

ETUDE D'UNE VOIE DE SIGNALISATION INTERVENANT DANS LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES LYMPHOCYTES T

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2003
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Bruno, Olivier GOMES

Né, le 18 novembre 1979 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

Directeur de thèse : **Mlle le Docteur Séverine BOULLIER**

JURY

PRESIDENT :

M. Antoine BLANCHER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

Mlle Séverine BOULLIER

M. Gilles FOUCRAS

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



REMERCIEMENTS

J'exprime ma plus profonde gratitude à **Monsieur le Professeur Antoine BLANCHER**,
Professeur des Universités,
Praticien hospitalier,
Immunologie (Option Biologique),
qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements à **Mademoiselle le Docteur Séverine BOULLIER**,
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Immunologie générale et médicale,
pour avoir accepté de diriger cette thèse.

Je suis très honoré par l'intérêt que **Monsieur le Docteur Gilles FOUCRAS**,
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pathologie du bétail,
a porté à ce travail. Je le remercie d'avoir bien voulu juger cette thèse.

REMERCIEMENTS

J'adresse au **Docteur Lucette PELLETIER** ma plus sincère reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Sa gentillesse, ses conseils et sa confiance m'ont profondément touché.

Je remercie **Pierre Emmanuel PAULET** pour sa bonne humeur et son aide technique.

Que tous les membres de l'ex-Unité 28 de l'INSERM soient ici remerciés pour leur soutien et leur attention.

A mes parents,

A mon frère

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....p12

Partie I : Les principales voies de signalisation dans les lymphocytes T après reconnaissance de l'antigène.....p14

1. Signalisation en aval du récepteur T pour l'antigène..... p14

- 1.1. Les différents partenaires..... p14
- 1.2. Les événements précoces de la signalisation..... p17
 - 1.2.1. Les tyrosines kinases de la famille Src..... p17
 - 1.2.2. Phosphorylation des ITAM..... p18
 - 1.2.3. Les tyrosines kinases de la famille Syk..... p19
- 1.3. La voie de la phospholipase C gamma 1..... p21
- 1.4. La voie calcique.. p23
- 1.5. Les protéines kinases C..... p26
- 1.6. Les GTPases..... p28
- 1.7. La voie des MAP kinases..... p30
- 1.8. La voie de la PI-3kinase..... p32

2. Activation du lymphocyte T : rôle des molécules de costimulation..... p33

Partie II : Les populations lymphocytaires Th1 et Th2..... p36

1. Les lymphocytes Th1..... p37

2. Les lymphocytes Th2..... p39

3. Polarisation de la réponse T CD4 et équilibre Th1/Th2..... p41

- 3.1. Rôle des cytokines dans la différenciation lymphocytaire..... p41
 - 3.1.1. Polarisation Th1..... p41
 - 3.1.2. Différenciation Th2..... p42
 - 3.1.3. Effets régulateurs des cytokines de type Th1 et Th2..... p44
- 3.2. Autres facteurs influençant la différenciation Th1/Th2..... p45
 - 3.2.1. Les cellules présentatrices d'antigènes..... p45
 - 3.2.2. L'antigène..... p45
 - 3.2.3. Les facteurs génétiques..... p46

4. Différences entre les cellules Th1 et Th2..... p48

- 4.1. Les récepteurs membranaires..... p48
- 4.2. Les facteurs de transcription..... p48
 - 4.2.1. Les facteurs de transcription spécifiques..... p48
 - 4.2.1.1. Les facteurs de transcription spécifiques des cellules Th1..... p49
 - 4.2.1.2. Les facteurs de transcription spécifiques des cellules Th2..... p51
 - 4.2.2. Les facteurs de transcription ubiquitaires..... p52
- 4.3. Remodelage de la chromatine..... p55
- 4.4. Voies de signalisation..... p56
 - 4.4.1. Voies de signalisation des récepteurs des cytokines..... p56
 - 4.4.1.1. Les récepteurs de cytokines dans les lymphocytes Th1..... p57
 - 4.4.1.2. Les récepteurs de cytokines dans les lymphocytes Th2..... p58

4.4.2. Voies de signalisation des récepteurs des chémokines.....	p58
4.4.3. Voies de signalisation des molécules de costimulation.....	p59
4.4.4. Voies de signalisation activées par le TCR.....	p60
4.4.4.1. Importance de l'intensité de stimulation du TCR dans la signalisation Th1/Th2.....	p60
4.4.4.2. Rôle des tyrosines kinases dans l'équilibre Th1/Th2.....	p61
4.4.4.3. Rôle des MAP kinases dans les différences Th1/Th2.....	p62

Partie III : Les modèles animaux de désordres immunopathologiques de type Th1 et Th2.....p64

1. Environnement, équilibre Th1/Th2 et manifestations allergiques.....	p64
2. Les modèles animaux de désordres immunopathologiques de type Th1.....	p66
2.1. L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale.....	p66
2.2. Autres modèles de maladies de type Th1.....	p67
3. Les modèles animaux de désordres immunopathologiques de type Th2.....	p68
3.1. Les maladies induites par les sels de métaux lourds.....	p68
3.2. Modèle animal de l'asthme allergique.....	p71
4. Dualité Th1/Th2 : la fin d'un paradigme ?	p72

Partie IV : Présentation d'une voie de signalisation impliquée dans la production d'IL-4 par les lymphocytes Th2..... p73

1. Caractérisation de cette voie de signalisation.....	p73
2. Les canaux calciques de type L.....	p76
3. Les protéines kinases C.....	p79

OBJECTIFS..... p80

MATERIEL ET METHODES.....p81

1. Animaux.....	p81
2. Différenciation des cellules Th1 et Th2.....	p81
3. Hybridome T.....	p82
4. Mesure de la production d'IL-4 et d'IFN γ	p82
5. Immunoempreinte.....	p82
6. Transfection par des oligonucléotides antisens.....	p83
7. Marquage des récepteurs à la dihydropyridine et microscopie confocale.....	p83
8. Analyse de la concentration intracellulaire en calcium.....	p83
9. Etude du potentiel membranaire.....	p84
10. Traitement des rats BN avec les sels d'or.....	p85
11. Induction de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale.....	p85
12. Analyse statistique.....	p85

RESULTATS.....p86

- 1. Etude des DHPR dans des lymphocytes Th2 et des modèles animaux..... p86**
 - 1.1.Les sous-unités $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ sont exprimées dans les cellules Th2 murines mais pas dans les lymphocytes Th1..... p86
 - 1.2.Des oligonucléotides antisens $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ inhibent l'expression des DHPR, la réponse calcique, et la synthèse d'IL-4 par les lymphocytes Th2..... p86
 - 1.3.Etude du potentiel membranaire des lymphocytes Th2 suite à l'engagement du TCR..... p89
 - 1.4.Un inhibiteur des DHPR prévient l'apparition d'une maladie autoimmune médiée par les lymphocytes Th2, mais n'a pas d'effet sur une maladie de type Th1..... p91
- 2. Etude des isoformes de PKC intervenant dans la synthèse d'IL-4..... p93**
 - 1.1.Etude des isoformes de PKC exprimées par les lymphocytes Th1 et Th2..... p93
 - 1.2.Effets d'oligonucléotides antisens ciblant les isoformes de PKC sur la production d'IL-4 et d'IFN γ par un hybridome T..... p93

DISCUSSION.....p95

- 1. Les récepteurs à la dihydropyridine : un nouveau canal calcique dans les lymphocytes Th2.....p95**
- 2. Régulation des DHPR dans les lymphocytes Th2.....p97**
- 3. Effet d'inhibiteurs des canaux calciques sur des maladies de type Th2..... p98**
- 4. Protéines kinases C et production d'IL-4.....p98**

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... p99

- 1. Fonctionnement des canaux calciques sensibles à la DHP dans les lymphocytes Th2.....p99**
- 2. Intérêt des inhibiteurs de canaux calciques dans le traitement des maladies de type Th2..... p100**
- 3. Rôle des isoformes de PKC dans les propriétés effectrices des lymphocytes Th2.....p101**

REFERENCES..... p103

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Principales voies de signalisation dépendantes du TCR.....	p16
Figure 2 : Fonctions des lymphocytes Th1.....	p38
Figure 3 : Fonctions des lymphocytes Th2.....	p40
Figure 4 : Voies de signalisation mises en jeu dans la différenciation Th1/Th2.....	p50
Figure 5 : Voie de signalisation permettant la synthèse d'IL-4 par le lymphocyte Th2.....	p75
Figure 6 : Structure du canal calcique de type L et cartographie fonctionnelle de la sous-unité alpha-1.....	p77
Figure 7 : Les lymphocytes Th2 murins, mais pas les Th1, expriment les protéines alpha-1C et alpha-1D.....	p87
Figure 8 : Des oligonucléotides antisens alpha-1C et -1D inhibent l'expression des DHPR, la réponse calcique, et la synthèse d'IL-4 par les lymphocytes Th2.....	p88
Figure 9 : Etude du potentiel membranaire d'un hybridome T et des lymphocytes Th2 suite à une stimulation du TCR	p90
Figure 10 : La nifedipine prévient l'apparition d'une maladie auto-immune de type Th2, mais n'a pas d'effet sur une maladie de type Th1.....	p92
Figure 11 : Effets d'oligonucléotides antisens des isoformes de PKC sur la production d'IL-4 et d'IFN γ par un hybridome T.....	p94
Tableau 1 : Variations de potentiel membranaire mesurées après stimulation du TCR d'un hybridome T et de cellules Th2.....	p90

ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ATPS	Aurothiopropanol sulfonate (sel d'or)
CCTL	Canal Calcique de Type L
[Ca²⁺]_i	Concentration en calcium intracellulaire
CPA	Cellule Présentatrice d' Antigènes
CRAC	Calcium Release Activated Calcium channel
DAG	Diacylglycérol
DHP	Dihydropyridine
DHPR	Récepteur à la Dihydropyridine
EAE	Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
IFNγ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
Ova	Peptide 323-339 de l'ovalbumine
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
Rats BN	Rats de souche Brown-Norway
Rats LEW	Rats de souche Lewis
RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
RyR	Récepteurs à la Ryanodine
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TCR	Récepteur des Cellules T pour l'antigène
Th	Lymphocyte T helper

INTRODUCTION

Les maladies liées à des dysfonctionnements du système immunitaire résultent d'interactions complexes entre différentes populations cellulaires et des agents environnementaux, sous le contrôle étroit de facteurs génétiques. Ces maladies peuvent être schématiquement divisées en deux catégories, les maladies auto-immunes et les réactions d'hypersensibilité.

Les mécanismes immunologiques impliqués dans la physiopathologie de ces deux types de désordres révèlent un rôle prépondérant des lymphocytes T. La découverte de l'hétérogénéité des lymphocytes T auxiliaires a amélioré la compréhension de la pathogénie de ces maladies. En effet, deux populations de lymphocytes T auxiliaires (*T helper*, Th) sont mises en jeu, les lymphocytes Th1 et les lymphocytes Th2, divergents tant par leurs fonctions et que par leur profil de sécrétion de cytokines. Ainsi les maladies auto-immunes et les réactions d'hypersensibilité retardée se caractérisent par des réponses immunes de type Th1, et les réactions d'hypersensibilité immédiate par des réponses de type Th2. Un équilibre existe entre ces deux types de réponses. Mais une rupture de cette homéostasie dans le sens d'une réponse de type Th1 est responsable d'une susceptibilité à développer des maladies auto-immunes, et inversement un déséquilibre vers une réponse dominante de type Th2 conduit à une susceptibilité à exprimer des maladies allergiques.

Le contrôle de cet équilibre Th1/Th2 fait appel à de multiples composantes. Nous avons abordé ce vaste problème en étudiant une voie de signalisation intervenant dans la production de cytokines par les lymphocytes Th2. Cette signalisation met en jeu la protéine kinase C, la voie calcique, et des récepteurs à la dihydropyridine, et conduit à la synthèse d'interleukine-4 suite à la stimulation du récepteur T pour l'antigène. Une dissection *in vitro* de cette voie a été entreprise, et cette approche s'est doublée d'une étude *in vivo* sur des modèles animaux de pathologies de type Th1 et Th2.

Nous aborderons dans le chapitre introductif à ce travail expérimental quatre points utiles à sa compréhension et à ses prolongements attendus :

1. Les principales voies de signalisation activées dans les lymphocytes T après reconnaissance de l'antigène ;
2. Les différents aspects moléculaires, cellulaires et fonctionnels de l'équilibre entre les populations de lymphocytes auxiliaires Th1 et Th2 ;
3. La présentation de quelques modèles animaux de désordres immunopathologiques de type Th1 et Th2 ;
4. La mise en évidence de la voie de signalisation étudiée dans ce travail, voie impliquée dans la production d'interleukine-4 par les lymphocytes Th2.

PARTIE I : LES PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION DANS LES LYMPHOCYTES T APRES RECONNAISSANCE DE L'ANTIGENE

La stimulation des lymphocytes T nécessite deux signaux activateurs, agissant sur le récepteur T pour l'antigène (TCR) et sur des molécules de costimulation.

1. Signalisation en aval du récepteur T pour l'antigène

1.1. Les différents partenaires

La transmission du signal délivré par le TCR met en jeu des interactions protéine-protéine au sein de microdomaines membranaires (les *rafts*) riches en glycosphingolipides et en cholestérol, permettant la formation de complexes multimoléculaires. Les partenaires de la signalisation possèdent dans leur structure des régions qui vont permettre des liaisons spécifiques. Ainsi, les domaines SH2 (*Src Homology*) se lient à des tyrosines phosphorylées, les domaines SH3 à des régions riches en proline, les domaines PH (*Pleckstrin Homology*) reconnaissent des phosphoinositides, et les domaines PTB (*PhosphoTyrosine Binding*) des séquences NPXY (N=asparagine, P=proline et Y=tyrosine) où la tyrosine n'est pas nécessairement phosphorylée.

L'interaction des domaines extracellulaires du TCR avec ses ligands conduit à l'activation d'une cascade de protéines kinases. Les événements précoces de la signalisation mènent à l'activation de trois familles de tyrosines kinases et au recrutement de molécules adaptatrices ; les protéines tyrosines kinases (PTK) appartiennent aux familles des Src kinases (Lck, Fyn), des Syk kinases (ZAP-70), ou des Tec kinases (Tec, Itk). Les protéines adaptatrices, qu'elles soient membranaires telles que LAT, PAG/Cbp, TRIM, ... ou cytosoliques comme SLP-76, Cbl, Gads, ... permettent la constitution de complexes multimoléculaires et le couplage à des protéines effectrices : phospholipase C γ 1 (PLC γ 1), phosphatidyl inositol-3 kinase (PI-3kinase), protéine kinase C (PKC), *mitogen activated protein* (MAP) kinases.

Au niveau de la zone de contact entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène (CPA) se forme une zone de contact appelée synapse immunologique ou SMAC (*Supra Molecular Activation Cluster*), qui va regrouper les partenaires de la réponse et ordonner les interactions. Dans cette aire de contact, les différentes molécules de surface et les protéines intracellulaires s'organisent en deux régions concentriques. La région centrale regroupe le complexe TCR-CD3, le CD4 ainsi que des protéines de signalisation (Lck, Fyn, PKC θ), tandis que la région périphérique contient l'intégrine LFA1 et la taline (qui permet la connection avec les filaments d'actine) (Grakoui et al., 1999 ; Monks et al., 1997). La formation de la synapse immunologique nécessite un cytosquelette fonctionnel.

Nous allons dans un premier temps mettre en place les principales voies activées par le TCR (Figure 1). Le TCR est composé des chaînes polymorphes α et β (qui reconnaissent l'ensemble peptide-complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimé par la CPA) et des chaînes invariantes γ , δ , ϵ et ζ du CD3, associées de façon non covalente. La transduction du signal par le TCR est rendue possible par les domaines intracytoplasmiques des sous-unités du CD3, qui contiennent des résidus tyrosines organisés selon des motifs spécifiques (Y-X-X-I/L-X₆₋₈-Y-X-X-I/L) appelés ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). Les chaînes du CD3 contiennent chacune un motif ITAM à l'exception de la chaîne ζ qui en possède trois.

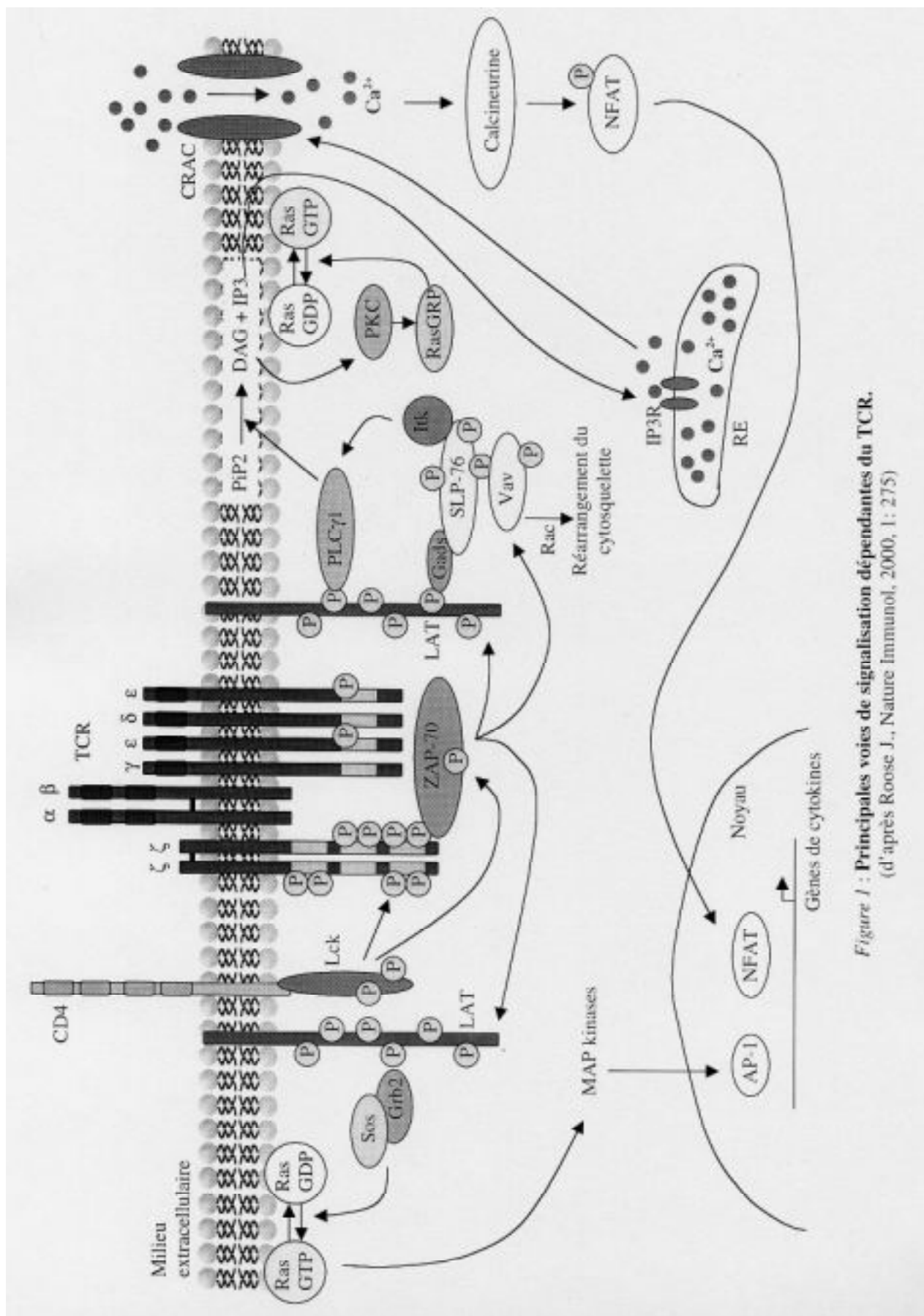


Figure 1 : Principales voies de signalisation dépendantes du TCR.
 (d'après Roose J., Nature Immunol, 2000, 1: 275)

1.2. Les événements précoces de la signalisation

1.2.1. Les tyrosines kinases de la famille Src

Les Src kinases Lck et Fyn jouent un rôle essentiel dans l'activation via le TCR. En effet, chez les souris déficientes pour Lck, les lymphocytes T présents (en faible nombre) en périphérie sont incapables de répondre à une stimulation antigénique (Molina et al., 1992). La lignée Jurkat déficiente pour Lck (JcaM1) ne répond pas à un engagement du complexe TCR-CD3 (Straus and Weiss, 1992). Les hybridomes transfectés avec une forme constitutivement active de Lck présentent une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine (après stimulation par un anticorps anti-TCR) et une augmentation de la production d'interleukine-2. Fyn joue un rôle moins important que Lck dans l'activation du TCR. En effet, les souris déficientes pour Fyn ne présentent qu'un défaut partiel de signalisation du TCR-CD3 dans les cellules T périphériques (Stein et al., 1992). Lck semble donc compenser (au moins partiellement) les fonctions de Fyn dans les cellules T périphériques, mais l'inverse n'est pas toujours vrai. Il faut néanmoins souligner que Fyn peut compenser les fonctions de Lck dans le cas d'une stimulation par un superantigène (Yamasaki et al., 1997).

Lck et Fyn sont myristoylées et donc ancrées à la membrane plasmique où elles interagissent, respectivement, avec le co-récepteur CD4 et les chaînes du CD3. Après activation, ces tyrosines kinases sont positionnées à proximité des ITAM, facilitant ainsi la phosphorylation de leurs résidus tyrosines. Au repos, la tyrosine 505 de Lck est phosphorylée, autorisant une fixation à son propre domaine SH2 et une conformation inactive. Après engagement du TCR, la phosphatase CD45 déphosphoryle Y505, permettant un dépliement de la protéine qui s'autophosphoryle (Y394) et devient active. La phosphorylation de la tyrosine 505 est contrôlée par des actions opposées entre la tyrosine phosphatase CD45, qui active Lck, et la tyrosine kinase Csk (*C-terminal Src Kinase*), qui inhibe Lck. En effet, le niveau de phosphorylation de la tyrosine 505 de Lck est augmenté dans les lymphocytes T issus des souris déficientes pour CD45 (Ostergaard et al., 1989). Csk est une tyrosine kinase qui présente une structure similaire aux PTK de la famille Src, sans les sites de myristoylation et sans phosphorylation sur tyrosine, ce qui la rend constitutivement active. Csk phosphoryle la tyrosine 505 de Lck et ainsi l'inactive. Csk est recrutée à la membrane via l'interaction de son domaine SH2 avec la protéine adaptatrice PAG/Cbp (Kawabuchi et al., 2000). La

surexpression de PAG/Cbp dans les cellules T Jurkat diminue l'activité des Src kinases et l'activation de NFAT induite par le TCR. De plus, dans les cellules T primaires, la phosphorylation de PAG/Cbp est diminuée après stimulation par le TCR et son association avec Csk est réduite (Brdicka et al., 2000).

Ces données suggèrent que PAG/Cbp couple Csk à Lck/Fyn dans les microdomaines membranaires, permettant à Csk de maintenir les PTKs de la famille Src dans un état inactif dans une cellule au repos. Lors de l'engagement du TCR, PAG/Cbp est déphosphorylé par une phosphatase non identifiée à l'heure actuelle, ce qui conduit à la dissociation de Csk de la protéine adaptatrice et à sa perte d'activité vis-à-vis des Src kinases. Il a été également montré que le domaine SH3 de Csk fixe la tyrosine phosphatase cytoplasmique PEP (Cloutier and Veillette, 1996). Or cette phosphatase diminue la phosphorylation des sites de régulation positifs de Lck et de Fyn (Y394 et Y417, respectivement), ce qui résulte en une inactivation des deux PTKs de la famille Src (Cloutier and Veillette, 1999). L'inactivation de Csk dans les thymocytes mène à la maturation des cellules T CD4+ indépendamment du TCR $\alpha\beta$ et des molécules de classe II, confirmant le rôle de Csk dans la signalisation du TCR (Schmedt et al., 1998).

1.2.2. Phosphorylation des ITAM

La présence de dix ITAM associés au TCR souligne l'existence d'une amplification de la réponse, puisqu'une molécule de TCR peut recruter (au moins théoriquement) jusqu'à dix molécules ZAP-70. L'utilisation de récepteurs chimériques ayant la partie extracellulaire du récepteur de l'interleukine-2 ou de la molécule CD8 et la partie intracellulaire de la chaîne CD3 ϵ ou ζ suggère que les ITAM des différentes chaînes ne sont vraisemblablement pas strictement équivalents pour transduire le signal (Jensen et al., 1997 ; Letourneur and Klausner, 1992). Le rôle essentiel de la chaîne ζ dans la transduction du signal est un sujet de discussion. Le groupe de Malissen a montré que les événements d'activation et les fonctions effectrices n'étaient pas modifiés dans des cellules T CD8+ exprimant un TCR transgénique avec des chaînes ζ dépourvues d'ITAM (Ardouin et al., 1999) : les ITAM des autres chaînes semblent pallier l'absence des motifs de la chaîne ζ .

