- Kim, P.W., Sun, Z.Y., Blacklow, S.C., Wagner, G., and Eck, M.J. (2003a). A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science* 301, 1725-1728.
- Kim, S.A., Vaccrasis, P.O., Firestein, R., Cleary, M.L., and Dixon, J.E. (2003b). Regulation of myotubularin-related (MTMR)2 phosphatidylinositol phosphatase by MTMR5, a catalytically inactive phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4492-4497.
- Klarlund, J.K., Guilherme, A., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A., and Czech, M.P. (1997). Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* 275, 1927-1930.
- Klasen, S., Pages, F., Peyron, J.F., Cantrell, D.A., and Olive, D. (1998). Two distinct regions of the CD28 intracytoplasmic domain are involved in the tyrosine phosphorylation of Vav and GTPase activating protein-associated p62 protein. *Int Immunol* 10, 481-489.
- Knight, Z.A., Gonzalez, B., Feldman, M.E., Zunder, E.R., Goldenberg, D.D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A., Toth, B., *et al.* (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* 125, 733-747.
- Knight, Z.A., and Shokat, K.M. (2007). Chemically targeting the PI3K family. *Biochem Soc Trans* 35, 245-249.

- Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Roth, R.A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* *271*, 31372-31378.
- Koretzky, G.A., Abtahian, F., and Silverman, M.A. (2006). SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* *6*, 67-78.
- Koyasu, S. (2003). The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* *4*, 313-319.
- Kupfer, A., Swain, S.L., and Singer, S.J. (1987). The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J Exp Med* *165*, 1565-1580.
- Kutateladze, T.G. (2006). Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain. *Biochim Biophys Acta* *1761*, 868-877.
- Kwabi-Addo, B., Giri, D., Schmidt, K., Podsypanina, K., Parsons, R., Greenberg, N., and Ittmann, M. (2001). Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 11563-11568.
- Lamia, K.A., Peroni, O.D., Kim, Y.B., Rameh, L.E., Kahn, B.B., and Cantley, L.C. (2004). Increased insulin sensitivity and reduced adiposity in phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase beta^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* *24*, 5080-5087.
- Lanzavecchia, A., Lezzi, G., and Viola, A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* *96*, 1-4.
- Laporte, J., Blondeau, F., Gansmuller, A., Lutz, Y., Vonesch, J.L., and Mandel, J.L. (2002). The PtdIns3P phosphatase myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles. *J Cell Sci* *115*, 3105-3117.
- Laporte, J., Hu, L.J., Kretz, C., Mandel, J.L., Kioschis, P., Coy, J.F., Klauck, S.M., Poustka, A., and Dahl, N. (1996). A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* *13*, 175-182.
- Latour, S., Gish, G., Helgason, C.D., Humphries, R.K., Pawson, T., and Veillette, A. (2001). Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immunol* *2*, 681-690.
- Lawe, D.C., Patki, V., Heller-Harrison, R., Lambright, D., and Corvera, S. (2000). The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J Biol Chem* *275*, 3699-3705.
- Lecompte, O., Poch, O., and Laporte, J. (2008). PtdIns5P regulation through evolution: roles in membrane trafficking? *Trends Biochem Sci*.
- Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P., and Pavletich, N.P. (1999). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* *99*, 323-334.
- Lemay, S., Davidson, D., Latour, S., and Veillette, A. (2000). Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. *Mol Cell Biol* *20*, 2743-2754.
- Lemmon, M.A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* *4*, 201-213.
- Lemmon, M.A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 99-111.
- Lemmon, M.A., and Ferguson, K.M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* *350 Pt 1*, 1-18.
- Leslie, N.R., and Downes, C.P. (2002). PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal* *14*, 285-295.

- Levine, T.P., and Munro, S. (2002). Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr Biol* 12, 695-704.
- Lewis, R.S. (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19, 497-521.
- Li, S., Tiab, L., Jiao, X., Munier, F.L., Zografos, L., Frueh, B.E., Sergeev, Y., Smith, J., Rubin, B., Meallet, M.A., *et al.* (2005). Mutations in PIP5K3 are associated with Francois-Neetens mouchette fleck corneal dystrophy. *Am J Hum Genet* 77, 54-63.
- Li, Y.Q., Hii, C.S., Der, C.J., and Ferrante, A. (1999). Direct evidence that ERK regulates the production/secretion of interleukin-2 in PHA/PMA-stimulated T lymphocytes. *Immunology* 96, 524-528.
- Liang, X., Wisniewski, D., Strife, A., Shivakrupa, Clarkson, B., and Resh, M.D. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase and Src family kinases are required for phosphorylation and membrane recruitment of Dok-1 in c-Kit signaling. *J Biol Chem* 277, 13732-13738.
- Lin, K., Longo, N.S., Wang, X., Hewitt, J.A., and Abraham, K.M. (2000). Lck domains differentially contribute to pre-T cell receptor (TCR)- and TCR-alpha/beta-regulated developmental transitions. *J Exp Med* 191, 703-716.
- Ling, P., Meyer, C.F., Redmond, L.P., Shui, J.W., Davis, B., Rich, R.R., Hu, M.C., Wange, R.L., and Tan, T.H. (2001). Involvement of hematopoietic progenitor kinase 1 in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* 276, 18908-18914.
- Liu, H., Liu, Z.Q., Chen, C.X., Magill, S., Jiang, Y., and Liu, Y.J. (2006). Inhibitory regulation of EGF receptor degradation by sorting nexin 5. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 537-546.
- Liu, L., Damen, J.E., Cutler, R.L., and Krystal, G. (1994). Multiple cytokines stimulate the binding of a common 145-kilodalton protein to Shc at the Grb2 recognition site of Shc. *Mol Cell Biol* 14, 6926-6935.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., and Zhao, J.J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8, 627-644.
- Liu, Q., Oliveira-Dos-Santos, A.J., Mariathasan, S., Bouchard, D., Jones, J., Sarao, R., Koziarzki, I., Ohashi, P.S., Penninger, J.M., and Dumont, D.J. (1998). The inositol polyphosphate 5-phosphatase ship is a crucial negative regulator of B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* 188, 1333-1342.
- Liu, Y., Bruzik, K.S., Ananthanarayanan, B., and Cho, W. (2003). New aspects of formation of 1,2-cyclic phosphates by phospholipase C-delta1. *Bioorg Med Chem* 11, 2471-2475.
- Liu, Y.C., Penninger, J., and Karin, M. (2005). Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* 5, 941-952.
- Lock, P., Casagrande, F., and Dunn, A.R. (1999). Independent SH2-binding sites mediate interaction of Dok-related protein with RasGTPase-activating protein and Nck. *J Biol Chem* 274, 22775-22784.
- Locke, N.R., Patterson, S.J., Hamilton, M.J., Sly, L.M., Krystal, G., and Levings, M.K. (2009). SHIP regulates the reciprocal development of T regulatory and Th17 cells. *J Immunol* 183, 975-983.
- Loeser, S., and Penninger, J.M. (2007). Regulation of peripheral T cell tolerance by the E3 ubiquitin ligase Cbl-b. *Semin Immunol* 19, 206-214.
- Loijens, J.C., and Anderson, R.A. (1996). Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases are distinct members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 271, 32937-32943.
- Lu, P.J., and Chen, C.S. (1997). Selective recognition of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate by a synthetic peptide. *J Biol Chem* 272, 466-472.
- Lucas, D.M., and Rohrschneider, L.R. (1999). A novel spliced form of SH2-containing inositol phosphatase is expressed during myeloid development. *Blood* 93, 1922-1933.
- Luo, J., Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2003a). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4, 257-262.