La phosphorylation des ITAM de la chaîne ζ semble un phénomène ordonné. Van Oers et al. proposent un modèle dans lequel la phosphorylation des ITAM serait progressive à partir de la région C-terminale (van Oers et al., 2000). Le groupe d'Allen a quant à lui montré, en utilisant des anticorps spécifiques de chaque phosphotyrosine des ITAM de la chaîne ζ , que l'engagement du TCR induit la phosphorylation séquentielle et ordonnée de ces tyrosine par les PTKs de la famille Src (Kersh et al., 1998). La phosphorylation complète des ITAM de la chaîne ζ est associée à la prolifération d'un clone T et à la production d'IL-2 dans un hybridome alors qu'une phosphorylation partielle inhibe ces réponses. De plus, ces auteurs ont montré que la phosphorylation complète de la chaîne ζ est dépendante de la force d'engagement du ligand (Kersh et al., 1998). Les formes intermédiaires de phosphorylation des ITAM pourraient recruter différentes protéines adaptatrices et effectrices et donc activer différentes voies de signalisation. Le travail d'Osman et al. va dans ce sens. Ils ont étudié la fixation de ZAP-70, des protéines adaptatrices Grb2 et Shc et de la sous-unité p85 de la PI-3kinase sur les dix ITAM. L'affinité de ces protéines est variable, que l'on considère les différents ITAM de la chaîne ζ ou ceux des autres chaînes (Osman et al., 1996).

1.2.3. Les tyrosines kinases de la famille Syk

Chez des patients présentant des immunodéficiences combinées sévères causées par l'absence de la protéine ZAP-70, les cellules T périphériques sont incapables de répondre aux stimuli qui activent le TCR, ce qui confirme le rôle essentiel de ZAP-70 dans la signalisation du TCR (Arpaia et al., 1994). En effet, on note chez les lymphocytes T de ces patients un défaut de phosphorylation sur tyrosine, du signal calcique et de la production d'IL-2. Le même phénotype est observé dans des lignées T déficientes pour ZAP-70 (Williams et al., 1998). De plus, ZAP-70 semble être un composant obligatoire dans l'activation de la PLC γ 1 puisque la production d'IP3 et la mobilisation de calcium, tous deux reflets de l'activation de la PLC γ 1, sont abolies dans les cellules T Jurkat déficientes pour ZAP-70.

A la différence des Src kinases, ZAP-70 ne possède pas de site de myristoylation et est cytosolique. Elle est caractérisée par deux domaines SH2 en tandem qui se fixent aux deux phosphotyrosines de chaque ITAM des chaînes du CD3. En effet, le nombre d'acides aminés entre les deux motifs Y-X-X-L des ITAM est critique pour la fixation de ZAP-70. Cette Syk kinase présente un site d'autophosphorylation qui peut réguler la fixation des domaines SH2

aux ITAM phosphorylés. La tyrosine 319 est un site de régulation positive qui permet, une fois autophosphorylée (Di Bartolo et al., 1999), le recrutement de Lck (Pelosi et al., 1999). Lck phosphoryle alors les tyrosines 492 et/ou 493 situées dans le domaine kinase, avec comme conséquence une augmentation de l'activité catalytique de ZAP-70 (Mege et al., 1996).

La tyrosine 292 de ZAP-70 est, quant à elle, un site de régulation négative. La mutation de cette tyrosine résulte dans une forme constitutivement active de ZAP-70. Cette régulation négative se produit via la fixation sur cette tyrosine de la molécule adaptatrice Cbl par son domaine PTB (Lupher et al., 1996 ; Lupher et al., 1997 ; Lupher et al., 1998 ; Rao et al., 2000). Cbl pourrait interagir avec la protéine adaptatrice SLAP (*Src-Like Adaptor Protein*), qui a la même structure que les PTKs de la famille Src, à l'exception du domaine PTK, absent. La fonction de SLAP n'est pas claire : un article la décrit comme un régulateur positif (Tang et al., 1999), mais il apparaît plutôt comme régulant négativement la signalisation liée au TCR (Sosinowski et al., 2000). En effet, la surexpression de SLAP dans les cellules T Jurkat inhibe la transcription dépendante de NFAT induite par le TCR. Une inhibition de AP-1 et de la transcription du gène de l'IL-2 est également observée. Or dans les cellules T stimulées, SLAP s'associe à de nombreuses protéines de la signalisation, suggérant que SLAP pourrait par ces liaisons réguler négativement les signaux médiés par le TCR. La capacité de SLAP à découpler le TCR de l'activation transcriptionnelle de NFAT pourrait être due à une diminution des flux calciques induits par le TCR (Sosinowski et al., 2000).

1.3. La voie de la phospholipase C gamma 1

La PLC γ 1 est l'isoforme majoritaire exprimée dans les lymphocytes T. Cette enzyme hydrolyse le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PI(4,5)P₂) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). La régulation de son activité enzymatique est corrélée à sa phosphorylation sur tyrosine.

L'activation de la PLC γ suite à l'engagement du TCR est complexe et la nature des interactions entre les différents partenaires n'est pas parfaitement connue. Il existe un défaut de phosphorylation de la PLC γ dans les cellules Jurkat déficientes pour ZAP-70 (Williams et al., 1998), pour LAT (Finco et al., 1998), pour SLP-76 (Yablonski et al., 1998), et dans les lymphocytes T provenant de souris déficientes pour Itk (Liu et al., 1998 ; Schaeffer et al., 1999). Le rôle principal de ZAP-70 est vraisemblablement de phosphoryler LAT et SLP-76 (Weber et al., 1998 ; Zhang et al., 1998b). SLP-76 est en aval de LAT car LAT est requis pour la phosphorylation sur tyrosine de SLP-76 (Finco et al., 1998 ; Zhang et al., 1999b), alors que la phosphorylation de LAT, protéine ciblée dans des microdomaines (Zhang et al., 1998c), est normale dans les cellules n'exprimant pas SLP-76 (Yablonski et al., 1998). Puisque LAT est initialement identifiée comme une protéine fixant le domaine SH2 de Grb2, il est possible que Grb2 puisse agir comme lien entre LAT et SLP-76 (Weber et al., 1998). En effet, Grb2 est capable de se fixer à LAT (lorsque cette dernière est phosphorylée sur tyrosine) et à la région riche en proline de SLP-76 par ses domaines SH2 et SH3 respectivement. Cependant, d'autres protéines adaptatrices comme Gads, GrpL ou Grf40, homologues à Grb2, interagissent avec SLP-76 avec une plus forte affinité que Grb2 (Asada et al., 1999 ; Law et al., 1999 ; Liu et al., 1999), laissant entendre que ces nouvelles protéines adaptatrices pourraient être le lien entre LAT et SLP-76.

Etant donné que le domaine cytoplasmique de LAT comporte une séquence consensus pour la fixation du domaine SH2 de la PLC γ (Songyang et al., 1993 ; Weber et al., 1998 ; Zhang et al., 1998b), il apparaît que la PLC γ puisse directement se lier à LAT. La PLC γ est recrutée à LAT même en l'absence de SLP-76, mais son activation requiert la présence de SLP-76 (Yablonski et al., 1998). La PLC γ interagit de façon constitutive avec le domaine riche en proline de SLP-76 et le complexe ainsi formé peut se lier à LAT phosphorylé après stimulation par le TCR (Yablonski et al., 2001).

SLP-76 semble intervenir dans l'activation de la PLC γ 1 en recrutant Itk, une tyrosine kinase de la famille Tec capable de phosphoryler la PLC γ 1 (Liu et al., 1998 ; Schaeffer et al., 1999). Après activation par le TCR, les PTKs de la famille Tec sont relocalisées à la membrane plasmique via leur domaine PH et leur liaison aux phosphoinositides membranaires. Un résidu tyrosine de leur domaine catalytique est alors phosphorylé par les PTKs de la famille Src (August et al., 1997), puis une autophosphorylation les rend pleinement actives. Les domaines SH2 et SH3 d'Itk pourraient se fixer coopérativement à SLP-76 (Bunnell et al., 2000), l'amenant en contact étroit avec sa cible, la PLC γ 1, qui interagit avec LAT. Itk activée peut alors phosphoryler la PLC γ 1 et ainsi permettre son activation et par la suite la mobilisation du calcium intracellulaire. Cette hypothèse est confortée par la mise en évidence d'une interaction entre le domaine SH2 d'Itk et la PLC γ 1 dans les lymphocytes T humains (Perez-Villar and Kanner, 1999).

1.4. La voie calcique

Le calcium est un second messager très important dans l'activation du lymphocyte T. En effet seulement 25 % de tous les gènes régulés au cours de la stimulation de la cellule T sont indépendants de la réponse calcique (Feske et al., 2001). L'IP3 généré par la PLC γ suite à l'engagement du TCR se fixe sur des récepteurs à l'IP3 présents à la membrane du réticulum endoplasmique (RE), entraînant la libération des réserves intracellulaire de calcium Ca^{2+} . Cette déplétion des stocks génère une élévation rapide et transitoire de la concentration en calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) avec un retour au niveau de base dans les 100 secondes environ. La mobilisation des réserves intracellulaires est suivie par une entrée de calcium à travers la membrane plasmique.

Ce signal calcique soutenu via l'afflux prolongé de calcium depuis le milieu extracellulaire passe par des canaux calciques activés par la déplétion des stocks, appelés SOCs (*Store-Operated Ca^{2+} channels*). Ces canaux sont définis comme des canaux CRAC (*Ca^{2+} Release-Activated Ca^{2+} channels*) dans les lymphocytes T (Lewis, 2001). De nombreuses études ont été réalisées afin d'identifier les gènes codant pour ces canaux et de comprendre comment la déplétion des réserves de calcium intracellulaire pouvait mener à l'activation de ces canaux. Sept homologues mammifères du gène Trp de la drosophile ont été proposés comme gènes candidats pour les canaux CRAC. Il est admis que l'IP3 induit l'ouverture des canaux CRAC par la déplétion des réserves intracellulaires sans effet direct de l'IP3 sur ces canaux. Par exemple, les canaux CRAC sont activés par la thapsigargine, un inhibiteur sélectif de la pompe Ca^{2+} /ATPase du RE, qui n'induit pas de production d'IP3.

Différentes hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'activation des canaux CRAC :

- La diffusion d'un messenger : la mobilisation des stocks pourrait libérer un messenger des organelles intracellulaires, lequel diffuserait jusqu'à la membrane pour activer les canaux CRAC. Ce messenger soluble pourrait être le CIF (*Calcium Influx Factor*) (Randriamampita and Tsien, 1993 ; Su et al., 2001), un facteur isolé dans les cellules Jurkat, de faible poids moléculaire et contenant un phosphate ;
- Un couplage conformationnel : le récepteur de l'IP3 serait physiquement lié aux canaux CRAC et ce couplage serait déclenché par la déplétion des stocks. Ce modèle a été mis en évidence dans les cellules musculaires entre le récepteur à la ryanodine et les canaux

calciques dépendant du voltage (Irvine, 1990 ; Koizumi et al., 1999). De plus, le canal humain TRP3, de la famille des SOCs, requiert pour son activation une interaction avec le récepteur de l'IP3 (Kiselyov et al., 1998 ; Ma et al., 2000). Le complexe entre TRP3 et le récepteur de l'IP3 a pu être mis en évidence par co-immunoprécipitation (Boulay et al., 1999).

Différents profils de signaux calciques sont observés : transitoires, soutenus ou oscillatoires, autant de signaux variables qui peuvent générer des réponses différentes dans la cellule. En utilisant l'ionomycine, un ionophore calcique, le groupe de Dolmetsch a montré que le pic de $[Ca^{2+}]_i$ active sélectivement les facteurs de transcription NFκB et JNK alors que le plateau active seulement NFAT (Dolmetsch et al., 1997). Cette sélectivité est due au fait que NFκB et JNK ont une sensibilité basse mais persistante au calcium alors que NFAT a une sensibilité plus haute mais rapidement réversible. Cette étude laisse penser que l'amplitude et la durée du signal calcique peuvent contrôler différents profils d'expression de gènes. Dans les cellules Jurkat, les facteurs de transcription impliqués dans l'expression de l'IL-2 sont activés de façon différentielle selon la fréquence des oscillations calciques imposées aux cellules : NFAT et Oct1/OAP requièrent des oscillations rapides alors que NFκB peut être activé même avec des oscillations espacées de 30 minutes (Dolmetsch et al., 1998). Ces travaux constituent une des premières étapes démontrant que les signaux calciques dans les lymphocytes peuvent transmettre des informations spécifiques suivant leur durée, leur amplitude et leur cinétique.

Des auteurs ont comparé des lymphocytes T normaux à des lymphocytes présentant un défaut d'entrée de calcium. Ils ont montré que le signal calcique agit à la fois sur l'induction et sur la répression de gènes et ceci d'une façon très largement dépendante de la calcineurine. De plus, certains gènes ne sont induits que par la mobilisation des réserves intracellulaires de calcium, alors que d'autres dépendent également d'une entrée de calcium dans la cellule (Feske et al., 2001). L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induit l'activation de la calmoduline. Le calcium se fixe à la calmoduline, qui devient capable d'activer la calcineurine. Cette dernière est une phosphatase : elle déphosphoryle les sous-unités cytoplasmiques du facteur de transcription NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*). NFAT déphosphorylé entre alors dans le noyau et se fixe à l'ADN, en présence d'autres facteurs de transcription (Flanagan et al., 1991). Les facteurs de transcription NFAT interviennent dans la transcription des gènes codant pour des cytokines. La calcineurine déphosphoryle des résidus sérine de NFAT ;

lorsque ces résidus sont phosphorylés, ils masquent les séquences de localisation nucléaire nécessaires à l'import nucléaire (Zhu et al., 1998). Une fois déphosphorylé par la calcineurine, NFAT va dans le noyau où il est maintenu par une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$, et par l'activité continue de la calcineurine (Timmerman et al., 1996). L'activation persistante de la calcineurine est requise car les protéines NFAT sont rapidement exportées du noyau. En effet, GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase-3*) et CK1 (*Casein Kinase*), constitutivement actives dans les cellules T au repos, phosphorylent les résidus serine de NFAT (les mêmes cibles que la calcineurine) et contrôlent donc l'export nucléaire de ce facteur de transcription (Beals et al., 1997).

1.5. Les protéines kinases C

La famille des PKC comprend au moins douze isozymes, similaires par leur domaine catalytique de sérine et thréonine kinase (Newton, 1995a ; Newton, 1995b). Leur structure se caractérise par une région régulatrice N-terminale et une région catalytique C-terminale. Selon les homologies de leur domaine de régulation, qui déterminent leurs activateurs respectifs, trois sous-familles de PKC ont été identifiées : les PKC classiques (α , β I, β II et γ) sont contrôlées par le calcium et le diacylglycérol (DAG) en présence de phosphatidylsérine ; les PKC nouvelles (δ , ϵ , η et θ) sont régulées par la phosphatidylsérine et le DAG mais sont insensibles au calcium ; enfin les PKC atypiques (λ / ι , ζ , μ) ne sont activées ni par le DAG ni par le calcium et leur régulation est plus complexe (Mackay and Mochly-Rosen, 2001).

La région régulatrice est composée des domaines C1 et C2. Le domaine C1, dupliqué dans quelques isoenzymes, contient des motifs riches en cystéine qui forment le site de fixation pour le DAG (Bell and Burns, 1991). Il est précédé d'un domaine autoinhibiteur appelé pseudosubstrat (House and Kemp, 1987). Le domaine C2 contient les sites de reconnaissance des phospholipides anioniques, dont les phosphatidylsérines, et, pour les PKC conventionnelles (ou classiques), les sites de fixation du calcium (Newton, 1995b). La région catalytique est formée des domaines C3 et C4 qui contiennent les sites de fixation de l'ATP et des substrats (Taylor and Radzio-Andzelm, 1994). Les régions catalytiques et régulatrices sont séparées par une région charnière qui devient protéolytiquement labile quand l'enzyme est fixée à la membrane (Newton, 1993) ; le domaine kinase généré par protéolyse est constitutivement actif.

Les PKCs phosphorylent les résidus serines ou thréonines de leurs substrats. Elles s'autophosphorylent aussi par un mécanisme intramoléculaire en N-terminal, dans la région charnière et en C-terminal. En plus des réactions de phosphorylation, la PKC a une activité ATPase et phosphatase (O'Brian and Ward, 1991). La fonction des PKC est régulée par deux mécanismes importants : par des phosphorylations qui régulent le site actif et la localisation subcellulaire de l'enzyme, et par les seconds messagers qui permettent une association de la PKC à la membrane (Newton, 1995b). Les PKC nouvellement synthétisées sont localisées dans le cytosol. Leur maturation nécessite trois phosphorylations distinctes : une transphosphorylation sur la boucle d'activation pour rendre l'enzyme catalytiquement

compétente, induite par la PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependent Kinase*), une autophosphorylation en C-terminal qui stabilise la conformation catalytiquement compétente, et une seconde autophosphorylation en C-terminal qui autorise une localisation membranaire de la PKC. Cette forme mature phosphorylée est inactive car le pseudosubstrat occupe le site catalytique. La génération du DAG déclenche la translocation de la PKC à la membrane : le DAG se fixe sur le domaine C1 et la phosphatidylsérine se lie au domaine C2. L'affinité des PKC conventionnelles pour ces lipides est augmentée par le calcium. La PKC peut se fixer à la membrane avec une basse affinité par les domaines C1 ou C2. Cependant, la fixation par les deux domaines est de haute affinité et entraîne la libération du pseudosubstrat, conduisant à une activation maximale.

Les PKC inactives sont trouvées dans le cytosol alors que les formes actives sont associées aux membranes plasmique et nucléaire, aux éléments du cytoquelette et aux autres composants subcellulaires de la cellule. Cette localisation des PKC est extrêmement régulée et chaque stimulus donne un profil unique de translocation des PKC, qui peut être différent selon les types cellulaires. La localisation de chaque isoenzyme dans des compartiments définis suppose l'existence d'interactions spécifiques avec des protéines d'ancrage, appelées RACKs et RICKs (*Receptor for Activated/Inactivated C-Kinase*) (Mochly-Rosen and Gordon, 1998 ; Mochly-Rosen and Kauvar, 2000). Ces protéines fixent les PKC en fonction de leur état actif (RACKs) ou inactif (RICKs). Chaque isoenzyme peut interagir avec plusieurs protéines d'ancrage différentes. A l'état inactif, le site de fixation pour les RICKs est exposé. En présence d'activateurs de PKC, un changement conformationnel déplace l'interaction intramoléculaire entre le pseudosubstrat et le site catalytique et expose ainsi la séquence de fixation aux RACKs (qui était masquée à l'état inactif). Les sites de fixation pour les RICKs et les RACKs se trouvent principalement dans les domaines régulateurs des PKC, bien que des sites additionnels à l'intérieur des domaines catalytiques soient probablement présents.

1.6. Les GTPases

Dans les lymphocytes T, les GTPases Ras et Rac sont rapidement activées après engagement du TCR. L'état d'activation de ces GTPases est contrôlé par deux classes de protéines régulatrices : les GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) qui permettent l'échange du GDP pour du GTP, et les GAPs (*GTPase Activating Protein*) qui stimulent l'activité intrinsèque des GTPases et déclenchent l'hydrolyse du GTP en GDP.

Un des GEF qui permet l'activation de la GTPase Ras se nomme Sos ; il s'agit de l'homologue mammifère de la protéine *Son of Sevenless* de la drosophile, qui est associée constitutivement aux domaines SH3 de la protéine Grb2. Suite à l'engagement du TCR, les domaines SH2 de Grb2 interagissent avec les résidus tyrosines phosphorylés de la queue cytoplasmique de LAT, permettant ainsi la localisation membranaire (à proximité de Ras) et l'activité catalytique de Sos. L'activation de Ras requiert également SLP-76 bien que le schéma d'activation ne soit pas clair. La protéine adaptatrice Shc, suite à l'engagement du TCR, est recrutée par les ITAMs phosphorylés de la chaîne ζ du CD3 (Ravichandran et al., 1993), autorisant ainsi le recrutement du complexe Grb2-Sos à la membrane (Ravichandran et al., 1995).

Bien que Sos ait été décrit comme un GEF de Rac (Han et al., 1998), Vav est considéré comme le GEF électif de Rac (Cantrell, 1998). Toutefois, Vav peut aussi activer RhoA et Cdc42 (Abe et al., 2000 ; Han et al., 1997). Après stimulation du TCR, ZAP-70 active Vav1 en le phosphorylant. La costimulation du lymphocyte T via son co-récepteur CD28 est nécessaire à une phosphorylation et une activation soutenue de Vav1. Vav1 et SLP-76 forment alors un complexe qui régule la localisation cellulaire de Vav1 et permet son interaction avec Rac (Tuosto et al., 1996 ; Wu et al., 1996). La localisation membranaire de Vav est également induite par l'interaction entre son domaine PH et les polyphosphoinositides issus de l'activité de la PI-3kinase.

Rac induit des changements de l'actine sous-membranaire et favorise ainsi la réorganisation de la membrane nécessaire à la formation de la synapse immunologique (Acuto and Cantrell, 2000). La fonction des GTPases de la famille Ras et Rac dans les lymphocytes T est de réguler l'expression des gènes des cytokines. L'activation de NFAT requiert

l'interaction coordonnée de la voie calcique et des voies initiées par Ras. La voie calcique aboutit à la translocation de NFAT vers le noyau, et les voies dépendantes de Ras permettent l'activation d'AP-1, qui se fixe à NFAT dans le noyau pour former un complexe transcriptionnel actif. L'activation de la voie Raf1/MEK/ERK2 est un des effecteurs de Ras.

1.7. La voie MAP kinase

Les MAP kinases sont une famille de sérine/thréonine kinases comprenant trois protéines, ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) et p38. ERK est associée à la prolifération en réponse aux facteurs de croissance, alors que JNK et p38 sont induits suite à des stress et aux cytokines et peuvent médier la différenciation ainsi que la mort cellulaire. De plus, ces trois MAP kinases exercent des effets différents sur la sélection thymique : d'un côté ERK régule la sélection positive (Pages et al., 1999), d'un autre côté JNK et p38 interviennent dans la sélection négative (Dong et al., 1998 ; Sabapathy et al., 1999 ; Sugawara et al., 1998).

Deux isoformes ERK1 et ERK2 sont activées après engagement du TCR (Su and Karin, 1996). L'activation de ERK1/2 par le TCR est soumise aux PTKs. L'activation de la voie ERK est dépendante du domaine SH3 de Lck : la reconstitution d'une lignée de cellules T Jurkat déficientes pour Lck avec un mutant de Lck inactif pour le domaine SH3 n'induit pas la phosphorylation de ERK ni d'un activateur en amont (MEK) suite à l'engagement du TCR, alors que la mobilisation de calcium intracellulaire et la production d'IP3 sont normales. De la même façon, la surexpression de CD69, un événement dépendant de ERK, n'est pas observée dans cette lignée (Denny et al., 1999).

L'activation de ERK1/2 est la conséquence d'une cascade de kinases impliquant une MAP kinase kinase (MAPKK), nommée MEK1/2, qui phosphoryle et stimule directement ERK1/2 (Zheng and Guan, 1993). MEK1/2 sont, elles-mêmes, sujettes à phosphorylation via des MAPKK kinases (MAPKKK). Raf1 est une de ces MAPKKK (Kyriakis et al., 1992) et est recrutée par Ras. En effet, le domaine régulateur de Raf interagit avec Ras sous sa forme active. De plus, une forme constitutivement active de Raf mime les effets de Ras active et stimule ERK2 (Izquierdo et al., 1994). La voie d'activation de ERK est donc Ras/Raf/MEK/ERK (Rincon et al., 2000).

ERK1/2 phosphorylées sont transloquées dans le noyau où elles vont moduler l'activité de facteurs de transcription et en particulier les protéines FOS, qui sont les composants du complexe AP-1 (important pour l'activité de NFAT, comme nous l'avons vu précédemment). Un des substrats de la MAP kinase ERK2 est le facteur de transcription Elk1. Elk1 forme un complexe ternaire avec les SRF (*Serum Response Factor*) qui sont impliqués dans la régulation du gène Fos (Marais et al., 1993).

Trois gènes Jnk sont identifiés : Jnk1, Jnk2 et Jnk3 (Ip and Davis, 1998). Les protéines JNK1 et JNK2 sont exprimées dans de nombreux tissus alors que JNK3 est exprimée sélectivement dans le cerveau, les testicules et le cœur. Les protéines JNK, tout comme ERK, sont activées par phosphorylation sur résidus thréonine et tyrosine. Contrairement à l'activation de ERK1/2, réalisée par l'engagement du TCR, l'activation de JNK requiert deux signaux. La phosphorylation de JNK n'est observée que si à la fois le TCR et le co-récepteur CD28 sont stimulés (Su et al., 1994). Les protéines JNK sont phosphorylées par des MAPKK différentes de celles activant ERK1/2 : SEK1 (Sanchez et al., 1994), MKK4 (Derijard et al., 1995), JNKK1 (Lin et al., 1995). Comme pour les MAPKK, JNKK1 est phosphorylée et activée par une MAPKK kinase, MEKK1. L'activation de la cascade JNK, comme pour la cascade ERK, est initiée par la protéine Ras. Cependant, Ras activée n'est pas suffisante pour une pleine activation de JNK. D'autres membres de la superfamille Ras, Rac et Cdc42, sont plus efficaces pour activer JNK et peuvent agir en synergie avec Ras (Coso et al., 1995 ; Hill et al., 1995 ; Minden et al., 1995). Plusieurs substrats de JNK ont été identifiés : c-Jun, JunD, Elk1, ATFa, ATF2 et Sap-1 sont activés par phosphorylation sur leur domaine de transactivation (Ip and Davis, 1998). De plus, il a été montré que JNK1 phosphoryle le facteur de transcription NFATc et induit donc son export nucléaire (Nel and Slaughter, 2002).

Quatre membres de p38 ont été identifiés : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . MKK4 est capable d'activer p38 et JNK. Cependant d'autres MAPKK, MKK3 et MKK6, activent p38 sans activer JNK. De plus, MEKK1, qui phosphoryle JNKK1 laquelle active JNK, ne peut pas induire l'activité de p38. Bien que le facteur de transcription ATF2 soit le premier substrat identifié pour p38, plusieurs autres facteurs de transcription (Elk1, CHOP, MEF2C, SAP1) et des protéines kinases ont également été caractérisés comme substrats de p38 (Rincon et al., 2000).

La protéine adaptatrice Cbl, outre sa régulation négative sur les PTKs de la famille Syk, peut aussi induire un découplage Ras-MAP kinase. En effet, Cbl fixée à une autre protéine adaptatrice CrkL forme un complexe capable d'interagir avec C3G (Reedquist et al., 1996). C3G est un GEF qui active la fixation du GTP sur la GTPase Rap1 (Ichiba et al., 1997). L'activation de Rap1, à son tour, aboutit à la diminution de l'activité de Ras par compétition avec Raf (Boussiotis et al., 1997).

Il existe des différences dans le seuil d'activation de ces trois familles de MAP kinases. En utilisant différentes concentrations d'un plasmide de Ras, des auteurs ont montré que ERK avait un seuil d'activation intrinsèque plus bas que JNK et p38 (Gong et al., 2001).

1.8. La voie de la PI-3 kinase

L'engagement du TCR stimule l'activité de la phosphatidyl inositol 3-kinase (PI-3kinase) qui phosphoryle l'inositol en position 3. La PI-3kinase peut agir sur le PI, le PI4-P et le PI(4,5)-P₂, menant à la génération de PI3-P, PI(3,4)-P₂ et de PI(3,4,5)-P₃. Il existe plusieurs isoformes de PI-3kinase, dont les plus classiques appartiennent au groupe I_A et comprennent une sous-unité régulatrice p85 et une sous-unité catalytique p110. Les lymphocytes T déficients pour p85 α apparaissent normaux, suggérant que la régulation de la PI-3kinase dans les cellules T n'est pas médiée par p85 α mais par d'autres isoformes de p85. Les cellules T expriment p110 α et p110 δ (Ward et al., 1996). Les modèles d'activation de la PI-3kinase impliquent la fixation de p85 à des protéines adaptatrices, ce qui permet le recrutement de l'enzyme à la membrane plasmique et active la PI-3kinase en démasquant la sous-unité catalytique. Les protéines adaptatrices candidates pour recruter la PI-3kinase à la membrane dans les cellules T activées sont TRIM (Bruyns et al., 1998) et LAT (Zhang et al., 1998b).

Les produits de la PI-3kinase, PI(3,4,5)-P₃ et PI(3,4)-P₂, se lient aux domaines PH de certaines protéines et entraînent leur activation et leur localisation à la membrane plasmique (Rameh et al., 1997). Les tyrosines kinases de la famille Tec (Scharenberg and Kinet, 1998) et les sérine/thréonine kinases comme Akt/PKB (Reif et al., 1997) sont ainsi régulées par la PI-3kinase. La fonction des tyrosines kinases de la famille Tec (Tec, Itk) est de réguler l'activité de la PLC γ (cf. supra).

La PKB stimule l'activité de E2F, un facteur de transcription qui contrôle le cycle cellulaire, mais aussi phosphoryle et inactive GSK3, l'enzyme qui participe au contrôle de l'export nucléaire de NFAT (Alessi and Cohen, 1998 ; Bellacosa et al., 1998). Une troisième classe de protéines à domaines PH est régulée par les produits de la cascade PI-3kinase : ce sont les GEFs de la famille des Rho GTPases telles que Rac, Rho et Cdc42 qui interviennent dans la réorganisation de l'actine et le cycle cellulaire (revue par (Acuto and Cantrell, 2000)).

2. Activation du lymphocyte T : les molécules de costimulation

L'activation optimale des lymphocytes T requiert, en plus des voies de signalisation du TCR, un second signal indépendant de l'antigène : ce deuxième signal est appelé costimulation. CD28 est la première molécule de costimulation décrite dans les cellules T. Aujourd'hui, d'autres membres de la famille CD28 ont été identifiés et leur rôle dans l'activation T a été étudié (Chambers, 2001). Ces molécules possèdent plusieurs similarités structurales et fonctionnelles. Les molécules de costimulation et leurs ligands sont des glycoprotéines transmembranaires de la superfamille des immunoglobulines. Les membres de la famille CD28 ont un domaine cytoplasmique contenant des régions capables de fixer des domaines SH2 et SH3. Par contre, les membres de la famille B7, qui sont les ligands de la famille CD28, possèdent une région cytoplasmique courte et leur capacité à transduire des signaux n'est pas connue.

L'expression de CD28 est constitutive alors que celle des autres membres de la famille est inductible après activation. Les molécules de costimulation peuvent être divisées en deux groupes suivant leurs effets positifs ou négatifs sur l'activation lymphocytaire : CD28, LFA-1 et ICOS induisent une activation après liaison avec leur ligand, alors que les molécules CTLA4 et PD-1 génèrent des signaux inhibiteurs. Nous ne décrivons ici que les voies de signalisation mises en jeu par les molécules du premier groupe.

CD28 génère des signaux distincts de la voie calcium/calcineurine induite par le TCR. Les clones de cellules T ne prolifèrent pas en l'absence de signaux de costimulation et deviennent réfractaires à une autre activation (Jenkins et al., 1987). Cet état de non-réponse est appelé anergie et est la conséquence d'une absence de production d'IL-2 (DeSilva et al., 1991). En effet, la costimulation par CD28 non seulement augmente la transcription et la stabilité de l'ARNm de l'IL-2 (Fraser et al., 1991) mais également accroît l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L (Boise et al., 1995 ; Dahl et al., 2000). Les souris déficientes pour CD28 ont permis de mettre en évidence le rôle central de CD28 dans la production d'IL-2 et dans la survie cellulaire *in vivo* (Shahinian et al., 1993). L'engagement de CD28 est donc essentiel pour une prolifération soutenue des cellules T. De plus, la costimulation par CD28 diminue le seuil d'activation des cellules T (Viola and Lanzavecchia, 1996).

Cependant, la costimulation par CD28 n'est pas toujours requise : en effet, lors de la stimulation par de fortes concentrations de peptides agonistes, la costimulation par CD28

n'est plus nécessaire (Gudmundsdottir et al., 1999 ; Kundig et al., 1996). Alors, la costimulation par CD28 augmente-t-elle les signaux initiés par l'engagement du TCR ou active-t-elle des voies de signalisation différentes mais complémentaires de celles activées par le TCR ? (Hutchcroft and Bierer, 1996). L'étude de la région promotrice du gène de l'IL-2 a permis de mettre en évidence un élément de réponse à CD28, CD28RE, qui est activé après engagement concomittant du TCR et de CD28 (Butscher et al., 1998 ; Civil et al., 1992 ; Fraser et al., 1991 ; McGuire and Iacobelli, 1997 ; Shapiro et al., 1997). De plus, les signaux médiés par CD28 convergent avec les voies du TCR tant au niveau des événements précoces de la signalisation (phosphorylation sur tyrosines) (Tuosto and Acuto, 1998) qu'au niveau de JNK en ce qui concerne l'induction de différents facteurs de transcription (Su et al., 1994). Néanmoins, l'engagement de CD28, par ses ligands naturels (les molécules B7-1 et B7-2 exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes) ou par des anticorps monoclonaux, induit la phosphorylation sur tyrosine du motif YMNM du domaine cytoplasmique de CD28 et permet le recrutement de différentes molécules, telles que Grb2 (Schneider et al., 1995), Itk (August et al., 1997), Tec (Yang and Olive, 1999), et la PI-3kinase (Pages et al., 1994 ; Prasad et al., 1994 ; Stein et al., 1994 ; Truitt et al., 1994) ; ces protéines recrutées par CD28 vont amplifier le signal induit par le TCR.

Les réponses cellulaires induites par la costimulation de CD28 sont semblables à celles initiées par la PI-3kinase au cours de l'activation T ; il est donc concevable que la PI-3kinase soit une des molécules-clefs de la signalisation via CD28. Le rôle de la PI-3kinase dans l'activation T est cependant controversé. Cela s'explique, en partie, par les résultats contradictoires de la littérature concernant les effets des inhibiteurs de la PI-3kinase, la wortmannine et le LY294002 (Crooks et al., 1995 ; Fruman et al., 1999 ; Harada et al., 2001 ; Ward et al., 1995). Les signaux de prolifération et de survie font intervenir différents motifs portés par le domaine intracytoplasmique de CD28 : en effet, la mutation de la tyrosine qui permet le recrutement de la PI-3kinase inhibe l'expression de la protéine de survie Bcl-x_L, alors que la prolifération reste normale (Okkenhaug et al., 2001). A l'inverse, la mutation de résidus prolines dans la partie C-terminale inhibe la prolifération et la production de cytokines induites par CD28 sans empêcher l'induction de Bcl-x_L (Burr et al., 2001). D'autre part, Akt/PKB, une sérine/thréonine kinase activée par la PI-3kinase, transmet le signal de costimulation nécessaire à l'activation de l'élément CD28RE/AP en synergie avec la PKC θ (dont l'activation résulte des voies en aval du TCR) (Kane et al., 2001).

En se basant sur l'homologie d'ICOS (*Inducible Costimulator*) avec CD28, sa fonction de molécule de costimulation a été proposée. Par la suite, il a été montré que l'engagement d'ICOS active la prolifération des cellules T et influence leurs fonctions effectrices. A la différence de CD28, la costimulation via ICOS n'induit pas ou peu la production d'IL-2. De plus, la prolifération de cellules T transgéniques pour un TCR en présence des CPA et de leur antigène spécifique n'est pas inhibée par la protéine de fusion ICOS-Ig (Coyle et al., 2000 ; McAdam et al., 2000). Par contre, la costimulation par ICOS augmente la sécrétion d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10, d'IFN γ et de TNF α (Hutloff et al., 1999 ; Yoshinaga et al., 1999). ICOS semble donc posséder une fonction de costimulation différente de CD28, en agissant plutôt sur les fonctions effectrices des cellules T.

LFA-1 est une molécule d'adhésion de la famille des intégrines. Elle est exprimée par les cellules T et B, les granulocytes et les macrophages (Springer et al., 1987). Les ligands naturels de LFA-1 sont ICAM-1, 2 et 3, lesquels sont exprimés sur les leucocytes (Springer, 1990). LFA-1 a été impliquée dans la recirculation des lymphocytes, l'inflammation (Schmits et al., 1996 ; Sligh et al., 1993 ; Springer, 1994), et dans l'activation T. LFA-1 améliore le contact entre les cellules T et les CPA et facilite les interactions entre les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules cibles (Davignon et al., 1981). L'activation de la cellule T s'accompagne d'une augmentation de l'affinité de LFA1 pour son ligand (Dustin and Springer, 1989), favorisant l'interaction du TCR avec la CPA et la formation de la synapse immunologique (Dustin and Cooper, 2000). Dustin et al. soulignent que l'interaction entre LFA1 et ICAM1 prépare le lymphocyte T à répondre à son antigène (Dustin and Cooper, 2000). Par ailleurs, en facilitant l'adhésion des cellules T aux CPA, LFA-1 abaisse le taux d'antigène nécessaire à l'activation de la cellule T (Bachmann et al., 1997).

PARTIE II : LES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES TH1 ET TH2

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle central dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire. Cette population de cellules T auxiliaires (*T helper*, Th) est hétérogène en terme de production de cytokines et de fonctions (O'Garra, 1998). D'abord identifiées par des études *in vitro* de clones de cellules T murines, l'existence de ces sous-populations a par la suite été démontrée *in vivo* chez la souris (Mosmann and Coffman, 1989b), le rat (Fowell et al., 1991 ; McKnight et al., 1991), et l'homme (Del Prete et al., 1991). Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs ont ainsi été classés en trois sous-populations selon leur profil d'expression de cytokines : Th1, Th2 et Th0. Les cellules Th1 produisent de l'interféron gamma (IFN γ) et de l'interleukine (IL)-2, tandis que les lymphocytes Th2 sécrètent les interleukines 4, 5, 6 et 13 (Abbas et al., 1996 ; Mosmann and Sad, 1996 ; O'Garra, 1998). Les cellules Th0 expriment les cytokines des deux sous-populations précédentes.

Les fonctions des lymphocytes Th1 et Th2 sont corrélées à leur profil cytokinique : ainsi les cellules Th1 dirigent les réponses immunes à médiation cellulaire, permettant l'éradication des pathogènes intracellulaires. Une dérégulation de cette sous-population lymphocytaire est associée à des maladies auto-immunes spécifiques d'organes comme la sclérose en plaques et le diabète de type 1 chez l'homme (Liblau et al., 1995). A l'inverse, les lymphocytes Th2 orientent les lymphocytes B vers la production d'immunoglobulines (Ig) E : ils participent à l'élimination des helminthes, mais sont également impliqués dans les manifestations allergiques telles que l'asthme allergique et la dermatite atopique (Abbas et al., 1996 ; Mosmann and Sad, 1996 ; O'Garra, 1998).

Différentes études ont montré que les lymphocytes Th1 et Th2 étaient issus de la même cellule T précurseur (Hsieh et al., 1992 ; Seder et al., 1992). Des expériences utilisant des cellules T stimulées avec des activateurs polyclonaux ou issues de souris transgéniques pour un TCR spécifique d'un peptide confirment cette hypothèse (Kamogawa et al., 1993 ; Röcken et al., 1992 ; Seder and Paul, 1994). La population Th0 pourrait représenter le précurseur des cellules Th1 et Th2. Cependant, le fait de savoir si cette cellule Th0 est réellement le précurseur des cellules Th1 et Th2 et/ou si elle peut représenter un état de différenciation terminale est toujours d'actualité.

1. Les lymphocytes Th1

Les cellules Th1, par leur production d'IFN γ et de lymphotoxine, sont responsables des réponses immunes à médiation cellulaire menant à l'éradication des pathogènes intracellulaires (Figure 2).

L'IFN γ a deux fonctions clefs : la première est d'activer les macrophages et donc d'augmenter leur activité anti-microbienne ; la seconde consiste à stimuler la production d'anticorps IgG se fixant aux récepteurs Fc γ de haute affinité et aux protéines du complément impliquées dans l'opsonisation et la phagocytose des bactéries. Les isotypes d'IgG dépendants de l'IFN γ sont les IgG2a et IgG3 chez la souris (Mosmann and Coffman, 1989a ; Mosmann and Coffman, 1989b), les IgG2b chez le rat, et probablement les IgG1 et IgG3 chez l'homme.

Les réponses immunes de type Th1 sont souvent associées à des phénomènes inflammatoires et à des destructions tissulaires, puisque la lymphotoxine et l'IFN γ recrutent et activent les leucocytes. La réaction inflammatoire typique de la réponse Th1 est la réaction d'hypersensibilité retardée. Les cellules Th1 peuvent être cytolytiques, et les cytokines produites, à savoir l'IL-2 et l'IFN γ , permettent la différenciation des lymphocytes T CD8+ en cellules cytotoxiques actives.

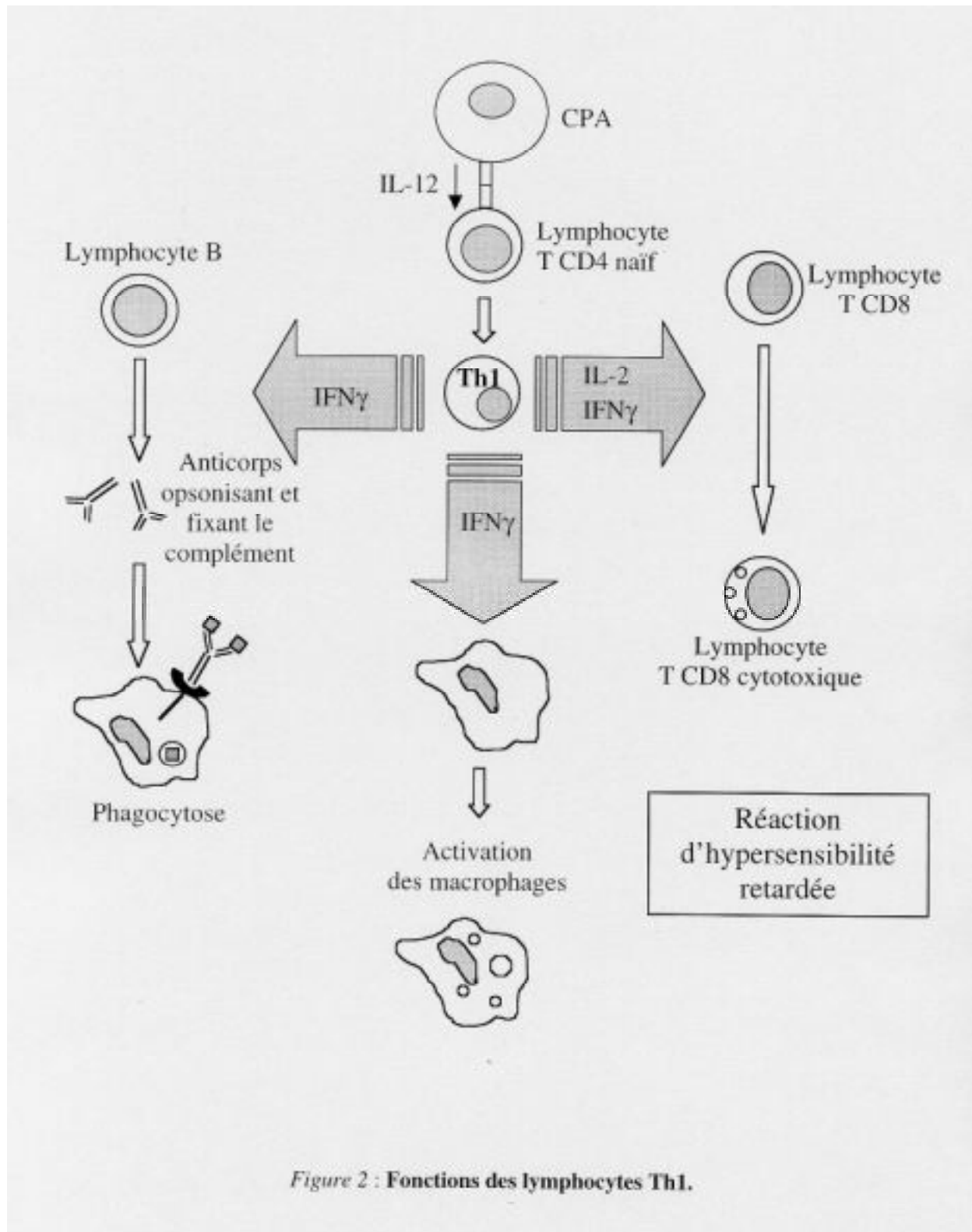


Figure 2 : Fonctions des lymphocytes Th1.

2. Les lymphocytes Th2

Les cellules T CD4⁺ de type Th2 sécrètent principalement de l'IL-4. Cette cytokine est le principal inducteur de la commutation isotypique des lymphocytes B pour la production d'IgE (Figure 3). Elle joue donc un rôle prépondérant dans l'initiation des réponses mastocytaires dépendantes des IgE (Galli, 1993). Les cellules Th2 induisent également de manière préférentielle la production de certains isotypes d'IgG (IgG1 chez la souris et le rat, IgG4 chez l'homme).

Les lymphocytes Th2 excrètent aussi de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10, et de l'IL-13. L'IL-5 est la principale cytokine qui active les éosinophiles (Wardlaw et al., 1995). La production simultanée d'IL-4 et d'IL-5 explique la présence de mastocytes et d'éosinophiles activés dans les réactions immunes à dominante Th2. Les souris déficientes pour l'IL-5 ou son récepteur présentent un défaut de réponse des éosinophiles contre les helminthes (Kopf et al., 1996 ; Yoshida et al., 1996). Le recrutement des éosinophiles aux sites des réactions immunitaires est influencé par des chémokines, notamment l'éotaxine dont le récepteur CCR3 est exprimé par les cellules Th2. Par conséquent, les lymphocytes Th2 sont impliqués dans l'atopie et l'inflammation allergique.

L'IL-6, produite également par les mastocytes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules neuronales et endothéliales, favorise la génération des lymphocytes Th2 et augmente leur production d'IL-4 (Karpus et al., 1997 ; Rincon et al., 1997). L'IL-13 présente des similitudes tant structurales que fonctionnelles avec l'IL-4, et l'inactivation de son gène entraîne un défaut de réponse Th2. L'IL-4, l'IL-13 et surtout l'IL-10 contrôlent négativement les réponses inflammatoires.

La différenciation en cellules Th1 ou Th2 dépend de multiples facteurs : la nature du pathogène, la voie d'administration et la dose d'antigène, le fond génétique de l'hôte, et les cytokines présentes dans le microenvironnement lors de l'initiation de la réponse immune.

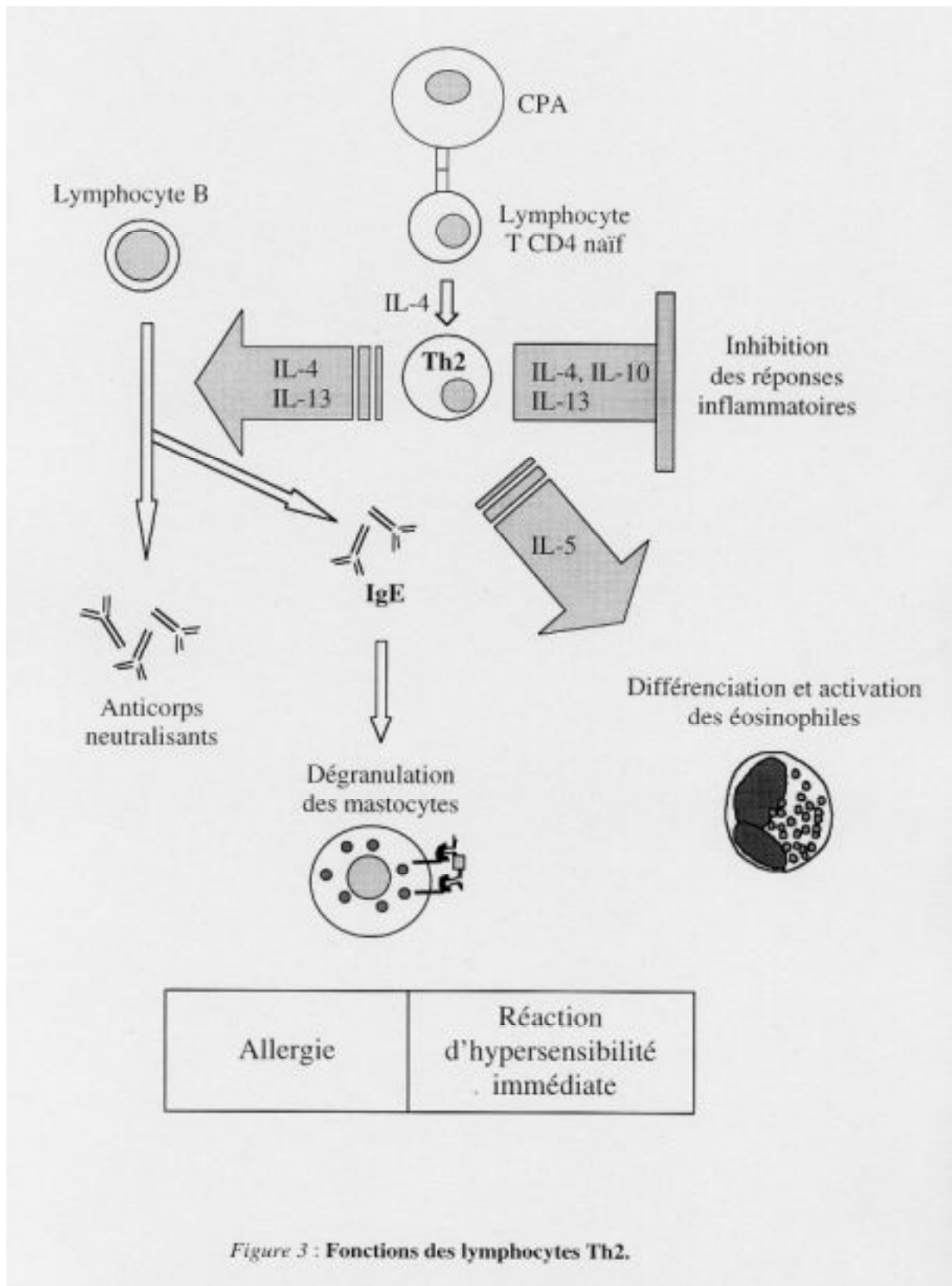


Figure 3 : Fonctions des lymphocytes Th2.