- Luo, J.M., Yoshida, H., Komura, S., Ohishi, N., Pan, L., Shigeno, K., Hanamura, I., Miura, K., Iida, S., Ueda, R., *et al.* (2003b). Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17, 1-8.
- Mackintosh, C. (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J* 381, 329-342.
- Maehama, T., and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273, 13375-13378.
- Marcus, S.L., Wenk, M.R., Steele-Mortimer, O., and Finlay, B.B. (2001). A synaptojanin-homologous region of *Salmonella typhimurium* SigD is essential for inositol phosphatase activity and Akt activation. *FEBS Lett* 494, 201-207.
- Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B., and Wymann, M.P. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta* 1784, 159-185.
- Marsh, D.J., Kum, J.B., Lunetta, K.L., Bennett, M.J., Gorlin, R.J., Ahmed, S.F., Bodurtha, J., Crowe, C., Curtis, M.A., Dasouki, M., *et al.* (1999). PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Hum Mol Genet* 8, 1461-1472.
- Martelli, M.P., Boomer, J., Bu, M., and Bierer, B.E. (2001). T cell regulation of p62(dok) (Dok1) association with Crk-L. *J Biol Chem* 276, 45654-45661.
- Mashima, R., Hishida, Y., Tezuka, T., and Yamanashi, Y. (2009). The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling. *Immunol Rev* 232, 273-285.
- Master, Z., Tran, J., Bishnoi, A., Chen, S.H., Ebos, J.M., Van Slyke, P., Kerbel, R.S., and Dumont, D.J. (2003). Dok-R binds c-Abl and regulates Abl kinase activity and mediates cytoskeletal reorganization. *J Biol Chem* 278, 30170-30179.
- Matheu, M.P., Deane, J.A., Parker, I., Fruman, D.A., and Cahalan, M.D. (2007). Class IA phosphoinositide 3-kinase modulates basal lymphocyte motility in the lymph node. *J Immunol* 179, 2261-2269.
- McCrea, H.J., and De Camilli, P. (2009). Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease. *Physiology (Bethesda)* 24, 8-16.
- McEwen, R.K., Dove, S.K., Cooke, F.T., Painter, G.F., Holmes, A.B., Shisheva, A., Ohya, Y., Parker, P.J., and Michell, R.H. (1999). Complementation analysis in PtdInsP kinase-deficient yeast mutants demonstrates that *Schizosaccharomyces pombe* and murine Fab1p homologues are phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinases. *J Biol Chem* 274, 33905-33912.
- McLaughlin, S., and Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438, 605-611.
- Meijer, H.J., Berrie, C.P., Iurisci, C., Divecha, N., Musgrave, A., and Munnik, T. (2001). Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *Biochem J* 360, 491-498.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Michel, F., Attal-Bonnefoy, G., Mangino, G., Mise-Omata, S., and Acuto, O. (2001). CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity* 15, 935-945.
- Michell, R.H., Heath, V.L., Lemmon, M.A., and Dove, S.K. (2006). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. *Trends Biochem Sci* 31, 52-63.
- Mikhailik, A., Ford, B., Keller, J., Chen, Y., Nassar, N., and Carpino, N. (2007). A phosphatase activity of Sts-1 contributes to the suppression of TCR signaling. *Mol Cell* 27, 486-497.

- Miller, A.T., and Berg, L.J. (2002). New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system. *Curr Opin Immunol* 14, 331-340.
- Missy, K., Van Poucke, V., Raynal, P., Viala, C., Mauco, G., Plantavid, M., Chap, H., and Payrastre, B. (1998). Lipid products of phosphoinositide 3-kinase interact with Rac1 GTPase and stimulate GDP dissociation. *J Biol Chem* 273, 30279-30286.
- Molina, T.J., Kishihara, K., Siderovski, D.P., van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C.J., Hartmann, K.U., Veillette, A., *et al.* (1992). Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* 357, 161-164.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Moon, K.D., Post, C.B., Durden, D.L., Zhou, Q., De, P., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (2005). Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 280, 1543-1551.
- Morris, J.B., Hincliffe, K.A., Ciruela, A., Letcher, A.J., and Irvine, R.F. (2000). Thrombin stimulation of platelets causes an increase in phosphatidylinositol 5-phosphate revealed by mass assay. *FEBS Lett* 475, 57-60.
- Murakami, H., Yamamura, Y., Shimono, Y., Kawai, K., Kurokawa, K., and Takahashi, M. (2002). Role of Dok1 in cell signaling mediated by RET tyrosine kinase. *J Biol Chem* 277, 32781-32790.
- Nakamura, K., Malykhin, A., and Coggeshall, K.M. (2002). The Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase negatively regulates Fcγ receptor-mediated phagocytosis through immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing phagocytic receptors. *Blood* 100, 3374-3382.
- Narkis, G., Ofir, R., Landau, D., Manor, E., Volokita, M., Hershkowitz, R., Elbedour, K., and Birk, O.S. (2007). Lethal contractural syndrome type 3 (LCCS3) is caused by a mutation in PIP5K1C, which encodes PIPKI gamma of the phosphatidylinositol pathway. *Am J Hum Genet* 81, 530-539.
- Nelms, K., Snow, A.J., and Noben-Trauth, K. (1998). Dok1 encoding p62(dok) maps to mouse chromosome 6 and human chromosome 2 in a region of translocation in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 53, 243-245.
- Nemorin, J.G., and Duplay, P. (2000). Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. *J Biol Chem* 275, 14590-14597.
- Nemorin, J.G., Laporte, P., Berube, G., and Duplay, P. (2001). p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells. *J Immunol* 166, 4408-4415.
- Niebuhr, K., Giuriato, S., Pedron, T., Philpott, D.J., Gaits, F., Sable, J., Sheetz, M.P., Parsot, C., Sansonetti, P.J., and Payrastre, B. (2002). Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S.flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *Embo J* 21, 5069-5078.
- Niebuhr, K., Jouihri, N., Allaoui, A., Gounon, P., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (2000). IpgD, a protein secreted by the type III secretion machinery of *Shigella flexneri*, is chaperoned by IpgE and implicated in entry focus formation. *Mol Microbiol* 38, 8-19.
- Niki, M., Di Cristofano, A., Zhao, M., Honda, H., Hirai, H., Van Aelst, L., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2004). Role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression. *J Exp Med* 200, 1689-1695.
- Ning, K., Miller, L.C., Laidlaw, H.A., Burgess, L.A., Perera, N.M., Downes, C.P., Leslie, N.R., and Ashford, M.L. (2006). A novel leptin signalling pathway via PTEN inhibition in hypothalamic cell lines and pancreatic beta-cells. *EMBO J* 25, 2377-2387.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-151.

- Noguchi, T., Matozaki, T., Inagaki, K., Tsuda, M., Fukunaga, K., Kitamura, Y., Kitamura, T., Shii, K., Yamanashi, Y., and Kasuga, M. (1999). Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration. *Embo J* 18, 1748-1760.
- Norris, F.A., Atkins, R.C., and Majerus, P.W. (1997). The cDNA cloning and characterization of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II. Evidence for conserved alternative splicing in the 4-phosphatase family. *J Biol Chem* 272, 23859-23864.
- Norris, F.A., Auethavekiat, V., and Majerus, P.W. (1995). The isolation and characterization of cDNA encoding human and rat brain inositol polyphosphate 4-phosphatase. *J Biol Chem* 270, 16128-16133.
- Nunes, J.A., Truneh, A., Olive, D., and Cantrell, D.A. (1996). Signal transduction by CD28 costimulatory receptor on T cells. B7-1 and B7-2 regulation of tyrosine kinase adaptor molecules. *J Biol Chem* 271, 1591-1598.
- Nystuen, A., Legare, M.E., Shultz, L.D., and Frankel, W.N. (2001). A null mutation in inositol polyphosphate 4-phosphatase type I causes selective neuronal loss in weeble mutant mice. *Neuron* 32, 203-212.
- Oak, J.S., and Fruman, D.A. (2007). Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in autoimmunity. *Autoimmunity* 40, 433-441.
- Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S.D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* 25, 229-235.
- Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Kubo, S., Shiraiishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., *et al.* (2006). The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 312, 1802-1805.
- Okkenhaug, K., Ali, K., and Vanhaesebroeck, B. (2007). Antigen receptor signalling: a distinctive role for the p110delta isoform of PI3K. *Trends Immunol* 28, 80-87.
- Okkenhaug, K., Bilancio, A., Farjot, G., Priddle, H., Sancho, S., Peskett, E., Pearce, W., Meek, S.E., Salpekar, A., Waterfield, M.D., *et al.* (2002). Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 297, 1031-1034.
- Okkenhaug, K., and Vanhaesebroeck, B. (2003). PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 3, 317-330.
- Osaki, M., Oshimura, M., and Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9, 667-676.
- Osman, N., Lucas, S.C., Turner, H., and Cantrell, D. (1995). A comparison of the interaction of Shc and the tyrosine kinase ZAP-70 with the T cell antigen receptor zeta chain tyrosine-based activation motif. *J Biol Chem* 270, 13981-13986.
- Osman, N., Turner, H., Lucas, S., Reif, K., and Cantrell, D.A. (1996). The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor zeta subunits and the CD3 gamma, delta and epsilon chains. *Eur J Immunol* 26, 1063-1068.
- Ott, V.L., Tamir, I., Niki, M., Pandolfi, P.P., and Cambier, J.C. (2002). Downstream of kinase, p62(dok), is a mediator of Fc gamma IIB inhibition of Fc epsilon RI signaling. *J Immunol* 168, 4430-4439.
- Oude Weernink, P.A., Schmidt, M., and Jakobs, K.H. (2004). Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases. *Eur J Pharmacol* 500, 87-99.
- Pages, F., Ragueneau, M., Rottapel, R., Truneh, A., Nunes, J., Imbert, J., and Olive, D. (1994). Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* 369, 327-329.
- Panaretou, C., Domin, J., Cockcroft, S., and Waterfield, M.D. (1997). Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. *J Biol Chem* 272, 2477-2485.