3. Polarisation de la réponse T CD4 et équilibre Th1/Th2

3.1. Rôle des cytokines dans la différenciation lymphocytaire

3.1.1. Polarisation Th1

L'IL-12 est la cytokine dominante dirigeant le développement des cellules Th1. Elle est produite par les macrophages et les cellules dendritiques après stimulation par des produits bactériens tels que le LPS et les composants des virus, les bactéries intracellulaires comme *Listeria monocytogenes* et *Mycobacteria species*, et les protozoaires comme *Toxoplasma sp.* Les souris portant une délétion du gène de l'IL-12 présentent une réponse Th1 diminuée (Magram et al., 1996). L'Eta1 (*Early T lymphocyte Activation 1*) ou ostéopontine, facteur sécrété par les lymphocytes, permet la différenciation Th1 en induisant la production d'IL-12 et en inhibant la sécrétion d'IL-10 par les CPA (Ashkar et al., 2000). Les souris déficientes en Eta1 présentent une incapacité à développer des réponses Th1 en réponse à l'infection par des virus ou par *Listeria monocytogenes*.

L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique de 75 kDa, composée de deux sous-unités p35 et p40 reliées par un pont disulfure. Les transcrits de la sous-unité p35 sont exprimés de façon constitutive par de nombreux types cellulaires. A l'inverse, la synthèse de la sous-unité p40 est inductible et restreinte aux cellules lymphoïdes. La stimulation du récepteur à l'IL-12 provoque la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD4+. L'expression du récepteur à l'IL-12 est restreinte aux cellules T CD4+ naïves récemment activées, aux cellules Th1 et aux cellules Natural Killer.

Le développement Th1 est aussi dépendant de l'IFN γ . Son action peut être directe sur les lymphocytes T activés ou indirecte par l'intermédiaire des CPA. L'IFN γ augmente la production d'IL-12 par les macrophages (Trinchieri, 1993 ; Trinchieri, 1995), et potentialise l'effet de l'IL-12 en favorisant notamment l'expression de la chaîne β 2 du récepteur à l'IL-12 par les lymphocytes T (Szabo et al., 1997).

L'IL-1 α agit comme cofacteur dans le développement Th1 induit par l'IL-12 chez les souris BALB/c mais pas chez les souris C57BL/6 (Shibuya et al., 1998). Cependant la réponse à l'IL-1 α est perdue dans les cellules Th1. L'IL-18, cytokine appartenant à la famille

de l'IL-1, promeut la production d'IFN γ par les clones Th1 et les cellules NK. L'IL-18, à la différence de l'IL-12, ne peut pas diriger le développement Th1, mais, comme l'IL-1 α , potentialise le développement Th1 induit par l'IL-12 chez les souris BALB/c (et pas chez les souris C57BL/6) (Robinson et al., 1997). L'action synergique de l'IL-12 et de l'IL-18 est bien démontrée. Les souris déficientes pour l'IL-18 (Takeda et al., 1998) présentent une production d'IFN γ réduite en réponse à *Propionibacterium acnes* ; les souris invalidées à la fois pour l'IL-12 et l'IL-18 ont, quant à elles, des défauts plus sévères dans la production d'IFN γ par rapport aux souches déficientes pour l'une ou l'autre de ces cytokines. Bien que l'IL-18 soit importante pour la production d'IFN γ *in vivo*, son mécanisme d'action au cours du développement des cellules Th1 n'est pas bien défini. L'IL-18 semble agir après l'induction de la polarisation Th1 par l'IL-12 en augmentant la production d'IFN γ par les cellules Th1 différenciées (Robinson et al., 1997).

3.1.2. Différenciation Th2

L'exposition des cellules T CD4⁺ naïves à l'IL-4 au moment de l'initiation de la réponse immune favorise le développement Th2. Les effets de l'IL-4 sur l'induction de la polarisation Th2 sont dominants sur ceux des cytokines entraînant la différenciation Th1 (Hsieh et al., 1993 ; Seder and Paul, 1994 ; Seder et al., 1992). La différenciation des cellules T naïves en cellules Th2 lors de la stimulation antigénique dépend essentiellement de la présence d'IL-4 dès les premières étapes de la différenciation (Swain et al., 1990). Si la concentration en IL-4 est suffisante, la polarisation vers le phénotype Th2 est progressive et s'accompagne d'une augmentation constante de la production d'IL-4 par ces mêmes cellules, l'IL-4 se comportant alors comme un facteur autocrine et paracrine. Les souris invalidées pour le gène de l'IL-4 présentent un défaut majeur de la différenciation Th2 en réponse à de nombreux stimuli (Kopf et al., 1993 ; Kuhn et al., 1991).

La source initiale d'IL-4 n'est pas clairement identifiée, et les cellules candidates sont nombreuses. Il pourrait s'agir de cellules non T comme les mastocytes ou les basophiles. En effet, ces cellules sécrètent de l'IL-4 après engagement du récepteur Fc pour les IgE et les IgG (Paul et al., 1993), mais les IgE qui les stimulent sont produites secondairement à une réponse Th2. Beaucoup de travaux ont suggéré un rôle important des cellules T NK1⁺ CD4⁺ ou CD4-

CD8- dans la différenciation des cellules Th2 du fait de leur capacité à produire de forts taux d'IL-4 rapidement après activation, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Bendelac et al., 1997; Yoshimoto and Paul, 1994). Ces cellules jouent également un rôle dans la production d'IgE en réponse à une activation polyclonale par un anticorps anti-IgD *in vivo* (Yoshimoto et al., 1995). Cependant, l'induction de la réponse Th2 vis-à-vis de divers parasites et antigènes protéiques n'est pas affectée chez des souris déficientes pour la β 2-microglobuline (ces souris présentent un nombre réduit de cellules NK1+) (Bendelac et al., 1994 ; Guéry et al., 1996 ; von der Weid et al., 1996). De plus, les souris déficientes pour CD1, qui n'ont pas de cellules T NK1+, présentent pourtant des réponses Th2 après immunisation avec un anticorps anti-IgD.

Des cellules T CD4+, naïves et mémoires spécifiques de l'antigène, pourraient initier la réponse Th2 (discuté dans (O'Garra, 1998)), comme cela a été montré dans le modèle de la leishmaniose expérimentale chez la souris BALB/c. Cette souris ne peut pas éradiquer l'infection du fait d'une réponse immune Th2. Dans la phase précoce, les lymphocytes spécifiques ont un TCR V α 8 et V β 4, reconnaissant le déterminant LACK de *Leishmania* ; ces lymphocytes produisent de grandes quantités d'IL-4 et d'IL-5. Le rôle de ces cellules dans l'initiation de la réponse est conforté par le modèle suivant : les souris exprimant le transgène de LACK deviennent tolérantes à cet auto-antigène et sont résistantes à l'infection par ce parasite du fait du développement d'une réponse Th1 (Julia et al., 1996). De plus, les souris BALB/c déplétées en lymphocytes V β 4 deviennent elles aussi résistantes : on observe une déviation immune vers un phénotype Th1 (Launois et al., 1997).

L'IL-13 présente des homologies avec l'IL-4. Elle utilise comme récepteur la chaîne α du récepteur de l'IL-4 et une chaîne qui lui est propre (Zurawski and de Vries, 1994). *In vitro*, les activités de l'IL-13 et de l'IL-4 se recoupent largement (McKenzie et al., 1993). L'invalidation du gène codant l'IL-13 conduit à un défaut dans la génération des réponses Th2 (McKenzie et al., 1998 ; Wills-Karp et al., 1998). L'incapacité de l'IL-13 à restaurer totalement la réponse Th2 dans les souris déficientes en IL-4 vient probablement de l'absence d'expression de son récepteur à la surface des cellules T naïves. L'IL-13 peut cependant prendre le relais de l'IL-4 dans la lutte anti-nématodes chez des souris déficientes en IL-4 (McKenzie et al., 1998). Les cellules Th2 générées à partir de splénocytes de souris déficientes pour l'IL-13 produisent moins de cytokines de type Th2 (McKenzie et al., 1998). De plus, il a été montré que l'IL-13 pouvait être un médiateur important dans l'asthme

allergique, puisqu'elle induit une hyper-réactivité bronchique, de manière indépendante des éosinophiles et des IgE (Wills-Karp et al., 1998).

L'IL-6 et le MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) ont été décrits comme capables d'agir sur la génération des cellules Th2 (Karpus et al., 1997 ; Rincon et al., 1997). L'IL-6 pourrait initier la production d'IL-4 par les cellules T CD4+, facteur indispensable à la différenciation en cellules Th2 (Rincon et al., 1997).

3.1.3. Effets régulateurs des cytokines de type Th1 et Th2

L'IFN γ produit par les cellules Th1 inhibe le développement de cellules Th2 (Fitch et al., 1993) ainsi que les réponses humorales, alors que l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la production d'IL-12 par les cellules dendritiques (Koch et al., 1996 ; Macatonia et al., 1995) et les macrophages (D'Andrea et al., 1993 ; Hsieh et al., 1993 ; Murphy et al., 1994).

L'absence de réponse des cellules Th2 à l'IL-12 s'explique par la régulation négative par l'IL-4 de l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur de l'IL-12 (Szabo et al., 1997). De plus, l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10 ont des actions anti-inflammatoires et suppriment la réponse des macrophages à l'IFN γ .

3.2. Autres facteurs influençant la différenciation Th1/Th2

3.2.1. Les cellules présentatrices d'antigènes

L'identification de sous-groupes de cellules dendritiques a révélé des fonctions uniques pour chacun d'entre eux dans le développement des cellules T. Chez la souris, les cellules dendritiques CD8 α ⁺ produisent de l'IL-12 et stimulent préférentiellement la différenciation Th1. Les cellules CD8 α ⁻ stimuleraient la différenciation Th2 (Maldonado-Lopez et al., 1999 ; Pulendran et al., 1999 ; Smith and de St Groth, 1999).

Chez l'homme, les cellules dendritiques peuvent être subdivisées en cellules myéloïdes (différenciées à partir de monocytes en présence de GM-CSF et d'IL-4) et en cellules plasmacytoïdes (dérivées de cellules sanguines stimulées par l'IL-3). Rissoan et al. montrent qu'elles favorisent la différenciation en cellules Th1 et Th2, respectivement (Rissoan et al., 1999). Cella et al. affirment, au contraire, que les cellules plasmacytoïdes sont capables de promouvoir une forte réponse Th1 (Cella et al., 2000). Pour le groupe de Lanzavecchia, seules les cellules dendritiques prises précocement après l'activation sécrètent des cytokines dont l'IL-12 et induisent donc des réponses Th1, alors que les mêmes cellules, prises à des temps plus tardifs, sont dans un état dit *exhausted* où elles ne sécrètent plus de cytokines et privilégient des réponses Th2 (Langenkamp et al., 2000). Cella et al. proposent donc que les cellules plasmacytoïdes, dans le travail de Rissoan, soient dans un état de stimulation avancée (*exhausted*).

3.2.2. L'antigène

La force de l'engagement du TCR peut directement influencer le développement T CD4⁺ : la nature de l'antigène (affinité pour le CMH, affinité du complexe antigène/CMH pour le TCR), le nombre de complexes antigène/CMH présents à un temps donné, la durée de l'engagement avec le TCR influent sur l'activation T. Des immunisations répétées ou des infections avec de fortes doses de parasites comme *Leishmania major*, *Trichuris muris* et *Schistosoma mansoni* favorisent la production de cytokines de type Th2 alors que des immunisations uniques ou des infections avec de faibles doses favorisent la sécrétion des cytokines de type Th1 (Bancroft et al., 1994 ; Bretscher et al., 1992 ; Caulada-Benedetti et al., 1991). Ces résultats suggèrent qu'une forte stimulation est requise pour induire des réponses

Th2. Cependant, on ne peut pas exclure dans ces modèles le rôle d'autres paramètres comme l'état d'épuisement (*exhaustion*) de la CPA.

Plusieurs études utilisant des APL (Ligands Peptidiques Altérés) ont plutôt montré que de fortes stimulations entraînent des réponses de type Th1 et que des stimulations moins intenses favorisent des réponses Th2 (Pfeiffer et al., 1995 ; Tao et al., 1997b). Les APL sont des peptides dont quelques acides aminés sont mutés par rapport au peptide sauvage, conduisant à un changement dans l'affinité vis à vis du TCR. De plus, de faibles doses d'antigène induisent la production d'IL-4 plutôt que celle d'IFN γ (Constant et al., 1995 ; Hosken et al., 1995 ; Tao et al., 1997a). Rogers et Croft proposent qu'à la fois l'engagement du TCR et la durée de la différenciation sont critiques pour la maturation en cellules Th1 ou Th2 (Rogers and Croft, 1999). Le groupe de Glaichenhaus a mis en évidence un lien possible entre la sélection du répertoire T et la sécrétion des cytokines (Malherbe et al., 2000), suggérant que les cellules Th1 ont une plus forte affinité pour l'antigène que les cellules Th2.

3.2.3. Facteurs génétiques

Il a été montré dans plusieurs modèles, à la fois chez la souris et chez le rat, que la différenciation Th1/Th2 était contrôlée génétiquement. L'exemple le plus frappant est le modèle expérimental de la Leishmaniose (Heinzel et al., 1989 ; Howard, 1986 ; Locksley and Scott, 1991 ; Scott et al., 1988). Dans ce modèle, la susceptibilité est associée au développement d'une réponse immune de type Th2 chez les souris BALB/c alors que la résistance corrèle avec une réponse de type Th1 chez les souris B10.D2 (Reiner and Locksley, 1995). Le fond génétique et le CMH différents expliquent ici cette divergence de la réponse immune. Le contrôle de la résistance à *Leishmania major* est complexe et multigénique. *In vitro*, l'utilisation de cellules T transgéniques pour un TCR $\alpha\beta$ DO 11.10 issues de souris de fond génétique BALB/c ou B10.D2 montre que la susceptibilité génétique ne réside pas dans une réponse différentielle des CPA au pathogène *L. major* mais dans une capacité intrinsèque des cellules T issues de fond BALB/c à développer de meilleures réponses de type Th2 (Hsieh et al., 1995). De plus, bien que les cellules T naïves des deux souches répondent à l'IL-12, les cellules T BALB/c perdent leur capacité de réagir à l'IL-12 après stimulation par l'antigène, *in vitro* (Güler et al., 1996). En effet, les cellules T BALB/c abandonnent rapidement l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12, la phosphorylation de STAT4 et donc la capacité de répondre à l'IL-12 (Guler et al., 1997).

Chez le rat, les souches Brown-Norway (BN) et Lewis (LEW) sont connues pour être les deux extrêmes dans la polarisation de leurs réponses immunes. Quel que soit le stimulus, les rats BN développent préférentiellement des réponses de type Th2 alors que les rats LEW mettent en place des réponses de type Th1. Le rapport CD4/CD8 est distinct entre les deux souches du fait d'un défaut quantitatif de cellules T CD8+ chez le rat BN, ce manque relatif étant dépendant de l'haplotype du CMH (Damoiseaux et al., 1999). De plus, les cellules CD4+ mais aussi les lymphocytes CD8+ sont à l'origine de la carence des rats BN à développer des réponses immunes de type Th1. En effet, ces deux populations de cellules T expriment préférentiellement des cytokines de type Th2, indépendamment ici de l'haplotype du CMH (Cautain et al., in revision).

Nous allons maintenant envisager les éléments de la signalisation qui expliquent les différences fonctionnelles entre les lymphocytes Th1 et Th2.

4. Différences entre les cellules Th1 et Th2

4.1. Les récepteurs membranaires

Des antigènes de surface uniques, ou préférentiellement exprimés par les cellules Th1 ou Th2 ont été identifiés. Les récepteurs membranaires plutôt présents sur les cellules Th1 sont la chaîne β du récepteur de l'IFN γ (Bach et al., 1995), la chaîne β du récepteur de l'IL-12 (Szabo et al., 1997), le récepteur de l'IL-18 (Xu et al., 1998), la *P-selectine glycoprotein ligand-1* (Borges et al., 1997), et les récepteurs des chémokines CXCR3 et CCR5 (Bonnechi et al., 1998 ; Loetscher et al., 1998 ; Sallusto et al., 1998).

Les marqueurs des cellules Th2 incluent les récepteurs des chémokines CCR3 (récepteur de l'éotaxine), CCR4 et CCR8 (D'Ambrosio et al., 1998 ; Zingoni et al., 1998), et T1/ST2 (Coyle et al., 1999). Non seulement T1/ST2 est un marqueur stable des cellules Th2 mais il semble impliqué dans la différenciation et la fonction des cellules Th2 : dans plusieurs modèles, l'administration d'anticorps anti-T1/ST2 prévient les réponses Th2 (Hoshino et al., 1999 ; Lohning et al., 1998 ; Senn et al., 2000 ; Townsend et al., 2000 ; Walzl et al., 2001).

4.2. Les facteurs de transcription

4.2.1. Les facteurs de transcription spécifiques

Afin de comprendre les programmes génétiques qui contrôlent la différenciation de la lignée T, de nombreux laboratoires ont isolé des facteurs de transcription sélectifs pour l'expression de l'IL-4 et de l'IFN γ . Ces travaux ont permis la mise en évidence de facteurs de transcription spécifiques des cellules Th1 ou Th2, comme T-bet qui contrôle l'expression du gène de l'IFN γ , et GATA-3 et c-Maf qui permettent la transcription du gène de l'IL-4.

4.2.1.1. Les facteurs de transcription spécifiques des cellules Th1

Le facteur de transcription T-bet a été isolé en utilisant un promoteur rapporteur du gène de l'IL-2 et une librairie d'ADNc isolés à partir de cellules Th1 activées. Plusieurs clones indépendants ont été obtenus, codant tous pour un même gène, un nouveau membre de la famille des facteurs de transcription T-box. Ce gène a été appelé T-bet pour *T-Box Expressed in T cells*. Plusieurs sites de fixation T-box existent dans le promoteur et le troisième intron du gène de l'IFN γ , là où se trouve un site d'hypersensibilité à la DNase1. T-bet est exprimé uniquement dans les cellules Th1 et dans les cellules NK, qui sont des cellules productrices d'IFN γ . Dans ces cellules, T-bet est induit rapidement après activation à la fois par le TCR et par le récepteur de l'IL-12 (Glimcher and Murphy, 2000).

La transfection de T-bet, dans toutes les cellules testées y compris les cellules B, est suffisante pour induire l'expression de l'IFN γ (Yoshimoto et al., 1997). Des essais de transfections dans des cellules non productrices d'IFN γ ont montré que T-bet transactive le gène de l'IFN γ alors qu'il réprime le gène de l'IL-2. L'expression de T-bet dans des cellules T CD4 naïves ou dans des cellules Th2 en cours de différenciation, ou même dans des cellules Th2 pleinement polarisées, résulte dans le développement de cellules Th1 productrices d'IFN γ et exprimant les marqueurs de la lignée Th1.

T-bet provoque d'une part le remodelage de la chromatine et la transcription du gène de l'IFN γ , et d'autre part l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur de l'IL-12 (Mullen et al., 2001). Non seulement T-bet induit la production de l'IFN γ , mais il inhibe aussi la production des cytokines de type Th2 comme l'IL-4 et l'IL-5. T-bet est, en conséquence, un régulateur important de la différenciation de la lignée Th1 (Figure 4).

D'autres facteurs de transcription sont sélectivement exprimés dans les cellules Th1. ERM (*Ets family transcription factor*) est induit par l'IL-12 via l'activation de STAT4. Cependant, la sur-expression de ERM ne permet pas de restaurer la production d'IFN γ dans les cellules T déficientes pour STAT4 (Ouyang et al., 1999). CIITA (*Class II MHC Transactivator*) est exprimé dans les cellules Th1 et réprime le gène de l'IL-4, sans pour autant directement transactiver le gène de l'IFN γ (Gourley et al., 1999).

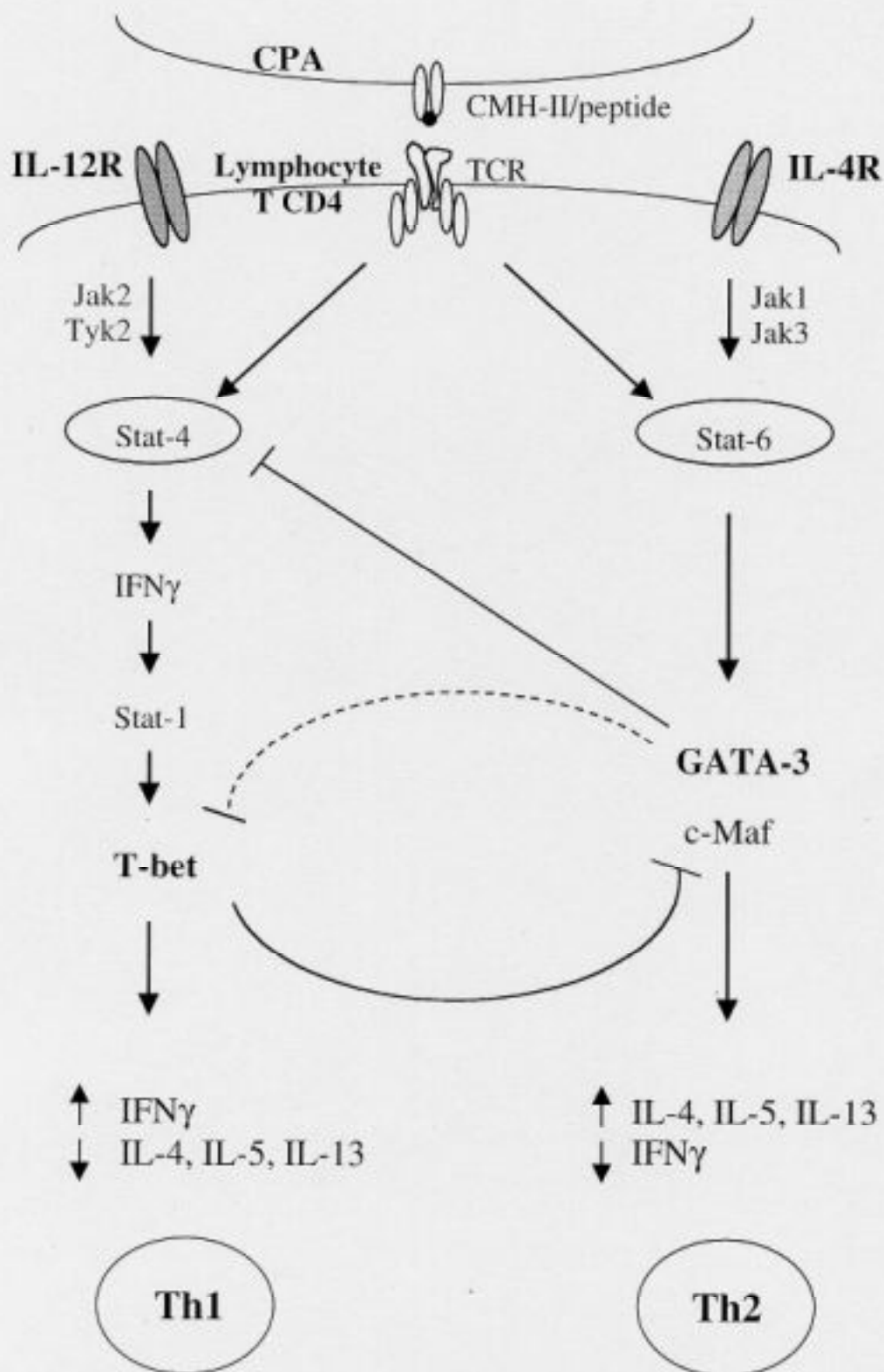


Figure 4 : Voies de signalisation mises en jeu dans la différenciation Th1/Th2.
(d'après Usui T. et al., Immunity, 2003, 18 : 415)

4.2.1.2. Les facteurs de transcription spécifiques des cellules Th2

La protéine à doigts de zinc GATA3 a été initialement clonée comme facteur de transcription spécifique des cellules T. Elle se fixe sur l'enhancer du gène du TCR α (Ho et al., 1991). Deux groupes ont montré que GATA3 était sélectivement exprimé dans les cellules Th2 (Zhang et al., 1997 ; Zheng and Flavell, 1997). L'expression ectopique de GATA3 conduit à une augmentation de la production des cytokines de type Th2 (Zheng and Flavell, 1997), alors que la transfection par un dominant négatif de GATA3 inhibe la différenciation Th2 (Zhang et al., 1999a).