- Parrish, W.R., Stefan, C.J., and Emr, S.D. (2004). Essential role for the myotubularin-related phosphatase Ymr1p and the synaptojanin-like phosphatases Sjl2p and Sjl3p in regulation of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast. *Mol Biol Cell* 15, 3567-3579.
- Parry, R.V., Whittaker, G.C., Sims, M., Edmead, C.E., Welham, M.J., and Ward, S.G. (2006). Ligation of CD28 stimulates the formation of a multimeric signaling complex involving grb-2-associated binder 2 (gab2), SRC homology phosphatase-2, and phosphatidylinositol 3-kinase: evidence that negative regulation of CD28 signaling requires the gab2 pleckstrin homology domain. *J Immunol* 176, 594-602.
- Payraastre, B., Nievers, M., Boonstra, J., Breton, M., Verkleij, A.J., and Van Bergen en Henegouwen, P.M. (1992). A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J Biol Chem* 267, 5078-5084.
- Pendaries, C., Tronchere, H., Arbibe, L., Mounier, J., Gozani, O., Cantley, L., Fry, M.J., Gaits-Iacovoni, F., Sansonetti, P.J., and Payraastre, B. (2006). PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. *Embo J* 25, 1024-1034.
- Pendaries, C., Tronchere, H., Plantavid, M., and Payraastre, B. (2003). Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Lett* 546, 25-31.
- Pertile, P., and Cantley, L.C. (1995). Type 2 phosphatidylinositol 4-kinase is recruited to CD4 in response to CD4 cross-linking. *Biochim Biophys Acta* 1248, 129-134.
- Phan, G.Q., Yang, J.C., Sherry, R.M., Hwu, P., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Restifo, N.P., Haworth, L.R., Seipp, C.A., Freezer, L.J., *et al.* (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8372-8377.
- Pleiman, C.M., Hertz, W.M., and Cambier, J.C. (1994). Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science* 263, 1609-1612.
- Prasad, K.V., Janssen, O., Kapeller, R., Raab, M., Cantley, L.C., and Rudd, C.E. (1993a). Src-homology 3 domain of protein kinase p59fyn mediates binding to phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7366-7370.
- Prasad, K.V., Kapeller, R., Janssen, O., Repke, H., Duke-Cohan, J.S., Cantley, L.C., and Rudd, C.E. (1993b). Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and PI 4-kinase binding to the CD4-p56lck complex: the p56lck SH3 domain binds to PI 3-kinase but not PI 4-kinase. *Mol Cell Biol* 13, 7708-7717.
- Pratt, J.C., Igras, V.E., Maeda, H., Baksh, S., Gelfand, E.W., Burakoff, S.J., Neel, B.G., and Gu, H. (2000). Cutting edge: gab2 mediates an inhibitory phosphatidylinositol 3'-kinase pathway in T cell antigen receptor signaling. *J Immunol* 165, 4158-4163.
- Raguz, J., Wagner, S., Dikic, I., and Hoeller, D. (2007). Suppressor of T-cell receptor signalling 1 and 2 differentially regulate endocytosis and signalling of receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett* 581, 4767-4772.
- Rameh, L.E., Arvidsson, A., Carraway, K.L., 3rd, Couvillon, A.D., Rathbun, G., Crompton, A., VanRenterghem, B., Czech, M.P., Ravichandran, K.S., Burakoff, S.J., *et al.* (1997a). A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 272, 22059-22066.
- Rameh, L.E., and Cantley, L.C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274, 8347-8350.
- Rameh, L.E., Toliass, K.F., Duckworth, B.C., and Cantley, L.C. (1997b). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 390, 192-196.
- Ramel, D., Lagarrigue, F., Dupuis-Coronas, S., Chicanne, G., Leslie, N., Gaits-Iacovoni, F., Payraastre, B., and Tronchere, H. (2009). PtdIns5P protects Akt from dephosphorylation through PP2A inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 127-131.

- Rebecchi, M.J., and Scarlata, S. (1998). Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 503-528.
- Reif, K., Lucas, S., and Cantrell, D. (1997). A negative role for phosphoinositide 3-kinase in T-cell antigen receptor function. *Curr Biol* 7, 285-293.
- Reif, K., Okkenhaug, K., Sasaki, T., Penninger, J.M., Vanhaesebroeck, B., and Cyster, J.G. (2004). Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol* 173, 2236-2240.
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-384.
- Rhee, S.G., and Bae, Y.S. (1997). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 272, 15045-15048.
- Rickles, R.J., Botfield, M.C., Weng, Z., Taylor, J.A., Green, O.M., Brugge, J.S., and Zoller, M.J. (1994). Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *EMBO J* 13, 5598-5604.
- Riley, J.L., and June, C.H. (2005). The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105, 13-21.
- Roberts, H.F., Clarke, J.H., Letcher, A.J., Irvine, R.F., and Hinchliffe, K.A. (2005). Effects of lipid kinase expression and cellular stimuli on phosphatidylinositol 5-phosphate levels in mammalian cell lines. *FEBS Lett* 579, 2868-2872.
- Robinson, F.L., and Dixon, J.E. (2006). Myotubularin phosphatases: policing 3-phosphoinositides. *Trends Cell Biol* 16, 403-412.
- Rohrschneider, L.R., Fuller, J.F., Wolf, I., Liu, Y., and Lucas, D.M. (2000). Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev* 14, 505-520.
- Rudd, M.L., Tua-Smith, A., and Straus, D.B. (2006). Lck SH3 domain function is required for T-cell receptor signals regulating thymocyte development. *Mol Cell Biol* 26, 7892-7900.
- Ryser, J.E., Rungger-Brandle, E., Chaponnier, C., Gabbiani, G., and Vassalli, P. (1982). The area of attachment of cytotoxic T lymphocytes to their target cells shows high motility and polarization of actin, but not myosin. *J Immunol* 128, 1159-1162.
- Sade, H., and Sarin, A. (2003). IL-7 inhibits dexamethasone-induced apoptosis via Akt/PKB in mature, peripheral T cells. *Eur J Immunol* 33, 913-919.
- Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R.G., Oliveira-dos-Santos, A.J., Stanford, W.L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I., *et al.* (2000). Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287, 1040-1046.
- Sato, M., Ueda, Y., Takagi, T., and Umezawa, Y. (2003). Production of PtdInsP3 at endomembranes is triggered by receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 5, 1016-1022.
- Sattler, M., Verma, S., Byrne, C.H., Shrikhande, G., Winkler, T., Algate, P.A., Rohrschneider, L.R., and Griffin, J.D. (1999). BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 19, 7473-7480.
- Sauer, K., Liou, J., Singh, S.B., Yablonski, D., Weiss, A., and Perlmutter, R.M. (2001). Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes. *J Biol Chem* 276, 45207-45216.
- Sbrissa, D., Ikononov, O.C., Deeb, R., and Shisheva, A. (2002). Phosphatidylinositol 5-phosphate biosynthesis is linked to PIKfyve and is involved in osmotic response pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* 277, 47276-47284.

- Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., and Shisheva, A. (1999). PIKfyve, a mammalian ortholog of yeast Fab1p lipid kinase, synthesizes 5-phosphoinositides. Effect of insulin. *J Biol Chem* *274*, 21589-21597.
- Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., Strakova, J., and Shisheva, A. (2004). Role for a novel signaling intermediate, phosphatidylinositol 5-phosphate, in insulin-regulated F-actin stress fiber breakdown and GLUT4 translocation. *Endocrinology* *145*, 4853-4865.
- Schwab, S.G., Knapp, M., Sklar, P., Eckstein, G.N., Sewekow, C., Borrmann-Hassenbach, M., Albus, M., Becker, T., Hallmayer, J.F., Lerer, B., *et al.* (2006). Evidence for association of DNA sequence variants in the phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase IIalpha gene (PIP5K2A) with schizophrenia. *Mol Psychiatry* *11*, 837-846.
- Senderek, J., Bergmann, C., Weber, S., Ketelsen, U.P., Schorle, H., Rudnik-Schoneborn, S., Buttner, R., Buchheim, E., and Zerres, K. (2003). Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15. *Hum Mol Genet* *12*, 349-356.
- Shah, K., and Shokat, K.M. (2002). A chemical genetic screen for direct v-Src substrates reveals ordered assembly of a retrograde signaling pathway. *Chem Biol* *9*, 35-47.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* *22*, 1567-1572.
- Shi, L., Yue, J., You, Y., Yin, B., Gong, Y., Xu, C., Qiang, B., Yuan, J., Liu, Y., and Peng, X. (2006a). Dok5 is substrate of TrkB and TrkC receptors and involved in neurotrophin induced MAPK activation. *Cell Signal* *18*, 1995-2003.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M.R., *et al.* (2006b). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* *442*, 96-99.
- Shim, E.K., Moon, C.S., Lee, G.Y., Ha, Y.J., Chae, S.K., and Lee, J.R. (2004). Association of the Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kD (SLP-76) with the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. *FEBS Lett* *575*, 35-40.
- Shinohara, H., Inoue, A., Toyama-Sorimachi, N., Nagai, Y., Yasuda, T., Suzuki, H., Horai, R., Iwakura, Y., Yamamoto, T., Karasuyama, H., *et al.* (2005). Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling. *J Exp Med* *201*, 333-339.
- Shisheva, A. (2001). PIKfyve: the road to PtdIns 5-P and PtdIns 3,5-P(2). *Cell Biol Int* *25*, 1201-1206.
- Shisheva, A. (2008). PIKfyve: Partners, significance, debates and paradoxes. *Cell Biol Int* *32*, 591-604.
- Shui, J.W., Boomer, J.S., Han, J., Xu, J., Dement, G.A., Zhou, G., and Tan, T.H. (2007). Hematopoietic progenitor kinase 1 negatively regulates T cell receptor signaling and T cell-mediated immune responses. *Nat Immunol* *8*, 84-91.
- Sicheri, F., and Kuriyan, J. (1997). Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol* *7*, 777-785.
- Sinclair, L.V., Finlay, D., Feijoo, C., Cornish, G.H., Gray, A., Ager, A., Okkenhaug, K., Hagenbeek, T.J., Spits, H., and Cantrell, D.A. (2008). Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* *9*, 513-521.
- Sleeman, M.W., Wortley, K.E., Lai, K.M., Gowen, L.C., Kintner, J., Kline, W.O., Garcia, K., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., *et al.* (2005). Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nat Med* *11*, 199-205.
- Solheim, S.A., Petsalaki, E., Stokka, A.J., Russell, R.B., Tasken, K., and Berge, T. (2008a). Interactions between the Fyn SH3-domain and adaptor protein Cbp/PAG derived ligands, effects on kinase activity and affinity. *FEBS J* *275*, 4863-4874.

- Solheim, S.A., Torgersen, K.M., Tasken, K., and Berge, T. (2008b). Regulation of FynT function by dual domain docking on PAG/Cbp. *J Biol Chem* 283, 2773-2783.
- Sommers, C.L., Gurson, J.M., Surana, R., Barda-Saad, M., Lee, J., Kishor, A., Li, W., Gasser, A.J., Barr, V.A., Miyaji, M., *et al.* (2008). Bam32: a novel mediator of Erk activation in T cells. *Int Immunol* 20, 811-818.
- Songyang, Z., Yamanashi, Y., Liu, D., and Baltimore, D. (2001). Domain-dependent function of the rasGAP-binding protein p62Dok in cell signaling. *J Biol Chem* 276, 2459-2465.
- Srivastava, R., Sinha, R.K., and Subrahmanyam, G. (2006). Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta associates with TCR-CD3 zeta chain in Jurkat cells. *Mol Immunol* 43, 454-463.
- Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J., Lens, S.M., Coffey, P.J., Burgering, B.M., and Medema, R.H. (2002). The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* 168, 5024-5031.
- Steele-Mortimer, O., Knodler, L.A., Marcus, S.L., Scheid, M.P., Goh, B., Pfeifer, C.G., Duronio, V., and Finlay, B.B. (2000). Activation of Akt/protein kinase B in epithelial cells by the Salmonella typhimurium effector sigD. *J Biol Chem* 275, 37718-37724.
- Stefanova, I., Hemmer, B., Vergelli, M., Martin, R., Biddison, W.E., and Germain, R.N. (2003). TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol* 4, 248-254.
- Stein, P.L., Lee, H.M., Rich, S., and Soriano, P. (1992). pp59fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 70, 741-750.
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13, 139-145.
- Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., *et al.* (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710-714.
- Stephens, L., Ellson, C., and Hawkins, P. (2002). Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14, 203-213.
- Stokoe, D. (2001). Pten. *Curr Biol* 11, R502.
- Stopkova, P., Vevera, J., Paclt, I., Zukov, I., Papolos, D.F., Saito, T., and Lachman, H.M. (2005). Screening of PIP5K2A promoter region for mutations in bipolar disorder and schizophrenia. *Psychiatr Genet* 15, 223-227.
- Straus, D.B., Chan, A.C., Patai, B., and Weiss, A. (1996). SH2 domain function is essential for the role of the Lck tyrosine kinase in T cell receptor signal transduction. *J Biol Chem* 271, 9976-9981.
- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (1994). JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 77, 727-736.
- Sugimoto, Y., Whitman, M., Cantley, L.C., and Erikson, R.L. (1984). Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2117-2121.
- Suire, S., Condliffe, A.M., Ferguson, G.J., Ellson, C.D., Guillou, H., Davidson, K., Welch, H., Coadwell, J., Turner, M., Chilvers, E.R., *et al.* (2006). Gbetagammagamma and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. *Nat Cell Biol* 8, 1303-1309.
- Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Stambolic, V., Elia, A.J., Sasaki, T., del Barco Barrantes, I., Ho, A., Wakeham, A., Itie, A., Khoo, W., *et al.* (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 8, 1169-1178.