GATA3 dirige directement l'expression du gène de l'IL-5 (Lee et al., 1998 ; Siegel et al., 1995 ; Zhang et al., 1998a), alors qu'il ne permet que l'augmentation de l'expression de l'IL-4 ou de l'IL-13 par des interactions avec des sites distants du promoteur proximal. La présence de l'ARNm de GATA3 corrèle avec l'expression de l'IL-5 chez des patients atopiques (Nakamura et al., 1999). Outre sa capacité d'augmenter l'expression des cytokines de type Th2, GATA3 inhibe le développement des cellules Th1 en réprimant l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 (Ouyang et al., 1998). GATA-3 est donc nécessaire à la transcription de tous les gènes des cytokines de type Th2 (Figure 4). La perte de l'expression des gènes des cytokines Th2 dans les cellules Th1 semble être liée, au moins en partie, à une régulation négative de l'expression de GATA-3. Bien que GATA3 soit un gène inductible par STAT6, il a été montré que GATA3 pouvait être transcrit et agir indépendamment de STAT6 (Ouyang et al., 2000). De plus, GATA3 s'autorégule positivement et induit l'expression de c-Maf.

L'existence d'une voie indépendante de l'IL-4 (et de la signalisation en aval du récepteur de l'IL-4, cf. infra) dans la génération de cellules productrices d'IL-4 a été confirmée par deux études sur des souris déficientes pour STAT6. Jankovic et al. rapportent que les cellules Th2 peuvent être induites *in vivo* lors d'une infection par *Schistosoma mansoni* chez des souris déficientes pour STAT6 ou pour le récepteur de l'IL-4 (Jankovic et al., 2000). Finkelman et al. démontrent que, lors d'une réponse primaire à des pathogènes, les souris déficientes pour STAT6 présentent des réponses Th2 normales (Finkelman et al., 2000).

c-Maf a été isolé à partir d'un criblage de double hybride avec le facteur de transcription NFATc1 et une librairie d'ADNc de cellules Th2 activées (Ho et al., 1996).

c-Maf est un membre de la famille AP1 qui se fixe au site consensus MARE situé dans le promoteur proximal du gène de l'IL-4. L'expression de c-Maf est restreinte aux cellules Th2 et est induite par les signaux transmis par le TCR. Les souris sur-exprimant c-Maf présentent une augmentation de la réponse immune Th2 ; cette dernière est abolie quand ces souris sont croisées avec une souche déficiente pour l'IL-4 (Ho et al., 1998). Les souris déficientes pour c-Maf se caractérisent par une production affaiblie d'IL-4 (Kim et al., 1999). Des expériences de transfection transitoire ont montré que c-Maf pouvait se fixer et transactiver le promoteur de l'IL-4 dans des clones Th1 (Ho et al., 1996). c-Maf seul ne permet pas l'expression du gène de l'IL-4, mais la cotransfection de c-Maf avec NFATp induit la transcription du gène de l'IL-4 endogène, et ce même dans des cellules B (Ho et al., 1996).

Bcl-6 influence le développement Th2. Les souris déficientes pour Bcl-6 révèlent une augmentation de la production des cytokines de type Th2, une vascularite pulmonaire et cardiaque, et n'ont pas de centre germinatif (Dent et al., 1997). Bcl-6 se fixe sur les sites reconnus par STAT6 et réprime les transcriptions induites par l'IL-4. La maladie inflammatoire et la production élevée de cytokines de type Th2 observées chez les souris déficientes pour Bcl-6 se rencontrent également quand ces souris sont croisées avec des souris déficientes pour l'IL-4 ou pour STAT6 (Dent et al., 1998). Bcl-6 peut donc réprimer les réponses Th2 *in vivo* par une voie indépendante de STAT6 et de l'IL-4.

4.2.2. Les facteurs de transcription ubiquitaires

Bien que l'activation des facteurs de transcription des familles NFAT, NFκB et AP1 ne puisse pas expliquer la spécificité d'expression du gène de l'IL-4 dans les cellules Th2, les souris déficientes pour les différents membres de ces protéines ont révélé leur rôle important dans l'expression des gènes de cytokines de type Th2.

La famille NFAT compte quatre membres, appelés NFATc1 (NFATc, NFAT2), NFATc2 (NFATp, NFAT1), NFATc3 (NFAT4, NFATx) et NFATc4 non lymphoïde (NFAT3) (Hoey et al., 1995 ; Masuda et al., 1995 ; McCaffrey et al., 1993 ; Northrop et al., 1994). Les trois membres de la famille NFAT lymphoïde sont exprimés à la fois dans les cellules Th1 et Th2 ; pourtant, le phénotype des souris déficientes pour NFATc1 ou NFATc2 met en évidence que ces facteurs de transcription peuvent réguler réciproquement l'expression

des cytokines et ainsi la balance Th1/Th2. Les cellules T des souris déficientes pour NFATc1 dans les organes lymphoïdes ont une production réduite d'IL-4 (Ranger et al., 1998 ; Yoshida et al., 1998), suggérant que NFATc1 est un activateur transcriptionnel direct du gène de l'IL-4.

Au contraire, NFATc2 et NFATc3 contrôlent négativement les réponses prolifératives et le développement Th2, ainsi que l'activation lymphocytaire (Kiani et al., 1997). On note chez les souris déficientes pour NFATc2 ont une augmentation modérée de la production de cytokines de type Th2 (Hodge et al., 1996 ; Xanthoudakis et al., 1996). Si les souris déficientes pour NFATc3 ont une production normale de cytokines (Oukka et al., 1998), le phénotype des souris déficientes à la fois pour NFATc3 et NFATc2 montre que ces facteurs de transcription ont des fonctions redondantes (Ranger et al., 1998). En effet, ces souris doublement déficientes exhibent une hyperproduction des cytokines de type Th2 et une augmentation concomitante de la concentration sérique d'IgG1 et d'IgE, immunoglobulines caractéristique d'une réponse Th2. Les conséquences pathologiques de cette dysrégulation du système immunitaire sont une blépharite allergique et une pneumonie interstitielle caractérisée par des infiltrations d'éosinophiles et de mastocytes. De plus, NFATc1, troisième membre de la famille NFAT lymphoïde, est présent de façon constitutive dans le noyau des cellules T de ces souris doubles KO, ce qui induit certainement l'activation du gène de l'IL-4 (Ranger et al., 1998 ; Yoshida et al., 1998).

NFκB se rencontre dans le cytoplasme de la majorité des types cellulaires sous la forme d'homo ou d'hétérodimères. Chaque membre de cette famille contient une région N-terminale appelée RHD (*Rel-homology domain*) qui permet la fixation à l'ADN, des domaines de dimérisation, et un signal de localisation nucléaire (NLS) (Baldwin, 1996 ; Kopp and Ghosh, 1995). Cinq protéines appartiennent à la famille NFκB : p65, c-Rel, RelB, p50/p105 et p52/p100. Les trois premières sont produites sous des formes transcriptionnellement actives, alors que les deux dernières sont synthétisées d'abord comme précurseurs de 105 et 100 kDa respectivement, avant d'être clivées et ainsi activées. Les dimères NFκB sont séquestrés dans le cytosol des cellules non stimulées via des interactions non covalentes avec des protéines inhibitrices appelées IκB. Les protéines IκB masquent le domaine NLS de NFκB, empêchant ainsi sa translocation nucléaire. Les signaux qui activent NFκB induisent la phosphorylation, la dissociation et la dégradation des protéines IκB, autorisant l'accès dans le noyau aux dimères de NFκB. Le complexe NFκB classique est l'hétérodimère p50-p65. Des études *in vitro* ont montré que l'homodimère p50-p50 agit comme répresseur de l'expression de l'IL-2

(Kang et al., 1992) ; au contraire, l'hétérodimère p50-p65 est capable d'interagir avec le promoteur du gène de l'IL-2. En outre, dans les cellules T déficientes pour p50, non seulement l'IL-2 est produite en quantité plus importante que dans les cellules T normales, mais en plus la prolifération est normale (Yang et al., 1998b). D'autres protéines NFκB, comme l'homodimère p65-p65, peuvent probablement se substituer à l'hétérodimère p50-p65 classique et diriger la production d'IL-2.

L'homodimère p50-p50 peut cependant agir comme activateur dans certains tissus comme le thymus et avoir une fonction de répresseur dans d'autres tissus à l'exemple des organes lymphoïdes périphériques (Ishikawa et al., 1998). Les souris déficientes pour les membres de la famille NFκB dévoilent l'absence de redondance entre certaines de ces protéines. Par exemple, la déficience pour p65 est létale, à cause d'une apoptose hépatique massive (Beg et al., 1995). Les souris déficientes pour p50 se développent normalement et présentent un taux normal de cellules B et T (Sha et al., 1995) ; cependant, les cellules B ne prolifèrent pas en réponse au LPS et présentent des défauts dans la commutation isotypique des IgG3, IgE et IgA (Snapper et al., 1996). De plus, il est intéressant de remarquer que ces souris déficientes pour p50 sont incapables de développer une inflammation des voies aériennes dépendante des éosinophiles. Un défaut d'activation ou de prolifération des cellules T n'est pas en cause, l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 nécessaires à l'extravasation des éosinophiles dans les voies aériennes est normale. Le défaut majeur de ces souris déficientes en p50 est l'absence de production d'IL-5 et d'éotaxine (Yang et al., 1998b). Ce phénoype de non production d'IL-5 est lié à l'absence d'expression de GATA3 chez ces souris (Das et al., 2001), révélant un rôle essentiel de NFκB dans la transcription de GATA3.

Les complexes AP1 sont constitués d'homo ou d'hétérodimères entre les protéines de la famille Jun (c-Jun, JunB et JunD) et de la famille Fos (c-Fos, FosB, Fra1 et Fra2). Les sites de fixation pour AP1 sont souvent adjacents à ceux de NFAT. Plusieurs membres des familles Jun/Fos ont été identifiés comme partenaires des complexes NFAT/AP1 après activation du TCR. La composition des facteurs Jun et Fos qui se fixent aux promoteurs des gènes de cytokines dépend de l'activation et de l'état de différenciation de la cellule. Ainsi, JunB se fixe directement sur le site AP1 en synergie avec c-Maf afin d'activer l'expression de l'IL-4 (Li et al., 1999).

4.3. Remodelage de la chromatine

Les cellules Th2 effectrices différenciées produisent de l'IL-4 plus rapidement et à un taux plus important que les cellules T naïves, suggérant que les régions régulatrices sont plus accessibles dans les cellules T effectrices que dans les cellules T naïves (Reiner and Seder, 1999). Les gènes codant pour les cytokines de type Th2 (IL-4, IL-13, IL-5) sont localisés dans un cluster, offrant la possibilité d'un contrôle commun de ces trois gènes par un remodelage de la chromatine. En effet, la diminution de la production d'IL-4 chez les souris déficientes pour le gène de l'IL-13 est due à un effet en *cis* dans lequel la déficience du gène de l'IL-13 diminue spécifiquement l'expression du gène de l'IL-4 situé à proximité sur le même chromosome (Guo et al., 2001).

Des sites d'hypersensibilité à la DNase 1 ont été localisés à la fois dans la région intergénique séparant les gènes de l'IL-13 et de l'IL-4 dans les cellules Th2 (Takemoto et al., 1998), et au niveau du gène de l'IL-4 durant la différenciation des cellules Th2 (Agarwal and Rao, 1998). Seul un des cinq sites d'hypersensibilité présents sur le gène de l'IL-4 est retrouvé dans les cellules T naïves et les cellules Th1. Les sites d'hypersensibilité à la DNase 1 présents dans les lymphocytes STAT6^{-/-} transfectés avec GATA3 sont les mêmes que ceux des cellules Th2 : GATA3 contrôle le remodelage de la chromatine d'une façon qui pourrait être indépendante de STAT6 (Ouyang et al., 2000). Tous ces sites d'hypersensibilité à la DNase 1 sont dépendants de l'activation par le TCR (Lee et al., 2001).

Des sites d'hypersensibilité à la DNase 1 ont également été mis en évidence dans le gène de l'IFN γ (Agarwal and Rao, 1998 ; Young et al., 1994) ; ils sont présents dans les cellules Th1 mais sont inexistantes dans les cellules naïves ou les cellules différenciées en Th2. T-bet, tout comme GATA3, semble jouer un rôle majeur dans le remodelage chromatinien et l'accessibilité des gènes de cytokines aux facteurs de transcription. Au cours de la différenciation vers le phénotype Th1 (ou Th2), les gènes codant pour les cytokines de type Th1 (ou Th2) sont rendus facilement et rapidement accessibles pour les complexes transcriptionnels ; dans le même temps, la chromatine contenant les gènes de l'autre type de polarisation est progressivement compactée, assurant la stabilité et l'irréversibilité du phénotype cellulaire.

4.4. Voies de signalisation

4.4.1. Voies de signalisation des récepteurs des cytokines

En dépit du manque de domaine tyrosine kinase au sein des régions cytoplasmiques des récepteurs des cytokines, la stimulation par leurs ligands induit une phosphorylation rapide et réversible de différentes protéines. La fixation des cytokines à leurs récepteurs spécifiques entraîne leur dimérisation ou leur oligomérisation. Les kinases JAK (*Janus Kinase*), constitutivement associées à la région cytoplasmique des récepteurs des cytokines, se phosphorylent entre elles et phosphorylent les résidus tyrosine présents dans la partie cytoplasmique du récepteur, créant ainsi de nombreux sites d'ancrage pour des protéines contenant des domaines SH2. Les molécules effectrices ou adaptatrices sont alors recrutées et leur phosphorylation conduit à l'activation de nombreuses voies comme les voies Ras/Raf/MAP kinase, PI-3kinase, et STAT.

Chaque JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) est activée par différentes cytokines et chaque cytokine utilise différentes combinaisons de JAKs. Les JAKs ne sont pas les seuls déterminants de la spécificité d'action des cytokines. En effet, cette spécificité dépend également de la reconnaissance des sites phosphotyrosines du récepteur par les protéines STATs (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Les STATs sont une famille de facteurs de transcription cytoplasmiques qui, une fois phosphorylés, se dimérisent et sont transloqués dans le noyau. Là, ils interagissent avec des sites de fixation spécifiques sur l'ADN de la région promotrice des gènes cibles. Les protéines STATs peuvent être spécifiques de certaines cytokines : l'étude des souris déficientes pour STAT4 et STAT6 a dévoilé de profonds défauts dans la réponse à l'IL-12 et l'IL-4, respectivement.

La voie JAK/STAT, caractéristique des récepteurs des cytokines, est rapidement activée mais aussi assez promptement sous-régulée. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que les phosphatases SHP1 et SHP2 étaient associées à JAK2, suggérant que ces phosphatases puissent avoir un rôle dans la déphosphorylation des JAKs (Jiao et al., 1996 ; Yin et al., 1997). De plus, des protéines inhibitrices spécifiques de la signalisation par les récepteurs des cytokines existent : les SOCS, *Suppressor of Cytokine Signaling*. La transcription de ces SOCS est inductible par les cytokines elles-mêmes, suggérant un rétrocontrôle négatif en inhibant la phosphorylation des protéines JAKs et STATs ainsi que celle du récepteur des cytokines.

4.4.1.1. Les récepteurs de cytokines dans les lymphocytes Th1

Au sein de la population T CD4+, le récepteur fonctionnel de l'IL-12 semble restreint aux cellules non différenciées, récemment activées et aux cellules Th1 ; il est perdu au cours de la différenciation Th2 (Szabo et al., 1995). STAT4 joue le rôle principal dans la signalisation via le récepteur de l'IL-12 pendant la polarisation Th1 (Figure 4) (Bacon et al., 1995a ; Bacon et al., 1995b ; Jacobson et al., 1995a ; Jacobson et al., 1995b). Les souris déficientes pour l'IL-12 et/ou STAT4 présentent des réponses Th1 diminuées (Kaplan et al., 1996b ; Magram et al., 1996 ; Thierfelder et al., 1996). Les cellules Th1 différenciées et activées par le TCR produisent de l'IFN γ en l'absence de Stat4 (Ouyang et al., 1999 ; Yang et al., 1999a), via l'activation de T-bet. Néanmoins STAT4 a un effet direct sur la transcription du gène de l'IFN γ (Mullen et al., 2001). Il pourrait agir par fixation coopérative aux sites STAT de basse affinité du promoteur et du premier intron de l'IFN γ (Xu et al., 1996). Deux voies de production d'IFN γ se démarquent donc : une voie dépendante du TCR, qui ne fait pas appel à STAT4 et que l'on observe dans les cellules Th1 différenciées et les lymphocytes CD8, et une deuxième voie dépendante de l'IL-12 (et de l'IL-18), nécessitant STAT4.

L'IL-18 potentialise la production d'IFN γ induite par l'IL-12 dans les cellules Th1, indépendamment de la stimulation par le TCR. En effet, la production d'IFN γ induite par l'IL-12 et l'IL-18 n'est pas amplifiée par la stimulation avec un anticorps anti-CD3 ni même inhibée par la cyclosporine A (un inhibiteur de la calcineurine et donc de l'activation induite par le TCR) (Yang et al., 1999a ; Yoshimoto et al., 1998). L'action synergique de l'IL-12 et de l'IL-18 sur le promoteur de l'IFN γ passe par l'activation de STAT4 d'une part, et par l'intervention d'AP1 et la translocation de NF κ B d'autre part (Barbulescu et al., 1998). Il faut noter que l'IL-18, en synergie avec l'IL-2, induit la production d'IL-4 et d'IL-13 dans les cellules T naïves ; dans ce contexte, la stimulation par l'antigène non seulement augmente la production d'IL-4 mais déclenche également le développement en cellules Th2 (Yoshimoto et al., 2000). L'IL-18 amplifie donc la réponse immune Th1 induite par l'IL-12, mais peut aussi stimuler les réponses immunes Th2 en l'absence d'IL-12.

4.4.1.2. Les récepteurs de cytokines dans les lymphocytes Th2

La fixation de l'IL-4 à son récepteur résulte en l'activation de STAT6 (Figure 4). Chez les souris déficientes pour le gène de ce facteur de transcription, les réponses Th2 sont réduites (Kaplan et al., 1996a ; Shimoda et al., 1996 ; Takeda et al., 1996). La voie dépendante de STAT6 n'est fonctionnelle que dans les cellules Th2, et non dans les cellules Th1 (Kubo et al., 1997). Un site consensus de fixation de STAT6 est présent dans le promoteur de l'IL-4 (Lederer et al., 1996). STAT6 est ainsi capable d'activer la transcription du gène de l'IL-4 en réponse à l'IL-4 elle-même, et d'induire de ce fait le développement Th2.

L'activation des protéines STAT est un phénomène transitoire qui s'éteint rapidement après le début de la stimulation, alors que le développement des cellules T *helper* effectrices nécessite plusieurs jours. Par conséquent, si les protéines STAT sont essentielles à la différenciation T dans la transduction précoce, elles ne déterminent pas directement le développement phénotypique T. Ce sont les facteurs de transcription spécifiques tels que T-bet et GATA3 qui assurent cette fonction. Le rôle principal de STAT6 serait donc l'induction de GATA3 (Ouyang et al., 2000).

4.4.2. Voies de signalisation des récepteurs des chémokines

La signalisation via les récepteurs des chémokines, qui sont couplés à des protéines G et exprimés à la surface des cellules Th1 et/ou Th2, contribue à la production des cytokines de type 1 ou 2. Cela a été montré pour CCR2, le récepteur de MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*). En effet, l'expression de MCP-1 est associée au développement des réponses Th2 (Chensue et al., 1995 ; Lu et al., 1998) et MCP-1 active la sécrétion d'IL-4 par les cellules T (Karpus et al., 1998 ; Karpus et al., 1997). De plus, MCP-1 est fortement exprimée dans les maladies de type Th2 comme l'asthme, et sa neutralisation dans les modèles animaux améliore la maladie (Gonzalo et al., 1998).

Chez les souris déficientes en CCR8, un récepteur exprimé à la surface des cellules Th2, la différenciation *in vitro* en cellules Th1 ou Th2 est normale, mais ces souris souffrent d'un défaut de production de cytokines de type Th2 en réponse à *S. mansoni*.

L'éotaxine se lie à CCR3 exprimé par les cellules Th2, délivrant un signal calcique (Sallusto et al., 1997) suffisant pour induire la synthèse d'IL-4 (Badou et al., 2001).

4.4.3. Voies de signalisation des molécules de costimulation

Le rôle des molécules de costimulation dans le développement des cellules T est indiscutable : les souris déficientes pour CD28 et B7 montrent une réponse immunitaire diminuée, avec surtout un défaut du développement Th2 (Freeman et al., 1993a ; Freeman et al., 1993b ; Green et al., 1994 ; Kuchroo et al., 1995 ; Lenschow et al., 1995 ; Lu et al., 1994 ; Schweitzer et al., 1997 ; Shahinian et al., 1993). Le rôle des deux molécules de costimulation B7-1 et B7-2 est plus controversé : ils paraissent diriger différemment le développement T, B7-2 favorisant préférentiellement la polarisation Th2 (Kuchroo et al., 1995 ; Nakajima et al., 1997 ; Ranger et al., 1996 ; Subramanian et al., 1997).

Un nouveau membre de la famille B7, B7-DC dont l'expression est restreinte aux cellules dendritiques, a été identifié. B7-DC ne se fixe ni à CD28 ni à CTLA-4 mais à PD-1. Il stimule la prolifération T plus efficacement que B7-1 et induit la production d'IFN γ mais pas celle d'IL-4 ni d'IL-10 par les cellules T naïves (Tseng et al., 2001).

La molécule de costimulation ICOS, fonctionnellement apparentée à CD28, et son ligand B7-H1 stimulent préférentiellement la différenciation Th2. Les cellules T des souris déficientes pour ICOS ne produisent pas d'IL-4 *in vitro* et *in vivo*. Ces souris présentent une forte susceptibilité à l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale, maladie de type Th1. ICOS a donc un rôle protecteur dans les maladies autoimmunes inflammatoires (Dong et al., 2001a). Cette molécule est également active dans l'expansion des cellules B et la commutation des Ig dans les centres germinatifs (Dong et al., 2001b). D'autres auteurs rapportent que ICOS intervient dans l'interaction cellules T - cellules B (McAdam et al., 2001). ICOS joue donc un rôle critique dans la régulation de l'immunité humorale.

Le blocage de l'interaction LFA-1/ICAM1,2 résulte dans l'augmentation de production des cytokines Th2 (Girvin et al., 2000), laissant entendre une régulation négative de ces molécules sur le développement Th2.

4.4.4. Voies de signalisation activées par le TCR

Outre les différences dans les voies de signalisation décrites ci-dessus, il apparaît clairement que les voies de signalisation via le TCR sont également divergentes dans les cellules Th1 et Th2. Les PTK des famille Src et Syk (Tamura et al., 1995 ; Tamura et al., 1993), l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Gajewski et al., 1990), et la voie des MAP kinases (Dumont et al., 1998 ; Egerton et al., 1996) sont mises en jeu dans les lymphocytes Th1 après engagement du TCR.

Par contre, beaucoup moins de choses sont connues concernant la signalisation du TCR dans les lymphocytes Th2 et la production d'IL-4 par ces cellules. L'inhibition de différents maillons des voies de signalisation n'affecte pas la production de cette cytokine. En effet, l'expression d'un oligonucléotide antisens pour Lck dans un clone Th2 induit un profil de phosphorylation sur tyrosine incomplet, sans activation de ZAP-70 et s'accompagne d'une diminution du signal calcique ; pourtant une partie de la production d'IL-4 est épargnée (al-Ramadi et al., 1996). Des inhibiteurs des PTK et de la voie des MAP kinases n'inhibent pas la production d'IL-4 et même l'amplifient (Dumont et al., 1998 ; Tamura et al., 1995).

4.4.4.1. Importance de l'intensité de stimulation du TCR dans la signalisation Th1/Th2

Une faible stimulation du TCR induit un signal calcique suffisant pour permettre la synthèse d'IL-4, avec peu ou pas d'activation des MAP kinases ; une forte stimulation déclenche à la fois un signal calcique et l'activation de la voie des MAP kinases, conduisant cette fois à la production d'IFN γ (Badou et al., 2001). Les travaux de Bottomly montrent que de faibles concentrations de peptides de haute affinité pour le TCR privilégient une différenciation Th2, probablement à cause d'une agrégation des kinases et autres enzymes de la signalisation insuffisante pour permettre une pleine activation (revue dans (Constant and Bottomly, 1997)). Le groupe de Germain affirme qu'une phosphorylation faible de la chaîne ζ et de ZAP-70 est induite par le peptide agoniste dans les cellules Th2, alors qu'une phosphorylation complète est observée dans les cellules Th1 ayant le même TCR (Germain and Stefanova, 1999).