- Suzuki, A., Yamaguchi, M.T., Ohteki, T., Sasaki, T., Kaisho, T., Kimura, Y., Yoshida, R., Wakeham, A., Higuchi, T., Fukumoto, M., *et al.* (2001). T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* *14*, 523-534.
- Takenawa, T., and Itoh, T. (2001). Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* *1533*, 190-206.
- Tamir, I., Stolpa, J.C., Helgason, C.D., Nakamura, K., Bruhns, P., Daeron, M., and Cambier, J.C. (2000). The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. *Immunity* *12*, 347-358.
- Tarasenko, T., Kole, H.K., Chi, A.W., Mentink-Kane, M.M., Wynn, T.A., and Bolland, S. (2007). T cell-specific deletion of the inositol phosphatase SHIP reveals its role in regulating Th1/Th2 and cytotoxic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 11382-11387.
- Taylor, G.S., Maehama, T., and Dixon, J.E. (2000). Inaugural article: myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 8910-8915.
- Teft, W.A., Kirchhof, M.G., and Madrenas, J. (2006). A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* *24*, 65-97.
- Thomas, C.C., Dowler, S., Deak, M., Alessi, D.R., and van Aalten, D.M. (2001). Crystal structure of the phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate-binding pleckstrin homology (PH) domain of tandem PH-domain-containing protein 1 (TAPP1): molecular basis of lipid specificity. *Biochem J* *358*, 287-294.
- Tomlinson, M.G., Heath, V.L., Turck, C.W., Watson, S.P., and Weiss, A. (2004). SHIP family inositol phosphatases interact with and negatively regulate the Tec tyrosine kinase. *J Biol Chem* *279*, 55089-55096.
- Tronchere, H., Buj-Bello, A., Mandel, J.L., and Payrastre, B. (2003). Implication of phosphoinositide phosphatases in genetic diseases: the case of myotubularin. *Cell Mol Life Sci* *60*, 2084-2099.
- Tronchere, H., Laporte, J., Pendaries, C., Chaussade, C., Liaubet, L., Pirola, L., Mandel, J.L., and Payrastre, B. (2004). Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. *J Biol Chem* *279*, 7304-7312.
- Trotard, M., Lepere-Douard, C., Regeard, M., Piquet-Pellorce, C., Lavillette, D., Cosset, F.L., Gripon, P., and Le Seyec, J. (2009). Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *FASEB J* *23*, 3780-3789.
- Tsui, H.W., Siminovitch, K.A., de Souza, L., and Tsui, F.W. (1993). Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* *4*, 124-129.
- Tu, Z., Ninos, J.M., Ma, Z., Wang, J.W., Lemos, M.P., Desponts, C., Ghansah, T., Howson, J.M., and Kerr, W.G. (2001). Embryonic and hematopoietic stem cells express a novel SH2-containing inositol 5'-phosphatase isoform that partners with the Grb2 adapter protein. *Blood* *98*, 2028-2038.
- Turner, J.M., Brodsky, M.H., Irving, B.A., Levin, S.D., Perlmutter, R.M., and Littman, D.R. (1990). Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* *60*, 755-765.
- Ungewickell, A., Hugge, C., Kisseleva, M., Chang, S.C., Zou, J., Feng, Y., Galyov, E.E., Wilson, M., and Majerus, P.W. (2005). The identification and characterization of two phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 18854-18859.
- Vaillancourt, F.H., Pilote, L., Cartier, M., Lippens, J., Liuzzi, M., Bethell, R.C., Cordingley, M.G., and Kukulj, G. (2009). Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* *387*, 5-10.

- van Dijk, T.B., van Den Akker, E., Amelsvoort, M.P., Mano, H., Lowenberg, B., and von Lindern, M. (2000). Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells. *Blood* 96, 3406-3413.
- van Rossum, D.B., Patterson, R.L., Sharma, S., Barrow, R.K., Kornberg, M., Gill, D.L., and Snyder, S.H. (2005). Phospholipase C γ 1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. *Nature* 434, 99-104.
- Vang, T., Abrahamsen, H., Myklebust, S., Enserink, J., Prydz, H., Mustelin, T., Amarzguioui, M., and Tasken, K. (2004). Knockdown of C-terminal Src kinase by siRNA-mediated RNA interference augments T cell receptor signaling in mature T cells. *Eur J Immunol* 34, 2191-2199.
- Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3, 561-576.
- Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B., and Foukas, L.C. (2005). Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* 30, 194-204.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., and Waterfield, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70, 535-602.
- Varnai, P., Thyagarajan, B., Rohacs, T., and Balla, T. (2006). Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J Cell Biol* 175, 377-382.
- Venkateswarlu, K., Oatey, P.B., Tavare, J.M., and Cullen, P.J. (1998). Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Curr Biol* 8, 463-466.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Vyas, P., Norris, F.A., Joseph, R., Majerus, P.W., and Orkin, S.H. (2000). Inositol polyphosphate 4-phosphatase type I regulates cell growth downstream of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13696-13701.
- Wahle, J.A., Paraiso, K.H., Kendig, R.D., Lawrence, H.R., Chen, L., Wu, J., and Kerr, W.G. (2007). Inappropriate recruitment and activity by the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP1) is responsible for receptor dominance in the SHIP-deficient NK cell. *J Immunol* 179, 8009-8015.
- Wang, H., Liu, H., Lu, Y., Lovatt, M., Wei, B., and Rudd, C.E. (2007). Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion. *Mol Cell Biol* 27, 6863-6875.
- Wang, H., Moon, E.Y., Azouz, A., Wu, X., Smith, A., Schneider, H., Hogg, N., and Rudd, C.E. (2003a). SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nat Immunol* 4, 366-374.
- Wang, Y.J., Wang, J., Sun, H.Q., Martinez, M., Sun, Y.X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J.P., Roth, M.G., and Yin, H.L. (2003b). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* 114, 299-310.
- Ward, S.G. (2006). T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends Immunol* 27, 80-87.
- Ward, S.G., Ley, S.C., MacPhee, C., and Cantrell, D.A. (1992). Regulation of D-3 phosphoinositides during T cell activation via the T cell antigen receptor/CD3 complex and CD2 antigens. *Eur J Immunol* 22, 45-49.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science* 270, 985-988.

- Watt, S.A., Kimber, W.A., Fleming, I.N., Leslie, N.R., Downes, C.P., and Lucocq, J.M. (2004). Detection of novel intracellular agonist responsive pools of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate using the TAPP1 pleckstrin homology domain in immunoelectron microscopy. *Biochem J* 377, 653-663.
- Watt, S.A., Kular, G., Fleming, I.N., Downes, C.P., and Lucocq, J.M. (2002). Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J* 363, 657-666.
- Werlen, G., Jacinto, E., Xia, Y., and Karin, M. (1998). Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO J* 17, 3101-3111.
- West, K.A., Castillo, S.S., and Dennis, P.A. (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 5, 234-248.
- Whang, Y.E., Wu, X., Suzuki, H., Reiter, R.E., Tran, C., Vessella, R.L., Said, J.W., Isaacs, W.B., and Sawyers, C.L. (1998). Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5246-5250.
- Whitman, M., Downes, C.P., Keeler, M., Keller, T., and Cantley, L. (1988). Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 332, 644-646.
- Wick, M.J., Dong, L.Q., Hu, D., Langlais, P., and Liu, F. (2001). Insulin receptor-mediated p62dok tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt. *J Biol Chem* 276, 42843-42850.
- Wilcox, A., and Hinchliffe, K.A. (2008). Regulation of extranuclear PtdIns5P production by phosphatidylinositol phosphate 4-kinase 2alpha. *FEBS Lett* 582, 1391-1394.
- Wishart, M.J., and Dixon, J.E. (2002). PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. *Trends Cell Biol* 12, 579-585.
- Wisniewski, D., Strife, A., Swendeman, S., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Kavanaugh, W.M., Tempst, P., and Clarkson, B. (1999). A novel SH2-containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase (SHIP2) is constitutively tyrosine phosphorylated and associated with src homologous and collagen gene (SHC) in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Blood* 93, 2707-2720.
- Woodring, P.J., Hunter, T., and Wang, J.Y. (2001). Inhibition of c-Abl tyrosine kinase activity by filamentous actin. *J Biol Chem* 276, 27104-27110.
- Woodring, P.J., Meisenhelder, J., Johnson, S.A., Zhou, G.L., Field, J., Shah, K., Bladt, F., Pawson, T., Niki, M., Pandolfi, P.P., *et al.* (2004). c-Abl phosphorylates Dok1 to promote filopodia during cell spreading. *J Cell Biol* 165, 493-503.
- Wu, L., Yu, Z., and Shen, S.H. (2002). SKAP55 recruits to lipid rafts and positively mediates the MAPK pathway upon T cell receptor activation. *J Biol Chem* 277, 40420-40427.
- Xu, H., and Littman, D.R. (1993). A kinase-independent function of Lck in potentiating antigen-specific T cell activation. *Cell* 74, 633-643.
- Xu, H., and Littman, D.R. (1995). The kinase-dependent function of Lck in T-cell activation requires an intact site for tyrosine autophosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 766, 99-116.
- Xue, Y., Fares, H., Grant, B., Li, Z., Rose, A.M., Clark, S.G., and Skolnik, E.Y. (2003). Genetic analysis of the myotubularin family of phosphatases in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 278, 34380-34386.
- Yamamoto, A., DeWald, D.B., Boronenkov, I.V., Anderson, R.A., Emr, S.D., and Koshland, D. (1995). Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast. *Mol Biol Cell* 6, 525-539.
- Yamanashi, Y., and Baltimore, D. (1997). Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell* 88, 205-211.

- Yamasaki, S., Nishida, K., Sakuma, M., Berry, D., McGlade, C.J., Hirano, T., and Saito, T. (2003). Gads/Grb2-mediated association with LAT is critical for the inhibitory function of Gab2 in T cells. *Mol Cell Biol* 23, 2515-2529.
- Yang, W.C., Ching, K.A., Tsoukas, C.D., and Berg, L.J. (2001). Tec kinase signaling in T cells is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and the Tec pleckstrin homology domain. *J Immunol* 166, 387-395.
- Yang, W.C., Ghiotto, M., Barbarat, B., and Olive, D. (1999). The role of Tec protein-tyrosine kinase in T cell signaling. *J Biol Chem* 274, 607-617.
- Yasuda, T., Bundo, K., Hino, A., Honda, K., Inoue, A., Shirakata, M., Osawa, M., Tamura, T., Nariuchi, H., Oda, H., *et al.* (2007). Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signaling. *Int Immunol* 19, 487-495.
- Yasuda, T., Shirakata, M., Iwama, A., Ishii, A., Ebihara, Y., Osawa, M., Honda, K., Shinohara, H., Sudo, K., Tsuji, K., *et al.* (2004). Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. *J Exp Med* 200, 1681-1687.
- Yin, H.L., and Janmey, P.A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* 65, 761-789.
- Yoo, J.K., Cho, J.H., Lee, S.W., and Sung, Y.C. (2002). IL-12 provides proliferation and survival signals to murine CD4+ T cells through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Immunol* 169, 3637-3643.
- Yoshida, K., Yamashita, Y., Miyazato, A., Ohya, K., Kitanaka, A., Ikeda, U., Shimada, K., Yamanaka, T., Ozawa, K., and Mano, H. (2000). Mediation by the protein-tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1. *J Biol Chem* 275, 24945-24952.
- Yu, J.W., Mendrola, J.M., Audhya, A., Singh, S., Keleti, D., DeWald, D.B., Murray, D., Emr, S.D., and Lemmon, M.A. (2004). Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 13, 677-688.
- Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497-5510.
- Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., and Tsien, R.Y. (2002a). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 906-918.
- Zhang, S.Q., Tsiaras, W.G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., and Neel, B.G. (2002b). Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol Cell Biol* 22, 4062-4072.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P., and Samelson, L.E. (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92.
- Zhang, W., Sommers, C.L., Burshtyn, D.N., Stebbins, C.C., DeJarnette, J.B., Tribble, R.P., Grinberg, A., Tsay, H.C., Jacobs, H.M., Kessler, C.M., *et al.* (1999). Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* 10, 323-332.
- Zhang, W., Tribble, R.P., Zhu, M., Liu, S.K., McGlade, C.J., and Samelson, L.E. (2000). Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* 275, 23355-23361.
- Zhang, Y., Yan, Z., Farooq, A., Liu, X., Lu, C., Zhou, M.M., and He, C. (2004). Molecular basis of distinct interactions between Dok1 PTB domain and tyrosine-phosphorylated EGF receptor. *J Mol Biol* 343, 1147-1155.
- Zhao, M., Janas, J.A., Niki, M., Pandolfi, P.P., and Van Aelst, L. (2006). Dok-1 independently attenuates Ras/mitogen-activated protein kinase and Src/c-myc pathways to inhibit platelet-derived growth factor-induced mitogenesis. *Mol Cell Biol* 26, 2479-2489.