L'utilisation d'agonistes altérés a permis de montrer que la production d'IL-4 ne nécessite pas une pleine activation des différentes voies de signalisation. Si les APL (*Altered Peptides Ligands*) n'induisent pas la prolifération des cellules T, ils sont capables d'activer des fonctions effectrices comme la production de cytokines, notamment l'IL-4, et de donner une aide aux cellules B (Evavold and Allen, 1991). L'activation d'une cellule T par un tel peptide induit une phosphorylation partielle sur tyrosine de la chaîne ζ du TCR et ne permet pas l'activation de ZAP-70 (Boutin et al., 1997 ; Madrenas et al., 1995 ; Sloan-Lancaster et al., 1994). Cette activation partielle n'est pas due à un phénomène quantitatif mais à un phénomène qualitatif : en effet il est impossible de retrouver ce profil de phosphorylation altéré en utilisant de faibles concentrations de peptides agonistes. De plus, la stimulation d'une cellule Th0 en présence d'APL induit sa différenciation en cellule Th2 (Tao et al., 1997b). L'utilisation des APL révèle que le TCR peut activer sélectivement certaines voies de signalisation à l'origine de différents phénotypes. Ceci est en accord avec les travaux de Gajewski qui montrent que la stimulation d'un clone Th0 dans des conditions induisant une anergie entraîne la perte exclusive de la production des cytokines de type Th1 ; la synthèse d'IL-4 est épargnée en dépit d'une signalisation altérée (Gajewski et al., 1994).

4.4.4.2. Rôle des tyrosines kinases dans l'équilibre Th1/Th2

La différence entre les voies de signalisation impliquées dans la production d'IL-4 et d'IFN γ peut être liée à l'activation sélective de certaines protéines intracellulaires. Singh disposait d'un clone Th0 humain spécifique de la myéline et de peptides agonistes partiels induisant la production exclusive d'IL-4 ou d'IFN γ ; la production d'IL-4 est associée à une augmentation de l'activité de Lck mais pas à celle de Fyn ni de ZAP-70, alors que la synthèse d'IFN γ est dépendante de Fyn et de ZAP-70 (Singh et al., 1999). Ce phénomène est de plus réversible, suggérant une plasticité d'activation des voies de signalisation avec la génération de signaux qualitativement différents.

Il existe aussi une activation différentielle des PTK de la famille Tec, des protéines adaptatrices et surtout des différents membres de la famille des MAP kinases entre les cellules Th1 et Th2. L'expression de Txk/Rlk est restreinte aux cellules Th0/Th1 : cette PTK est impliquée dans la transcription de l'IFN γ . La production d'IL-2 et d'IL-4 n'est pas modifiée par un antisens de Txk. Txk possède une séquence de localisation nucléaire qui lui permet

d'être transloquée dans le noyau et d'agir sur la transcription du gène de l'IFN γ . De plus, l'expression de Txk est induite par l'IL-12 et inhibée par l'IL-4 (Kashiwakura et al., 1999). La PTK Tec peut être activée par la voie de CD28 de manière dépendante des Src kinases ; elle permet ainsi la stimulation du promoteur de l'IL-2 et de l'IL-4 (Yang et al., 1999b ; Yang et al., 2000 ; Yang and Olive, 1999). Les cellules T déficientes pour Itk, la troisième PTK de la famille Tec, sont incapables de produire de l'IL-4 à cause d'une faible translocation nucléaire de NFATc, sans aucune modification de la production d'IFN γ . De plus, les souris déficientes pour Itk ne peuvent plus mettre en place des réponses de type Th2 (Fowell et al., 1999). Ces résultats insinuent que Txk/Rlk est impliquée dans la production de cytokines de type Th1, Itk dans celle de type Th2, pendant que Tec régule la transcription des cytokines des deux types. La molécule adaptatrice RIBP a été mise en évidence pour sa capacité à interagir avec Rlk/Txk. Les souris déficientes pour cette molécule adaptatrice présentent une diminution de la production d'IL-2 et d'IFN γ , mais conservent des taux d'IL-4 normaux (Rajagopal et al., 1999).

4.4.4.3. Rôle des MAP kinases dans les différences Th1/Th2

Le groupe de Flavell a étudié le rôle des MAP kinases JNK et p38 dans la balance Th1/Th2. JNK2 semble requise pour la production d'IFN γ par les cellules Th1 (Yang et al., 1998a). Bien que JNK1 ne soit pas indispensable pour la production d'IFN γ , elle favorise les réponses Th1 en régulant négativement l'expression du gène de l'IL-4 (Dong et al., 1998). Des approches expérimentales différentes ciblant p38 (inhibition pharmacologique spécifique, souris transgéniques pour un dominant négatif de p38 ou pour une forme constitutivement active de MKK6, souris déficientes pour MKK3) démasquent son importance dans le développement Th1 et la production d'IFN γ par les cellules Th1 différenciées (Lu et al., 1999 ; Rincon et al., 1998). L'ensemble de ces résultats souligne l'intervention des MAP kinases JNK et p38 dans le développement Th1 et la production d'IFN γ .

Une modélisation proposée pour expliquer la différenciation Th1/Th2 est la suivante (Nel and Slaughter, 2002) : un ligand de forte affinité pour le TCR induit un fort signal calcique et active la voie des MAP kinases. Les protéines NFAT sont donc transloquées vers le noyau ; or JNK1 est activée de façon concomitante, et entraîne l'export de NFATc hors du noyau. Ne persistent dans le noyau que NFATp et NFAT4, qui inhibent le promoteur du gène de l'IL-4. Dans le même temps, JNK2 favorise l'expression de la chaîne β 2 du récepteur de l'IL-12. Des conditions favorables à une polarisation Th1 sont ainsi créées, et renforcées par le microenvironnement (présence d'IL-12).

Un ligand de faible affinité pour le TCR ne provoque qu'un faible signal calcique et n'active pas les MAP kinases. La hausse de la concentration calcique intracellulaire est néanmoins suffisante pour induire l'activation des facteurs de transcription NFAT, et l'absence d'activité de JNK permet la concentration de NFATc dans le noyau. NFATc agit sur le promoteur du gène de l'IL-4, et une différenciation Th2 se met alors progressivement en place.

PARTIE III : LES MODELES ANIMAUX DE DESORDRES IMMUNOPATHOLOGIQUES DE TYPE TH1 ET TH2

1. Environnement, équilibre Th1/Th2 et manifestations allergiques

Différentes données permettent d'affirmer que les manifestations allergiques sont sous contrôle de cellules de type Th2 et des cytokines qu'elles sécrètent. En réponse à l'inhalation d'allergènes, les individus non atopiques (l'atopie se définissant comme une prédisposition génétique à développer des réactions de type allergique) présentent une réaction immunitaire « modérée » avec production d'isotypes IgG1 et IgG4 spécifiques de l'allergène ; *in vitro*, leurs cellules T mises en présence de l'allergène ne prolifèrent que faiblement, avec une production d'IFN γ par des cellules de type Th1 (Romagnani, 1991). A l'inverse, les patients atopiques présentent une réaction explosive avec production d'IgE spécifiques. La production de cette classe d'immunoglobulines est, nous l'avons vu, sous la dépendance des cytokines de type Th2, l'IL-4 en particulier. Chez les individus atopiques, les cellules T infiltrant les tissus atteints sont de phénotype Th2, et les lymphocytes T circulants mis en culture en présence de l'allergène répondent *in vitro* par une production de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-13).

Les mécanismes reliant la réponse de type Th2 aux phénomènes allergiques sont toutefois complexes. Une exposition à des parasites habituellement responsables d'une réponse de type Th2, avec une hyper-éosinophilie et une élévation des IgE, peut être responsable d'une résistance à un phénomène allergique, comme le montre une étude menée chez 520 enfants gabonais vivant en zone de schistosomose endémique (van den Biggelaar et al., 2000). L'auteur souligne que les enfants ayant une concentration élevée d'IgE sériques et une immunisation spécifique contre des allergènes présentent une réactivité diminuée à ces allergènes, par rapport à celle d'enfants ne montrant pas d'élévation des IgE sériques totales et spécifiques. Ce résultat s'expliquerait par l'effet anti-inflammatoire de l'IL-10 produite au cours de l'atteinte parasitaire chronique.

Une baisse de la prévalence des manifestations allergiques a été rapportée chez des patients atteints de maladies auto-immunes, donc plutôt de type Th1, comme la sclérose en plaques ou le diabète de type 1 (Oro et al., 1996). D'autres analyses ne vont pas dans le même

sens, telle une étude portant sur 60 254 enfants en Finlande qui conclut que les deux types de pathologies Th1 et Th2 peuvent se développer conjointement chez l'enfant (Kero et al., 2001).

L'augmentation de la prévalence des maladies allergiques dans les pays occidentaux (Holgate, 1999a) pose un réel problème de santé publique, et plusieurs hypothèses sont avancées afin d'expliquer ce phénomène. Si une hausse de la susceptibilité génétique au sein de la population n'a pu se développer en quelques dizaines d'années, l'hypothèse « hygiéniste » est discutée (Holgate, 1999b). L'amélioration de l'hygiène est à l'origine d'une exposition plus faible aux antigènes viraux ou bactériens durant l'enfance ; la capacité à produire des cytokines de type Th1 en serait diminuée. Or ces cytokines ont un effet régulateur sur l'aptitude à produire des cytokines de type Th2. En l'absence d'infections pro-Th1 pendant l'enfance, l'adulte pourrait plus facilement développer un phénotype atopique.

Les lymphocytes Th1 et Th2 peuvent être impliqués dans des manifestations immunopathologiques (Neukirch et al., 1997 ; Oro et al., 1996). Par leur capacité à induire des réactions inflammatoires, les cellules Th1 sont responsables de maladies autoimmunes spécifiques d'organes, comme la sclérose en plaques et le diabète de type 1. Les cellules Th2 interviennent, comme nous venons de le voir, dans les manifestations allergiques. De plus, l'autoimmunité induite par des agents chimiques comme les sels de métaux lourds s'avère être une atteinte de type Th2 associée à une activation polyclonale B.

Des modèles animaux de certaines de ces maladies ont été développés afin de faciliter l'étude et la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui les sous-tendent. Cet exposé ne se veut en aucun cas exhaustif : nous nous focaliserons sur les modèles que nous utiliserons dans notre travail, et n'aborderons pas ici les autres modèles (à l'image des modèles expérimentaux de maladies autoimmunes spécifiques d'organes endocrines, discutés dans (Lam-Tse et al., 2002)).

2. Les modèles animaux de désordres immunopathologiques de type Th1

2.1. L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE)

L'EAE est le modèle le plus ancien de maladie autoimmune. Cette maladie inflammatoire du système nerveux central constitue un modèle expérimental de la sclérose en plaques (Steinman, 1993). C'est une affection autoimmune paralytique, dépendante des cellules T (Mason, 1991). Elle est induite de façon expérimentale par immunisation avec des autoantigènes dérivés de la myéline et émulsifiés dans de l'adjuvant complet de Freund (CFA), ou suite au transfert adoptif de cellules T spécifiques de diverses protéines de la myéline (discuté dans (Cautain et al., 1999 ; Cautain et al., 2001)). Les autoantigènes utilisés afin d'induire l'EAE dérivent de trois protéines constitutives de la gaine de myéline entourant les axones ; les trois protéines couramment employées sont la protéine basique de la myéline (MBP), la protéine protéolipidique, et la glycoprotéine oligodendrogliale de la myéline (MOG).

L'évolution clinique de la maladie varie selon le modèle animal et le protocole utilisé. Mais dans la plupart des modèles, la phase aiguë de l'EAE est suivie soit d'une rémission permanente et d'une résistance concomitante à toute tentative d'induction ultérieure de la maladie, soit par une rémission transitoire accompagnée de rechutes et rémissions successives. La phase d'induction de l'EAE correspond à une réponse immune de type Th1 (Cautain et al., 2001 ; Khoury et al., 1992). Les caractéristiques histopathologiques de l'EAE sont en effet similaires à celles d'une réaction d'hypersensibilité retardée, avec une infiltration par des cellules mononuclées et un degré variable de démyélinisation. De plus, les expériences de transfert adoptif montrent que les clones T encéphalitogènes ont un profil cytokinique de type Th1, sécrétant IFN γ et IL-2. (Ando et al., 1989 ; Baron et al., 1993 ; Cua et al., 1995). Les lymphocytes Th2 spécifiques des peptides encéphalitogènes et produisant IL-4 et IL-10 sont incapables d'induire l'EAE à des animaux immunocompétents (Baron et al., 1993 ; Cua et al., 1995 ; Lafaille et al., 1997), et inhibent le transfert de la maladie par des cellules Th1 pathogènes (Cua et al., 1995).

La susceptibilité à la maladie est déterminée génétiquement (revue dans (Fournie et al., 2001)). La susceptibilité est associée à la capacité à mettre en place une réponse immune de type Th1. La résistance à l'EAE, quant à elle, est liée soit à une absence de réponse aux autoantigènes de la myéline, soit à une reconnaissance de ces autoantigènes accompagnée

d'une réponse qualitativement différente, régulant négativement la maladie (du fait d'une réponse de type Th2 ou par l'intervention de lymphocytes T régulateurs).

Les rats Brown Norway (BN) et Lewis (LEW) sont connus pour l'antagonisme de la polarisation de leur réponse immune et de leur susceptibilité aux maladies autoimmunes expérimentales. Les rats BN sont susceptibles aux maladies autoimmunes systémiques de type Th2, alors que les rats LEW sont résistants. Au contraire, les pathologies autoimmunes spécifiques d'organes de type Th1 sont facilement induites aux rats LEW, mais pas aux rats BN (Druet et al., 1996 ; Goldman and Druet, 1995). Les rats LEW immunisés avec la MBP développent une maladie aiguë et transitoire ; ils récupèrent complètement une semaine après l'apparition des signes cliniques de la maladie. Après cette phase de récupération, tout essai de réinduction de l'EAE se révèle infructueux (Mason, 1991). Les rats BN sont résistants à toute tentative d'induction de l'EAE, et cette résistance implique des gènes du CMH et des gènes non-CMH. En effet, les rats BN.1L, une souche de rat congénique pour la région du CMH de la souche LEW, restent résistants à l'EAE (Fournie et al., 2001). Cette résistance naturelle des rats BN.1L est associée à des productions diminuées d'IFN γ et accrue de TGF β .

2.2. Deux autres modèles de maladies de type Th1

L'uvéorétinite autoimmune expérimentale (EAU) est induite chez l'animal par une immunisation avec des antigènes rétiniens, et représente un modèle de l'uvéite humaine d'origine autoimmune (Caspi, 1986 ; Caspi et al., 1994). La pathogenèse de l'EAU met en jeu une destruction des tissus rétiniens dépendante de cellules T spécifiques des antigènes rétiniens. Des réponses de type Th1 sont associées à cette maladie.

La myocardite autoimmune expérimentale (EAM) peut être induite par immunisation avec la myosine α cardiaque. L'EAM est dépendante de cellules T CD4 $^{+}$ et des cytokines inflammatoires TNF α et IL-12 (Gor et al., 2003).

3. Les modèles animaux de désordres immunopathologiques de type Th2

3.1. Les maladies induites par les sels de métaux lourds

Les sels de mercure (HgCl_2) ont été utilisés en thérapeutique en tant que diurétique et comme antiseptique. Aujourd'hui, ils sont fort justement considérés comme des polluants de l'environnement. Outre ses effets toxiques à fortes doses, les dérivés mercuriels peuvent provoquer des manifestations immunopathologiques, en particulier des glomérulopathies extramembraneuses et des dermatites, chez des individus génétiquement prédisposés (Fillastre et al., 1988). Ils sont considérés comme un des agents étiologiques de la maladie de Kawasaki (Adler et al., 1982), qui est associée à une hyper ϵ globulinémie (Kusakawa and Heiner, 1976).

Les sels d'or sont toujours utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, et entraînent chez 2 à 10 % des patients traités des manifestations immunes (glomérulopathie extramembraneuse, cytopénies (Coblyn et al., 1981), hépatites, augmentation du taux d'IgE sériques (Davis et al., 1973), ...), obligeant à l'arrêt du traitement. Ce problème reste d'actualité malgré l'introduction du méthotrexate dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, car la combinaison méthotrexate-sels d'or est considérée par certains auteurs comme plus efficace que la monothérapie dans le traitement des formes graves de la maladie.

Des injections chroniques de doses non toxiques de sel de mercure HgCl_2 induisent chez le rat BN une activation polyclonale des lymphocytes B dépendante des cellules T, caractérisée par une augmentation des concentrations sériques d'IgE et IgG1. Ces animaux produisent divers autoanticorps, dont certains dirigés contre la membrane basale glomérulaire et associés au développement d'une glomérulopathie (Badou et al., 1999 ; Goldman and Druet, 1995) : l'histologie des reins révèle des dépôts linéaires d'IgG le long de la membrane basale glomérulaire. Les rats souffrent d'une protéinurie (Druet et al., 1978 ; Hirsch et al., 1982 ; Prouvost-Danon et al., 1981), et parfois même de polyarthrite et de vascularite (Kiely et al., 1995). Les cellules T autoréactives jouent un rôle important dans l'induction de l'activation polyclonale des lymphocytes B ; ces cellules T reconnaissent soit les molécules de CMH de classe II du soi, soit un peptide ubiquitaire du soi présenté par le CMH de classe II.

Plusieurs données indiquent que l'IL-4 est impliquée dans la phase précoce de la maladie :

- les isotypes et sous-classes d'immunoglobulines associées à une réponse Th2 (IgE et IgG1) dominant chez les rats BN traités par HgCl₂ ;
- l'IL-4 est détectée très précocément au cours de la maladie, aussi bien au niveau des transcrits que des protéines (Dubey et al., 1991 ; Gillespie et al., 1995 ; Gillespie et al., 1996) ;
- les lymphocytes T de rat BN normal, et non ceux de rats LEW, expriment l'ARNm de l'IL-4 lorsqu'ils sont cultivés en présence d'HgCl₂ (Prigent et al., 1995) ;
- HgCl₂ protège d'une maladie autoimmune médiées par les lymphocytes Th1 en orientant la réponse immune vers un phénotype Th2 (Saoudi et al., 1993).

A l'inverse des rats BN, les rats LEW sont résistants à l'autoimmunité induite par les sels de mercure. De plus, ils développent une immunosuppression non spécifique (Pelletier et al., 1987b) : HgCl₂ induit chez le rat LEW une protection contre des maladies autoimmunes telles que l'EAE, maladie pour laquelle cette souche est normalement hautement susceptible (Pelletier et al., 1987a ; Pelletier et al., 1988).

L'injection régulière de sels d'or à des rats BN déclenche les mêmes désordres immunologiques que ceux induits par les sels de mercure (Saoudi et al., 1995). Les rats LEW sont résistants à développer l'autoimmunité induite par les sels d'or, mais ne présentent pas d'immunosuppression suite à l'administration de sels d'or (Druet et al., 1996 ; Tournade et al., 1991).

Les cellules T autoréactives dirigées contre les molécules du CMH II du soi ont été trouvées à la fois chez les rats BN susceptibles et chez les rats LEW pourtant résistants. Les cellules T pathogènes issues d'un rat BN injecté avec des sels de mercure ou d'or expriment un phénotype Th2, caractérisé surtout par la sécrétion d'IL-4. Les lymphocytes T autoréactifs de rat LEW, au contraire, produisent IL-2, IFN γ , IL-10 et TGF β (Fournie et al., 2001). Les différences entre les souches BN et LEW dans leur susceptibilité à développer les maladies induites par les sels de métaux lourds peuvent donc s'expliquer par la polarisation de leur

réponse immune. En effet, des études aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* démontrent que, après l'administration de ces sels, une réponse IL-4 est favorisée dans les cellules de rat BN par rapport aux cellules de rats LEW. De plus, l'administration d'anticorps anti-IFN γ démasque chez le rat LEW traité par les sels d'or une réponse Th2, avec une augmentation de la concentration des IgE et des IgG1 sériques et une production d'anticorps dirigés contre la membrane basale glomérulaire (Savignac et al., 2001b). Le titre de cet autoanticorps est toutefois 4 à 5 fois plus faible que celle observée chez le rat BN injecté par des sels d'or, ce qui pourrait expliquer l'absence de dépôts glomérulaires d'IgG chez les rats LEW. Ces résultats indiquent que l'IFN γ contribue, au moins en partie, à la résistance des rats LEW aux désordres immunopathologiques induits par les sels d'or.

3.2. Modèle animal de l'asthme allergique

Les maladies allergiques, telles que l'asthme, la rhinite, l'eczéma ou les allergies alimentaires, atteignent aujourd'hui des proportions épidémiques dans les pays industrialisés (Holgate, 1999a). Parmi ces pathologies, l'asthme occupe une place prépondérante et sans cesse croissante : cette maladie inflammatoire chronique qui affecte majoritairement l'enfance touche environ 155 millions de personnes dans le monde (Cookson, 2003). L'asthme se définit comme un désordre inflammatoire chronique des voies respiratoires, dont les symptômes sont une dyspnée et une toux en particulier nocturne, des douleurs de poitrine et un essoufflement (Davies et al., 2003). Le rétrécissement voire l'obstruction des bronches à l'origine de ces signes cliniques sont consécutifs à l'inflammation et à l'hypersecretion de mucus, conjuguées à une hyper réactivité de la musculature lisse des bronchioles vis-à-vis de stimuli non spécifiques. Ces difficultés respiratoires restent néanmoins réversibles, soit spontanément soit grâce à un traitement adapté, mais tendent à s'aggraver avec le temps du fait de la fibrose qui accompagne l'inflammation chronique des bronchioles.

De nombreux types cellulaires jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de l'asthme. Le contact d'aéroallergènes avec l'épithélium respiratoire conduit au recrutement de mastocytes, de basophiles, d'éosinophiles, de monocytes et de lymphocytes T (Wills-Karp, 1999). Ces derniers sont de phénotype Th2, et l'on retrouve les effecteurs essentiels que sont l'IL-4 qui permet la production d'IgE, et l'IL-5 qui contribue au recrutement et à l'activation des éosinophiles : taux d'IgE élevés et infiltrat pulmonaire riche en éosinophiles accompagnent souvent les signes cliniques de l'asthme.

Le rat BN représente un bon modèle de l'asthme allergique humain. En effet, c'est un modèle d'hyper réactivité bronchique induite par un allergène inhalé (Elwood et al., 1991), similaire à l'asthme par de nombreux points : augmentation du taux d'IgE spécifiques de l'allergène, inflammation des voies respiratoires, et hyper réactivité bronchique suite au contact avec l'antigène et à l'administration d'un bronchoconstricteur en aérosol. Les rats BN sont sensibilisés par injection intra-péritonéale d'ovalbumine et d'hydroxyde d'alumine (McMenamin and Holt, 1993), puis sont exposés à un aérosol à base d'ovalbumine. Les fréquences d'exposition à l'antigène inhalé varient selon les protocoles.

4. Dualité Th1/Th2 : la fin d'un paradigme ?

Les preuves de l'existence de cellules CD4+ ayant des profils de sécrétion de cytokines fortement polarisés sont indiscutables ; pourtant ces réponses extrêmes sont souvent observées dans des protocoles d'immunisation forcée, bien loin des conditions physiologiques. Le vrai défi du paradigme Th1/Th2 naît de la tentative d'appliquer cette dichotomie à l'explication et la résolution de maladies dépendant du système immunitaire. De nombreux immunologistes ont présumé que la production quasi-exclusive de cytokines de type Th1 ou Th2 pouvait dicter de façon prédictible et reproductible l'évolution d'une maladie. Mais le développement d'animaux génétiquement déficients pour ces cytokines est venu agiter cette dualité « simpliste » Th1/Th2 (Gor et al., 2003). La réalité apparaît beaucoup plus nuancée.

L'intervention de l'IFN γ dans les maladies de type Th1 laissait penser que les animaux déficients pour le gène de cette cytokine ne seraient plus susceptibles à développer de telles maladies. Or les souris déficientes pour le gène de l'IFN γ restent susceptibles à l'EAE. De plus, les souches normalement résistantes à l'EAE sont rendues susceptibles par l'invalidation de ce gène (Ferber et al., 1996). Les circuits cytokiniques de régulation des maladies autoimmunes sont donc bien plus complexes que les schémas initialement proposés, l'IFN γ ayant probablement, dans certaines circonstances, un rôle anti-inflammatoire !

De même, les souris rendues déficientes pour l'IFN γ soit génétiquement soit par un traitement avec des anticorps neutralisants présentent une myocardite autoimmune expérimentale exacerbée après immunisation avec la myosine (Afanasyeva et al., 2001). La sévérité de l'EAM peut également être réduite par l'administration d'un anticorps anti-IL-4, dévoilant un effet de l'IL-4 dans la progression de la maladie !

Une meilleure compréhension des facteurs intervenant dans l'induction et le maintien des inflammations autoimmunes est nécessaire, et l'action des cytokines devra être envisagée dans chaque modèle sans les restreindre aux seules fonctions attendues selon la dichotomie Th1/Th2. A trop vouloir faire correspondre les schémas physiopathologiques avec la dualité Th1/Th2, la complexe réalité du système immunitaire a parfois été oubliée. Cela n'enlève rien à l'existence et au phénotype de ces deux populations lymphocytaires, seule son application aux modèles de maladie est parfois outrepassée.