Zhao, M., Schmitz, A.A., Qin, Y., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P., and Van Aelst, L. (2001). Phosphoinositide 3-kinase-dependent membrane recruitment of p62(dok) is essential for its negative effect on mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. *J Exp Med* *194*, 265-274.

Zou, J., Marjanovic, J., Kisseleva, M.V., Wilson, M., and Majerus, P.W. (2007). Type I phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatase regulates stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 16834-16839.

zur Hausen, J.D., Burn, P., and Amrein, K.E. (1997). Co-localization of Fyn with CD3 complex, CD45 or CD28 depends on different mechanisms. *Eur J Immunol* *27*, 2643-2649.

Summary:

PtdIns5P is a rare phosphoinositide and is starting to emerge as a potential second messenger. Bacterial infection by *Shigella flexnerii* via the virulence factor IpgD, generates PtdIns5P in the host cells and induces Akt activation. Recent evidences report that enhanced tyrosine phosphorylation increase cellular PtdIns5P levels and that PtdIns5P could have a role in oncogenesis. Altogether, these data argue for an important role of PtdIns5P in cell signalling.

Recently, we demonstrated a PtdIns5P production in T cells upon TCR triggering. Interestingly we showed that Dok-1 and Dok-2 proteins (for *Downstream of tyrosine kinase*) tyrosine phosphorylation correlated with PtdIns5P increase. These structurally related adapter molecules contain a pleckstrin homology (PH) domain generally acting as a lipid/protein-interacting module. We found that Dok-1/Dok-2 PH domains bind in vitro to PtdIns5P. The presence of this PH domain is necessary for the tyrosine phosphorylation of Dok-1 and Dok-2 proteins and their negative functions in T cells. Together, our data identify a novel lipid mediator in T cell signalling and suggest that PtdIns5P could be a new yet uncharacterized second messenger in T cell activation.

We next focused on a new PtdIns5P binding module, the PH domain Dok-5. Our in vitro data revealed a stronger interaction between Dok-5 PH and PtdIns5P. We used Dok-5 PH domain and IpgD as tools to characterize PtdIns5P functional effects on T cells. Our results show that IpgD expression induces Src-kinase and Akt activation, but not ERK activation and enhances IL-2 promoter activity in T cells. Expression of this PtdIns5P interacting domain blocks IpgD-induced T cell activation and selective signaling molecules downstream of TCR triggering. Altogether, these data suggest that PtdIns5P may play a sensor function in setting the threshold of T cell activation and contributing to maintain T cell homeostasis.

Résumé :

Le PtdIns5P est un phosphoinositide très peu connu et émerge dernièrement en tant qu'important nouveau second messager. D'ailleurs, l'augmentation artificielle de PtdIns5P dans les cellules épithéliales, favorise la voie pro-oncogénique Phosphoinositide 3-kinase/AKT. Plus récemment, il a été fait état d'un possible rôle du PtdIns5P dans le processus de lymphomagenèse.

Notre laboratoire étudie depuis de nombreuses années les voies de signalisations importantes de l'activation lymphocytaire T et notamment la voie pro-oncogénique PI3K. Le laboratoire s'est tourné notamment vers l'étude des protéines adaptatrices de la famille Dok (Downstream of Kinase) lors de l'activation lymphocytaire T.

Ainsi le but de ce travail a été dans un premier temps l'étude des protéines adaptatrices Dok-1 et Dok-2 durant l'activation lymphocytaire T. Plus précisément, nous nous sommes focalisés sur le rôle de leur domaine pleckstrin homology (PH) dans leur fonction inhibitrice durant l'activation lymphocytaire T. De manière intéressante nous avons pu caractériser le PtdIns5P comme un ligand convaincant des domaines PH de Dok-1 et Dok-2 et engendrant leur phosphorylation et donc leur activation. Des dosages de PtdIns5P effectués après une stimulation du récepteur des cellules T (TCR) nous ont permis d'observer une augmentation de PtdIns5P suite à cette activation lymphocytaire T.

Dans un second temps nous nous sommes intéressés à caractériser les autres ligands des domaines PH de la famille Dok. De manière intéressante nous avons pu identifier le domaine PH de Dok-5 comme un interacteur fort avec le PtdIns5P. La caractérisation plus précise de l'impact du PtdIns5P, nous a permis de montrer la modulation positive de protéines clés des voies de signalisation intracellulaire telles que les Src kinases et AKT qui sont retrouvées phosphorylées suite à une augmentation de PtdIns5P.

L'ensemble de ces résultats faisant du PtdIns5P un nouveau messager de l'activation lymphocytaire T, pouvant contribuer au maintien de l'homéostasie des lymphocytes T.