PARTIE IV : PRESENTATION D'UNE VOIE DE SIGNALISATION IMPLIQUEE DANS LA PRODUCTION D'INTERLEUKINE-4 PAR LES LYMPHOCYTES TH2

L'interaction des domaines extracellulaires du TCR avec ses ligands conduit à l'activation d'une cascade de protéines kinases dont $p56^{lck}$, $p59^{fyn}$ et ZAP70, et aboutit à la phosphorylation et à l'activation de l'isoforme γ de la phospholipase C (Cantrell, 1996 ; Fraser et al., 1993 ; Premack and Gardner, 1992). Cette dernière permet la synthèse d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et de diacylglycérol, qui contribuent respectivement à la libération des réserves intracellulaires de calcium et à l'activation de la protéine kinase C (PKC) (cf. supra). Les voies dépendantes du calcium et de la PKC ont été principalement explorées dans le contexte de la production d'IL-2, mais peu en ce qui concerne la synthèse d'IL-4. Si la signalisation couplée au TCR est donc bien connue dans les lymphocytes Th1 (Germain and Stefanova, 1999), les voies mises en jeu dans les lymphocytes Th2 restent un sujet de débat.

En effet, l'activation des tyrosines kinases $p56^{lck}$, $p59^{fyn}$, ZAP70, et de la PLC γ ne semble pas indispensable à la production d'IL-4 (al-Ramadi et al., 1996 ; Singh et al., 1999 ; Tamura et al., 1995 ; Tamura et al., 1993). De même, la concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) est plus élevée dans les lymphocytes Th2 que dans les lymphocytes Th1 (Fanger et al., 2000), mais la variation de $[Ca^{2+}]_i$ nécessaire à la synthèse d'IL-4 est plus faible que celle permettant la production d'IL-2 (Gajewski et al., 1994 ; Sloan-Lancaster et al., 1997).

1. Caractérisation d'une voie de signalisation impliquée dans la production d'interleukine-4 par les lymphocytes Th2

Mon équipe d'accueil est partie de l'observation suivante : les sels de métaux lourds induisent l'expression précoce du gène de l'IL-4 dans les lymphocytes T de rats BN, une souche génétiquement prédisposée à développer une réponse de type Th2 (Prigent et al., 1995). En étudiant les mécanismes par lesquels les sels de mercure entraînent la transcription du gène de l'IL-4, mon équipe d'accueil a montré que (Badou et al., 1997) :

- HgCl_2 agit au niveau transcriptionnel, sans nécessiter de synthèse protéique *de novo* ;
- les sels de mercure induisent une entrée de calcium dans la cellule par des canaux sensibles à la dihydropyridine (DHP), et l'ouverture de ces canaux nécessite l'activation d'une ou plusieurs isoformes de PKC ;
- la voie calcium/calcineurine ainsi que la protéine kinase C sont impliquées dans l'expression du gène de l'IL-4 induite par HgCl_2 ;
- HgCl_2 peut activer directement la PKC, qui pourrait être une des cibles intracellulaires du mercure. Ces données confirment l'action non spécifique d' HgCl_2 et expliqueraient l'activation polyclonale (non spécifique de l'antigène) observée dans le modèle de maladie induite par les sels de métaux lourds.

Cette voie de signalisation originale, mettant en jeu PKC et récepteurs à la DHP (DHPR) dans la production d'IL-4, s'est révélée également activée suite à l'engagement du TCR (Badou et al., 2001 ; Savignac et al., 2001a), à la fois dans un hybridome T, un clone Th2, et des lymphocytes de souris différenciés en Th2. Un hybridome T capable de produire à la fois de l'IL-4 et de l'IFN γ a d'abord été étudié : lors d'un faible engagement du TCR seule l'IL-4 est sécrétée, alors qu'une forte stimulation entraîne la production des deux cytokines. Le profil de phosphorylation sur tyrosines est complet lors d'un fort engagement du TCR, mais il est inférieur à la fois en nombre de protéines phosphorylées et en intensité de phosphorylation lors d'un faible engagement du TCR. Ainsi Lck est plus faiblement phosphorylée, ZAP-70, SLP-76, et la PLC γ 1 ne le sont pas : l'IL-4 peut être produite en l'absence de phosphorylation de la PLC γ 1. Cependant, malgré cela, la PKC est transloquée à la membrane des cellules T, et l'on observe une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Cette réponse calcique dépendante de la PKC passe par des canaux calciques sensibles aux dihydropyridines et est responsable de l'expression du gène de l'IL-4. Cette voie de signalisation ne se restreint pas aux hybridomes T : elle est également fonctionnelle dans des cellules Th2 de souris.

Ainsi, si d'un côté la production d'IFN γ dans les lymphocytes Th1 repose sur les voies classiquement décrites dans le lymphocyte T, à l'opposé la synthèse d'IL-4 par les lymphocytes Th2 ferait intervenir une autre cascade de signalisation (Figure 5). De plus, cette voie de signalisation, qui intervient dans les fonctions effectrices du lymphocyte Th2, ne joue pas de rôle dans la différenciation de la cellule précurseur en lymphocytes Th1 ou Th2.

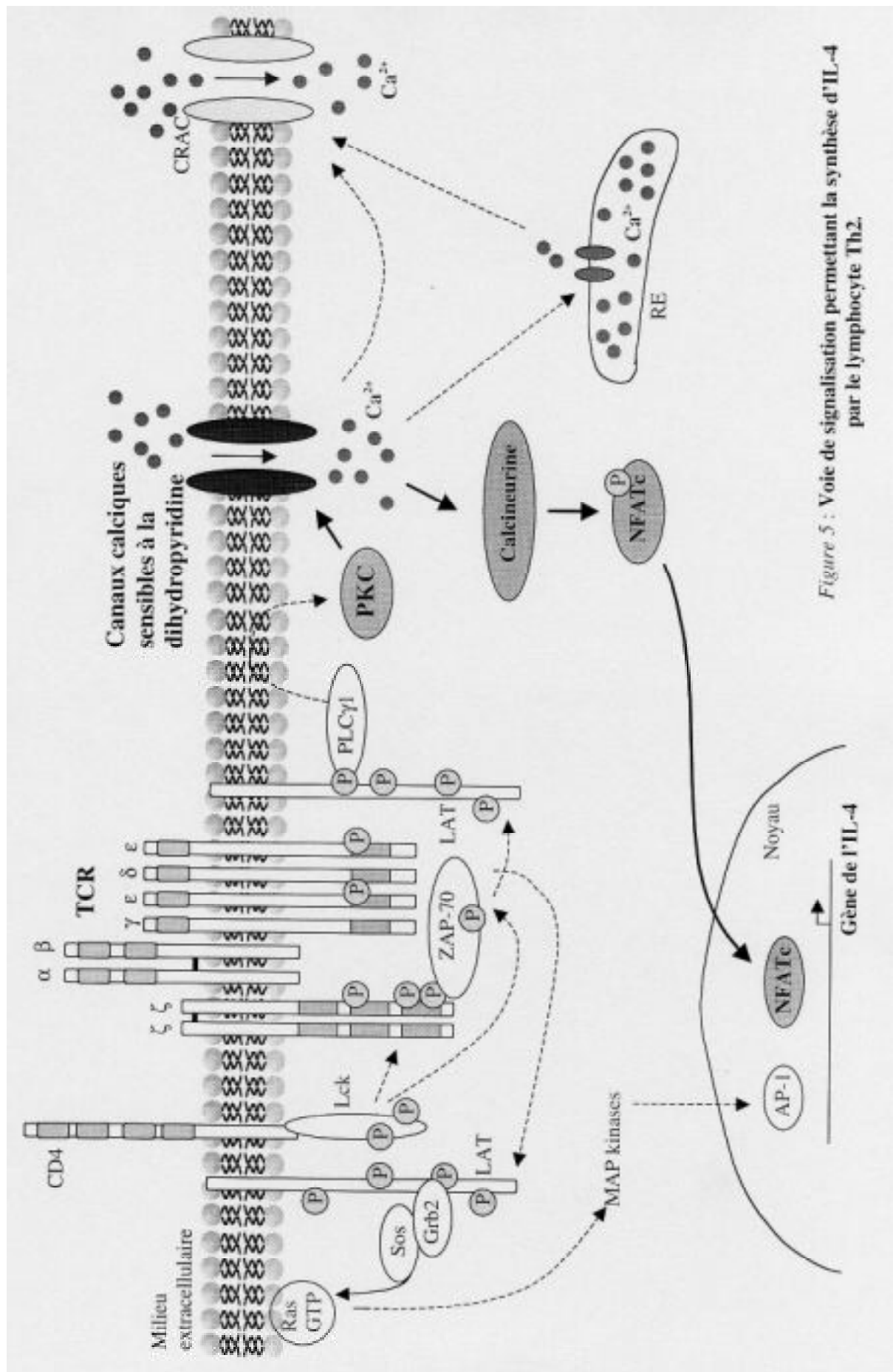


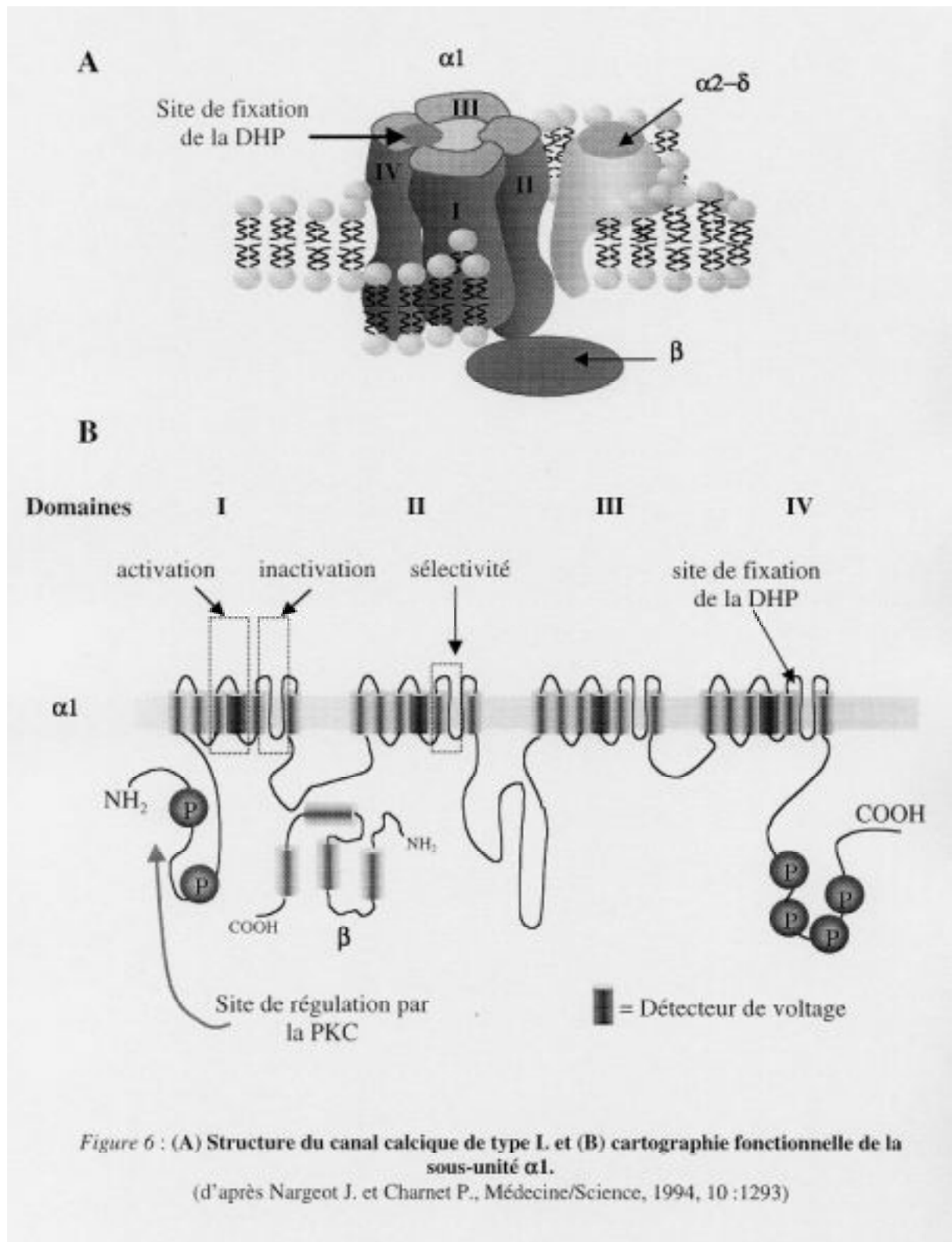
Figure 5 : Voie de signalisation permettant la synthèse d'IL-4 par le lymphocyte Th2.

Certaines sous-unités $\alpha 1$ de canaux calciques sont sensibles à la dihydropyridine (Varadi et al., 1995) : mon équipe d'accueil les a donc recherchées par RT-PCR. Les isoformes $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ ont été clonées et partiellement séquencées dans les lymphocytes Th2 murins, tandis qu'aucune sous-unité $\alpha 1$ n'a été détectée par PCR dans les cellules Th1. Les sous-unités $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$, classiquement rencontrées dans le myocarde et le tissu neuroendocrine, sont caractéristiques des canaux calciques de type L.

2. Les canaux calciques de type L (CCTL)

L'afflux de calcium à travers ces canaux dépendants du voltage joue un rôle essentiel dans les cellules excitables, en contribuant notamment à l'établissement du potentiel d'action, à la contraction musculaire, à la libération de neuromédiateurs, ... (Kamp and Hell, 2000). Ils se distinguent des autres canaux dépendants du voltage par leur capacité à fixer la dihydropyridine. Depuis quelques années, ils sont mis en évidence dans des cellules non excitables, dont certaines cellules du système immunitaire : les lymphocytes B (Sadighi Akha et al., 1996), les cellules NK (Zocchi et al., 1998), et les cellules dendritiques (Poggi et al., 1998).

Les CCTL sont des complexes protéiques multimériques (Figure 6A). La sous-unité $\alpha 1$ est le composant fonctionnel principal du canal, et forme le pore calcique. Elle porte les sites de fixation de la dihydropyridine. Elle est formée de quatre domaines transmembranaires (I à IV) organisés chacun en six hélices α transmembranaires (S1 à S6) (Figure 6B). Le quatrième segment de chaque domaine (S4) contient des acides aminés chargés positivement qui constituent une zone sensible au voltage (*voltage sensor*) : une forte variation du potentiel de membrane (-40 à -50 mV) active le canal. La boucle peptidique qui relie les segments S5 et S6 de chaque domaine est formée de deux feuilletts β impliqués dans la formation du pore et la sélectivité du canal. La sous-unité $\alpha 1$ seule est suffisante pour permettre le passage du calcium de manière dépendante du voltage.



Les CCTL peuvent également contenir des sous-unités auxiliaires ($\alpha 2$ - δ , β , et γ), qui interviennent dans l'adressage du canal à la membrane et peuvent moduler sa sensibilité au voltage. Les sous-unités $\alpha 2$ et δ sont reliées par des ponts disulfures, et ont une portion extracellulaire. La sous-unité β est intracellulaire alors que la sous-unité γ est transmembranaire. La sous-unité $\alpha 1$ est codée par quatre gènes qui confèrent la spécificité tissulaire : $\alpha 1C$ est exprimée dans le cœur, $\alpha 1D$ dans les tissus neuroendocrines, $\alpha 1F$ dans la rétine, et $\alpha 1S$ dans le muscle squelettique.

Diverses protéines peuvent réguler ces CCTL, dont les protéines G hétérotrimériques, la protéine kinase A et la PKC (Striessnig, 1999). Des sites de phosphorylation par la PKA sont localisés dans la partie C-terminale d' $\alpha 1C$ et sur $\beta 2$. Les thréonines 27 et 31 d' $\alpha 1C$ se sont révélées fonctionnellement importantes dans la régulation exercée par la PKC ; l'effet de la stimulation de la PKC sur le courant calcique est très discuté (Kamp and Hell, 2000), des observations radicalement opposées ayant été rapportées. Il semble que cette action de la PKC sur l'ouverture ou la fermeture des CCTL soit étroitement dépendante de l'isoforme de PKC activée.

3. Les protéines kinases C

La famille des PKC compte au moins douze isozymes, similaires par leur domaine catalytique de sérine et thréonine kinase (cf. supra). Ces isoformes peuvent être coexprimées dans une cellule et ont des fonctions différentes, du fait notamment de leur présence dans des compartiments cellulaires différents (Mochly-Rosen and Kauvar, 2000). La PKC θ est considérée comme jouant un rôle essentiel dans l'activation lymphocytaire (Altman et al., 2000 ; Monks et al., 1997) et la synthèse d'IL-2 (Isakov and Altman, 2002), mais peu de choses sont connues quant au rôle des autres isoenzymes dans les lymphocytes T.

La voie de signalisation étudiée ici fait intervenir une PKC (cf. supra et (Savignac et al., 2001a)) : nous avons vu qu'une translocation de PKC α était détectée malgré l'absence de phosphorylation de la PLC γ . Or l'activation des PKC classiques et nouvelles repose sur la production de diacylglycérol. Les PLC γ sont activées par phosphorylation, et sont donc couplées à des récepteurs à activité tyrosine kinase. Une autre famille de phospholipases C, les PLC β , ne nécessitent pas une phosphorylation pour être activées : elles se situent en aval de récepteurs couplés à des protéines G, comme les récepteurs des chimiokines. Les PLC β produisent du diacylglycérol et sont donc des activateurs des protéines kinases C.

OBJECTIFS

La stimulation du TCR conduit à l'activation d'une PKC contrôlant une entrée de calcium dans la cellule par des canaux calciques sensibles à la dihydropyridine ; des sous-unités $\alpha 1$, connues pour être sensibles à la dihydropyridine, ont été découvertes par RT-PCR dans les lymphocytes Th2 de souris. La présence dans les cellules non excitables que sont les lymphocytes de canaux calciques classiquement décrits comme étant dépendants du voltage pose le problème du fonctionnement de ces canaux.

Les objectifs de mon travail sont donc multiples : il s'agira tout d'abord de confirmer la présence des sous-unités $\alpha 1$ au niveau protéique dans les lymphocytes Th2 murins, et de montrer leur implication fonctionnelle dans la synthèse d'IL-4. En effet seuls des modulateurs pharmacologiques des récepteurs à la dihydropyridine (DHPR) ont été jusqu'à présent utilisés, et des approches plus spécifiques devront être utilisées. Il faudra ensuite essayer de comprendre le fonctionnement de ces DHPR, en étudiant le potentiel membranaire des lymphocytes Th2.

D'autre part, des inhibiteurs des DHPR existent en thérapie humaine ; il est donc intéressant de tester l'effet de telles molécules sur des modèles animaux de pathologie de type Th1 et Th2, afin de savoir si les DHPR peuvent constituer une cible thérapeutique dans les maladies associées à une exacerbation de la réponse Th2.

Enfin, l'intervention des PKC sera explorée, en recherchant l'implication préférentielle d'une isoforme dans la production d'IL-4.

Mon travail s'articule donc autour de deux grands points :

- 1- L'étude des DHPR dans les lymphocytes Th2 murins et dans des modèles animaux,
- 2- La recherche de ou des isoformes de PKC intervenant dans cette voie de synthèse de l'interleukine-4.

MATERIEL ET METHODES

1. Animaux

Des souris mâles âgées de 10 à 15 semaines, de fond génétique BALB/c et transgéniques pour le TCR DO11.10 spécifique du peptide 323-339 de l'ovalbumine restreint au CMH de classe deux I-A^d (Murphy et al., 1990), des souris BALB/c (Janvier Ets, Le Genest St-Isle, France), des rats Brown-Norway et Lewis (Janvier) ont été élevés au sein de l'animalerie de l'IFR30.

2. Différenciation des cellules Th1 et Th2

Des cellules T CD4⁺ issues de souris DO11.10 ($0,5 \cdot 10^6$ cellules/mL) sont mises en culture à 37°C et 5% CO₂ dans des plaques de 24 puits (Costar, New-York) contenant du milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (ATGC, Noisy Le Grand, France), 1mM de pyruvate, 0,1mM d'acides aminés non essentiels, 2mM de L-glutamine, 100U/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine (tous de Gibco), et 50 µM de β-mercaptoéthanol (Sigma, Saint-Louis, MO). Les cellules T sont stimulées par des cellules spléniques de souris BALB/c (faisant office de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) après lyse des globules rouges et irradiation) et du peptide 323-339 de l'ovalbumine (0,3µM). De l'IL-12 (5ng/mL) et un anticorps anti-IL-4 (10µg/mL) sont ajoutées dans le but de différencier les cellules en Th1 ; IL-4 (10ng/mL) et Ac anti-IFNγ (10µg/mL) sont mélangés au milieu pour orienter vers le phénotype Th2. Ces cellules sont restimulées tous les 7 jours dans les mêmes conditions. Toutes les expériences sont réalisées sur des cellules ayant été stimulées à 3 reprises.

3. Hybridome T

L'hybridome 2G12.1 restreint au CMH II I-A^d et spécifique du peptide 26-39 de la β 2-microglobuline de souris a été utilisé. Il produit à la fois de l'IL-4 et de l'IFN γ après stimulation du TCR (Badou et al., 2001 ; Savignac et al., 2001a).

4. Mesure de la production d'IL-4 et d'IFN γ

Les cellules ($2,5 \cdot 10^4$ cellules/puits) sont stimulées par un Ac monoclonal anti-TCR H57-597 (PharMingen BD, San Diego, CA) (Kubo et al., 1989) adsorbé sur plaque de 96 puits (Costar). Le surnageant est récupéré 24 heures après, et la production d'IL-4 et d'IFN γ est déterminée par dosage immunoenzymatique (test ELISA, PharMingen).

5. Immunoempreinte

$2 \cdot 10^7$ cellules sont lysées dans 100 μ L de PBS contenant 4mM d'EDTA, 1% de Triton, 150mM de NaCl, 20mM de Tris pH8, 1 pastille de cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 1 μ g/mL d'aprotinine, de leupeptine et de pepstatine, 1mM de PMSF, 5mM de PPNa, 1mM de Na₃VO₄, 1mM de NaF (Sigma). Le contenu en protéines est dosé avec le kit Bio-Rad (Hercules, CA). Des échantillons correspondant à 30 ou 150 μ g de protéines (pour l'étude des PKC ou d' α 1 respectivement) sont déposés sur un gel de sodium dodécyl sulfate à 7,5% de polyacrylamide, soumis à électrophorèse, puis transférés sur membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Les membranes sont incubées une nuit avec les Ac anti- α 1C ou α 1D (au 1/250^e) (préincubés ou non avec le peptide contrôle) (PharMingen ; ou Alomone Labs, Jérusalem, Israël), ou avec les Ac spécifiques des isoformes de PKC (1 μ g/mL) (PharMingen). La révélation fait appel à un Ac anti-lapin couplé HRP (Sigma), et à un substrat chimioluminescent (Amersham, Arlington Heights, IL).

6. Transfection par des oligonucléotides antisens

Les oligonucléotides suivants sont utilisés : antisens $\alpha 1D1$: 5'-catcatcatcatcatcatcat-3' ; antisens $\alpha 1D2$: 5'-ttagccttctctcttctcttctgagaattctccactaaggacacc-3' ; antisens $\alpha 1C$: 5'-cctcgtgttttcattgaccat-3' ; sens $\alpha 1D$: 5'-gggtgccttagtgagaattctcaaaggaaagagagaaggctaa-3' (dessinés à partir des séquences d' $\alpha 1C$ de souris (L101776) et d' $\alpha 1D$ de rat (D38101)) ; antisens $PKC\alpha$: 5'-cgggtaaacgtcagccat-3' (Mackenzie et al., 1997); antisens $PKC\delta$: 5'-gaaggagatgcgagcaggaa-3' (Mackenzie et al., 1997); antisens $PKC\theta$: 5'-tcgaagaaacggtgacat-3' ; antisens $PKC\zeta$: 5'-gtccgtcctgctgggcat-3' (Huang et al., 1997) ; sens $PKC\alpha$: 5'-taccgactgcaaattgggc-3' (Fleming et al., 1998). 100 μ L de lipofectine (200 μ g/mL, Sigma) sont préincubés avec 100 μ L d'oligonucléotides (100 μ M) pendant 1 heure à 20°C. Ce mélange est ensuite ajouté à 0,5.10⁶ cellules T dans du milieu de culture sans SVF pendant 12 heures, puis dans du milieu supplémenté en SVF les 12 heures suivantes. L'utilisation d'oligonucléotides couplés au FITC a permis de détecter une fluorescence intracellulaire par microscopie confocale dans plus de 60% des cellules transfectées.

7. Marquage des DHPR et microscopie confocale

Les cellules T sont préincubées ou non avec un excès de dihydropyridine (DHP) non marquée (S(-)BayK8644, 100 μ M, Sigma), puis mises en présence de DHP fluorescente couplée au bodipy (ST-bodipy DHP, 250nM, Molecular Probes, Eugene, OR) pendant 5 minutes à l'obscurité. Les cellules sont ensuite analysées par microscopie confocale (Savignac et al., 2001a).

8. Analyse de la concentration intracellulaire en calcium

Les cellules T sont incubées avec 5 μ M d'indo-1 acétoxyméthylester (AM) (Sigma) (Savignac et al., 2001a). Ces cellules sont alors mises en contact pendant 1 minute avec des cellules spléniques irradiées de souris BALB/c, préalablement chargées avec le peptide ova (10 μ M, pendant 1 heure à 37°C). Le rapport calcium lié sur libre est ensuite mesuré avec un Elite Coulter Cell Sorter (Coultronics, Margency, France) aux longueurs d'onde d'excitation 355nm, d'émission 405/475nm. Les résultats sont analysés avec le logiciel Cell Quest (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

9. Etude du potentiel membranaire

Les cellules T sont incubées dans 100nM de bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) triméthine oxonol (DiBAC₄(3)) pendant 5 minutes à 20°C dans l'obscurité. Le DiBAC₄(3) est une sonde anionique qui se répartit entre les compartiments intra et extracellulaires en fonction du potentiel membranaire. Les modifications de fluorescence sont mesurées en cytométrie de flux (Elite Coulter Cell Sorter (Coultronics)) en utilisant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 488 et 520nm respectivement. Le système est calibré sur la base du potentiel du potassium K⁺ : lorsque la membrane est perméante au K⁺ (par l'ajout de valinomycine, un ionophore potassique), le potentiel membranaire $\Delta\Psi$ est donné par l'équation de Nernst : $\Delta\Psi = 2,3(RT/nF)\log[K^+]_i/[K^+]_e$, où $2,3(RT/nF)$ vaut 58mV à 20°C. $[K^+]_e$ est définie comme la concentration de K⁺ dans le milieu extracellulaire pour laquelle l'ajout de valinomycine ne modifie pas la fluorescence. L'ajout de KCl dans le milieu (25, 50, 75mM = $[K^+]_e$) achève le calibrage en donnant deux informations : (i) $\Delta\Psi$ grâce à l'équation de Nernst, et (ii) une valeur de fluorescence déterminée en cytométrie. $\Delta\Psi$ est alors une fonction de la fluorescence mesurée du DiBAC₄(3) (Davis-Taber et al., 2000 ; de Poorter and Keltjens, 2001). Les cellules préincubées avec le DiBAC₄(3) sont ensuite étudiées avant et après stimulation par un Ac anti-TCR H57-597 adsorbé sur plaque, ou par des cellules spléniques irradiées de souris BALB/c (préalablement chargées ou non pendant 1 heure à 37°C avec 10μM de peptide ova). Lors de l'analyse des lymphocytes Th2, ces cellules sont d'abord marquées avec un Ac anti-Thy1.2 couplé à la phycoérythrine (30H12-PE, PharMingen), avant d'être incubées avec le DiBAC₄(3) (afin d'éviter une prise en compte des variations de potentiel des CPA lorsque les lymphocytes Th2 sont stimulés par celles-ci).

10. Traitement des rats BN avec les sels d'or

Huit rats BN sont injectés avec de l'aurothiopropanol sulfonate (ATPS) (Allochrysine®, Solvay Pharma Labs, Suresnes, France ; à raison de 20mg/kg de poids corporel en sous-cutané, 3 fois par semaine pendant 3 à 4 semaines), et avec de la nicardipine (Loxen®, Novartis Pharma SA, Rueil-Malmaison, France ; 5mg/kg de poids corporel en intrapéritonéal, 5 jours sur 7). Les injections de nicardipine commencent le même jour que la première injection d'ATPS et se poursuivent jusqu'au sacrifice. Huit rats ne sont injectés qu'avec l'ATPS, et quatre avec seulement la nicardipine. Les titres d'Ig sériques et d'Ac anti-laminine sont mesurés 1 fois par semaine (Druet et al., 1998).

11. Induction de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

Huit rats Lewis sont injectés dans les coussinets plantaires des pattes postérieures avec la protéine basique de la myéline (MBP) émulsifiée dans de l'adjuvant complet de Freund (Cautain et al., 2001). Quatre d'entre eux sont traités avec la nicardipine dès le jour de l'immunisation par la MBP. Le score clinique de la maladie est établi comme suit : (0) normal, (1) queue flasque, (2) faiblesse des pattes postérieures, (3) paralysie d'une patte postérieure, (4) paralysie bilatérale des pattes postérieures, (5) score (4) et incontinence, (6) mort.

12. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm la déviation standard, et les différences entre groupes sont analysées à l'aide du test U de Mann-Whitney.

RESULTATS

1. Etude des canaux calciques sensibles à la dihydropyridine dans des lymphocytes Th2 et des modèles animaux

1.1. Les sous-unités $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ sont exprimées dans les cellules Th2 murines mais pas dans les lymphocytes Th1

L'expression d' $\alpha 1C$ et d' $\alpha 1D$ dans les lymphocytes Th2 murins a été précédemment montrée par RT-PCR et PCR quantitative en temps réel. Nous avons donc recherché la présence de ces sous-unités au niveau protéique. Une ou deux bandes d'environ 200kD sont détectées dans les lysats de cerveau de souris et de lymphocytes Th2, et non chez les cellules Th1 (Figure 7A). La présence des isoformes $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ dans les lymphocytes Th2 est confirmée à l'aide d'autres anticorps polyclonaux reconnaissant $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ (Figure 7B). Dans cette deuxième expérience, l'hybridome T 2G12.1 sert de contrôle positif : une étude précédente (Savignac et al., 2001a) avait montré qu'il exprimait $\alpha 1D$ et produisait de l'IL-4 après stimulation du TCR. Les bandes ne sont plus repérées lorsque les Ac sont préincubés avec les peptides qui ont servi à les synthétiser (Figure 7A et B).

1.2. Des oligonucléotides antisens $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ inhibent l'expression des DHPR, la réponse calcique, et la synthèse d'IL-4 par les lymphocytes Th2

Afin de juger du rôle fonctionnel des sous-unités $\alpha 1$, une approche basée sur des oligonucléotides antisens a été utilisée (Brysch and Schlingensiepen, 1994). Cette technique a déjà été employée avec succès pour évaluer le rôle de ces sous-unités dans des cellules excitables (Bulteau et al., 1998) et non excitables (Barry et al., 1998). La transfection de lymphocytes Th2 avec des oligonucléotides antisens $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ diminue l'expression des DHPR à la surface des cellules (Figure 8A). De plus, ces oligonucléotides antisens diminuent à la fois la réponse calcique (Figure 8B) et la synthèse d'IL-4 (Figure 8C) induites par la stimulation du TCR chez les lymphocytes Th2. Les oligonucléotides sens n'ont aucun effet. Chez les lymphocytes Th1, au contraire, les oligonucléotides antisens $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ n'affectent ni la réponse calcique ni la sécrétion d'IFN γ (Figure 8B et C).

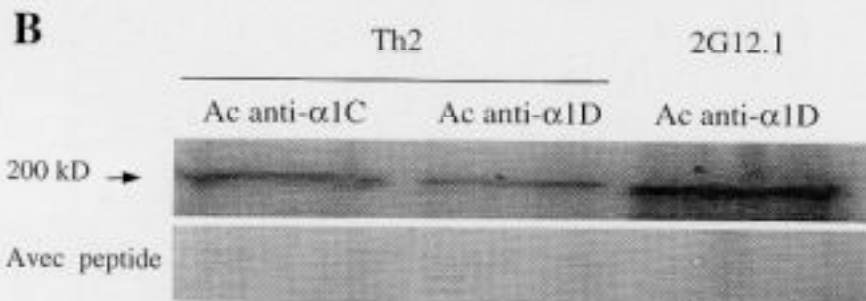
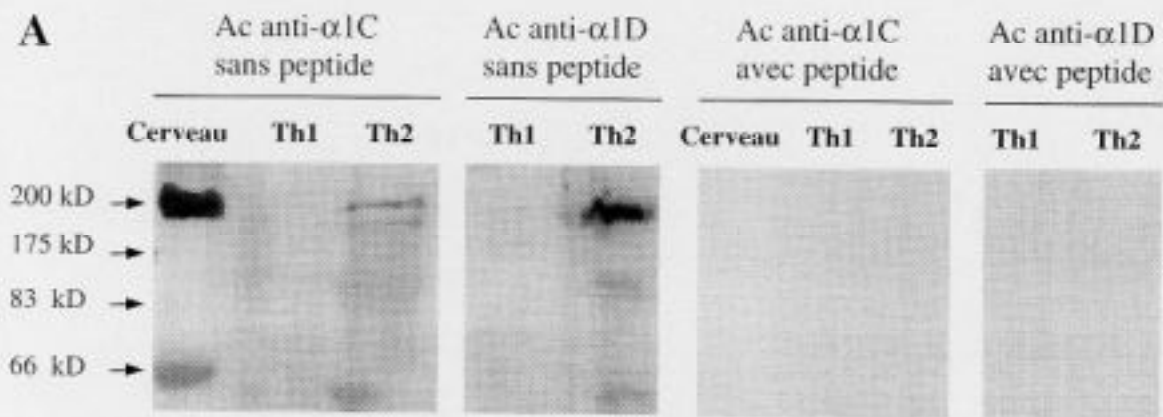


Figure 7 : Les lymphocytes Th2 murins, mais pas les Th1, expriment les protéines α 1C et α 1D.

L'expression d' α 1C et α 1D est analysée par immunoempreinte dans des lysats de lymphocytes Th1 et Th2 (150 μ g de protéines par puits). (A) et (B) représentent les résultats obtenus avec des Ac polyclonaux anti- α 1C et anti- α 1D différents (PharMingen en (A), Alomone Labs en (B)). La préincubation de ces Ac avec leur peptide contrôle abolit tout marquage. Des lysats de cerveau de souris (50 μ g/puits, (A)) et de l'hybridome T 2G12.1 (50 μ g/ligne, (B)) servent de contrôles positifs.

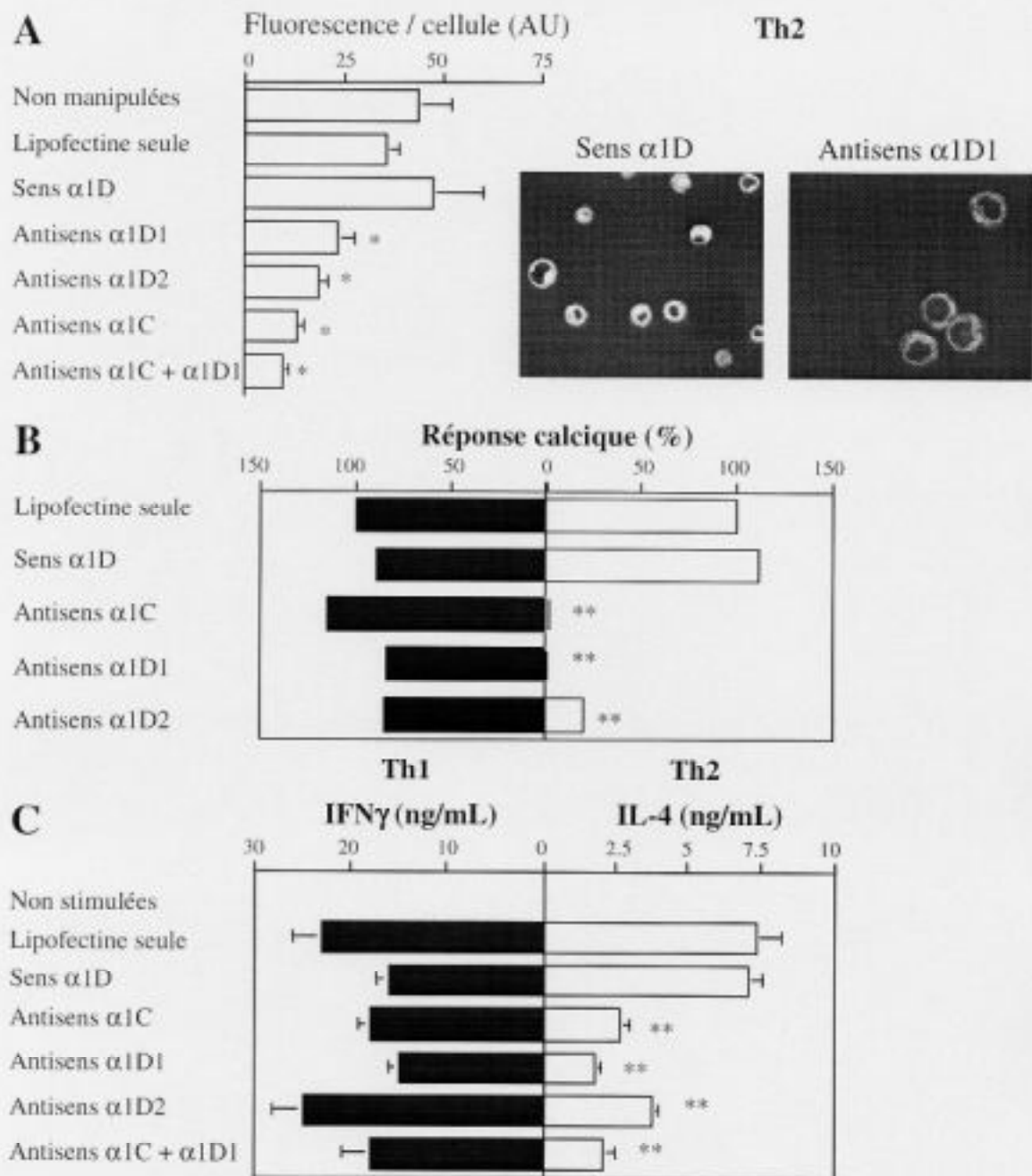


Figure 8 : Des oligonucléotides antisens α 1C et α 1D inhibent l'expression des DHPR, la réponse calcique, et la synthèse d'IL-4 par les lymphocytes Th2.

Les lymphocytes Th1 (barres noires) et Th2 (barres blanches) sont traités avec la lipofectine et transfectés ou non avec des oligonucléotides antisens α 1C ou α 1D (α 1D1 ou α 1D2) ou sens α 1D.

(A) Les lymphocytes Th2 sont marqués avec la ST-Bodipy DHP. Le marquage non spécifique est déterminé en préincubant les cellules avec un excès d'agoniste non marqué des DHPR (le S(-)BayK8644). Les photographies montrent l'expression des DHPR sur les lymphocytes Th2 transfectés avec des oligonucléotides sens α 1D ou antisens α 1D1, après soustraction du marquage non spécifique. L'histogramme exprime la moyenne de l'intensité de fluorescence des cellules en unités arbitraires (AU). (B) La réponse calcique des lymphocytes Th1 et Th2 est mesurée après marquage des cellules à l'indo-1AM, suivi d'une stimulation par des CPA chargées avec le peptide 323-339 de l'ovalbumine. (C) Les lymphocytes Th1 et Th2 ne sont pas ou sont stimulés pendant 24 heures par un Ac monoclonal anti-TCR (1 μ g/mL) adsorbé sur plaque, puis leur production de cytokines est mesurée par test ELISA.

* $p < 0,005$ (A, au moins 30 cellules analysées), ** $p < 0,01$ (B et C, $n=8$), par rapport aux cellules traitées avec la lipofectine seule ou transfectées avec l'oligonucléotide sens.

1.3. Etude du potentiel membranaire des lymphocytes Th2 suite à l'engagement du TCR

Les sous-unités $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ sont constituées de queues intracytoplasmiques COOH et NH_2 terminales et de quatre domaines transmembranaires (Figure 6) ; chacun de ces domaines est composé de six segments (S), numérotés de 1 à 6 (Kamp and Hell, 2000 ; Striessnig, 1999). Dans chaque segment S4, des acides aminés chargés positivement (K=lysine et R=arginine) et répétés selon une séquence particulière forment une zone sensible aux variations de potentiel : ils constituent le senseur du voltage. Nous avons séquencé les quatre domaines transmembranaires de la sous-unité $\alpha 1D$ des lymphocytes Th2 et trouvé en position attendue les quatre segments S4 (avec les acides aminés K et R), identiques à ceux de la sous-unité $\alpha 1D$ pancréatique. Nous avons donc voulu explorer le potentiel membranaire des lymphocytes Th2 suite à une stimulation du TCR, afin de rechercher une éventuelle dépolarisation susceptible d'induire et d'expliquer l'ouverture de ces canaux calciques.

Une sonde fluorescente sensible aux variations de potentiel, le DiBAC₄(3), a été utilisée. Cette molécule se répartit entre les compartiments extra et intracellulaires. Lorsque la membrane plasmique se dépolarise, le DiBAC₄(3), qui est un anion, tend à pénétrer dans la cellule : la dépolarisation se traduit donc par une augmentation de l'intensité de fluorescence des cellules (Figure 9). Une dépolarisation faible, allant de $7,4 \pm 4,4$ mV à, au maximum, $20,2 \pm 10,6$ mV, a été observée suite à une stimulation des lymphocytes Th2 par un Ac anti-TCR ou par des CPA (Tableau 1). D'autres manipulations avec le DiBAC₄(3) n'ont révélé aucune dépolarisation suite à l'engagement du TCR. Donc la stimulation des lymphocytes Th2 ne semble pas engendrer de variations du potentiel membranaire compatibles avec l'ouverture des sous-unités $\alpha 1$, les valeurs de dépolarisation classiquement décrites dans la littérature étant de -40 à -50 mV (Varadi et al., 1995).

Les sous-unités $\alpha 1$ sont décrites comme étant à la fois sensibles à une dépolarisation et régulées par les PKC (Striessnig, 1999). Mais chez les lymphocytes Th2, une dépolarisation induite par l'ajout de KCl (50mM) dans le milieu de culture (Figure 9A) n'entraîne pas de signal calcique (non montré). Le PMA, activateur des PKC classiques et nouvelles, déclenche un signal calcique chez les cellules Th2 (Savignac et al., 2001a) ; ce flux calcique induit par le PMA n'est pas potentialisé par l'ajout de KCl (non montré).

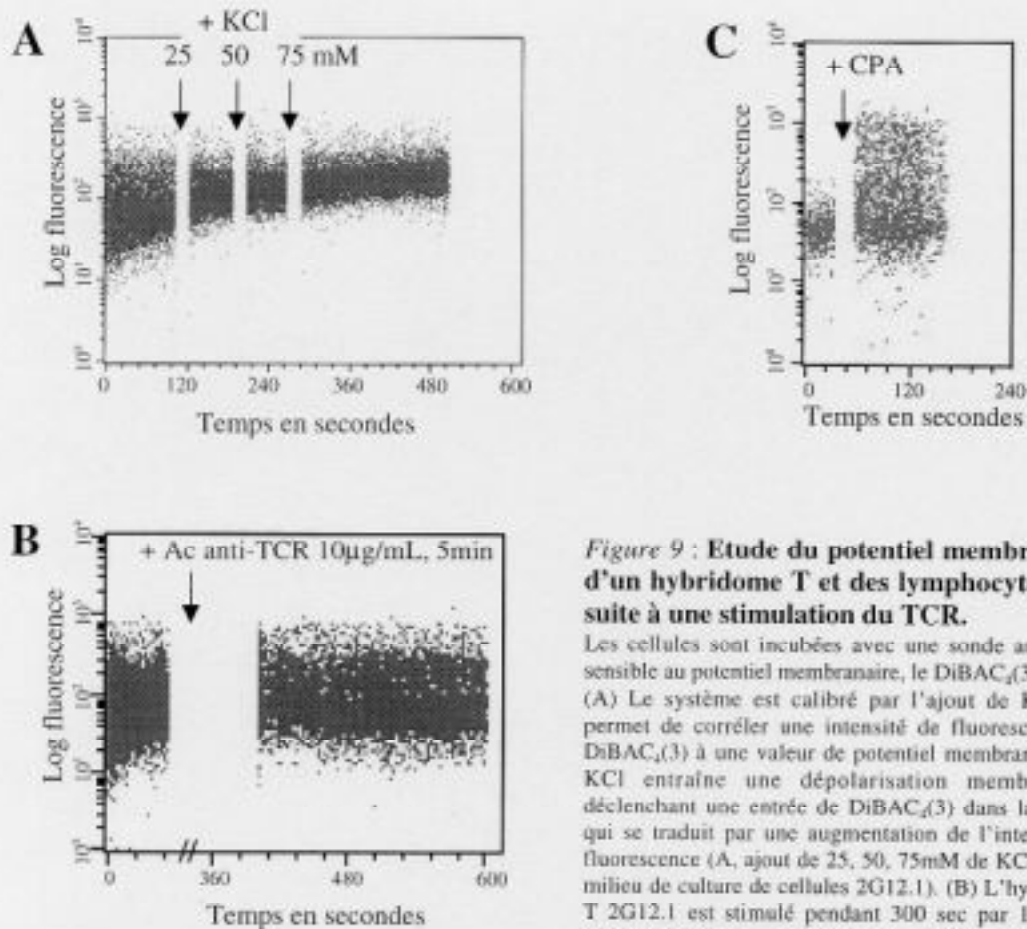


Figure 9 : Etude du potentiel membranaire d'un hybridome T et des lymphocytes Th2 suite à une stimulation du TCR.

Les cellules sont incubées avec une sonde anionique sensible au potentiel membranaire, le DiBAC₄(3). (A) Le système est calibré par l'ajout de KCl, qui permet de corréler une intensité de fluorescence du DiBAC₄(3) à une valeur de potentiel membranaire. Le KCl entraîne une dépolarisation membranaire, déclenchant une entrée de DiBAC₄(3) dans la cellule qui se traduit par une augmentation de l'intensité de fluorescence (A, ajout de 25, 50, 75mM de KCl dans le milieu de culture de cellules 2G12.1). (B) L'hybridome T 2G12.1 est stimulé pendant 300 sec par 10µg/mL d'Ac anti-TCR adsorbé sur plaque. (C) Les lymphocytes Th2 sont mis en contact avec des CPA (10 CPA pour 1 cellule T), puis immédiatement analysés par cytométrie de flux.

Tableau 1 : Variations de potentiel membranaire mesurées après stimulation du TCR d'un hybridome T et de cellules Th2.

Cellules testées	Conditions de stimulation	Dépolarisation en mV
2G12.1	Ac anti-TCR 10µg/mL, 300 secondes (n=3)	26,7 ± 4,4
Th2	Ac anti-TCR 10µg/mL 30 secondes (n=2)	7,4 ± 4,4
	Ac anti-TCR 10µg/mL 120 secondes (n=2)	13,5 ± 9,1
	APC et Ova, 10 APC pour 1 cellule T (n=3)	12,1 ± 6,3
	APC sans Ova, 10 APC pour 1 cellule T (n=3)	20,2 ± 10,6

L'Ac anti-TCR est adsorbé sur plaque ; les cellules sont déposées dans un puits pendant une durée déterminée, puis récupérées et leur intensité de fluorescence est mesurée en cytométrie de flux. La stimulation par les CPA consiste à mélanger lymphocytes et CPA ; l'étude de la fluorescence est immédiate.

1.4. Un inhibiteur des DHPR prévient l'apparition d'une maladie autoimmune médiée par les lymphocytes Th2, mais n'a pas d'effet sur l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale, une maladie de type Th1

La nicardipine (Loxen®) est un inhibiteur des DHPR utilisé chez l'homme dans le traitement de l'hypertension. Cette molécule a donc été testée *in vivo* sur un modèle de maladie Th2 (Badou et al., 1999) : les rats BN traités par des sels d'or (aurothiopropanol sulfonate, ATPS) présentent une augmentation des concentrations sériques d'immunoglobulines (Ig) G1 et E (Figure 10 A et B), ces Ig étant associées à une réponse Th2 (Mas et al., 2000 ; Savignac et al., 2001b). Ces rats souffrent également d'une production d'auto-Ac anti-laminine (Figure 10 C), un composant de la membrane glomérulaire ; ces Ac se déposent le long des parois des capillaires glomérulaires, dessinant un dépôt linéaire après marquage avec un Ac anti IgG de rat couplé au FITC. L'expression des sous-unités $\alpha 1$ est augmentée dans les splénocytes de rats BN injectés avec les sels d'or par rapport aux rats contrôles (non montré).

L'injection quotidienne de nicardipine diminue fortement l'augmentation des concentrations sériques d'IgG1 et d'IgE (Figure 10 A et B) induite par les sels d'or, et abolit la production d'auto-Ac anti-laminine (Figure 10 C). De plus, la nicardipine prévient le développement de la glomérulopathie (non montré). Ces résultats démontrent l'effet bénéfique d'un inhibiteur des DHPR dans ce modèle d'autoimmunité dépendante des cellules Th2.

Afin d'éliminer un éventuel effet immunosuppresseur global de la nicardipine, nous avons testé l'action de cette drogue sur un modèle de maladie Th1. L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) est une maladie inflammatoire du système nerveux central qui sert de modèle à la sclérose en plaques. La nicardipine ne prévient pas le développement de cette maladie induite chez le rat LEW par une immunisation unique avec la protéine basique de la myéline (Figure 10 D).

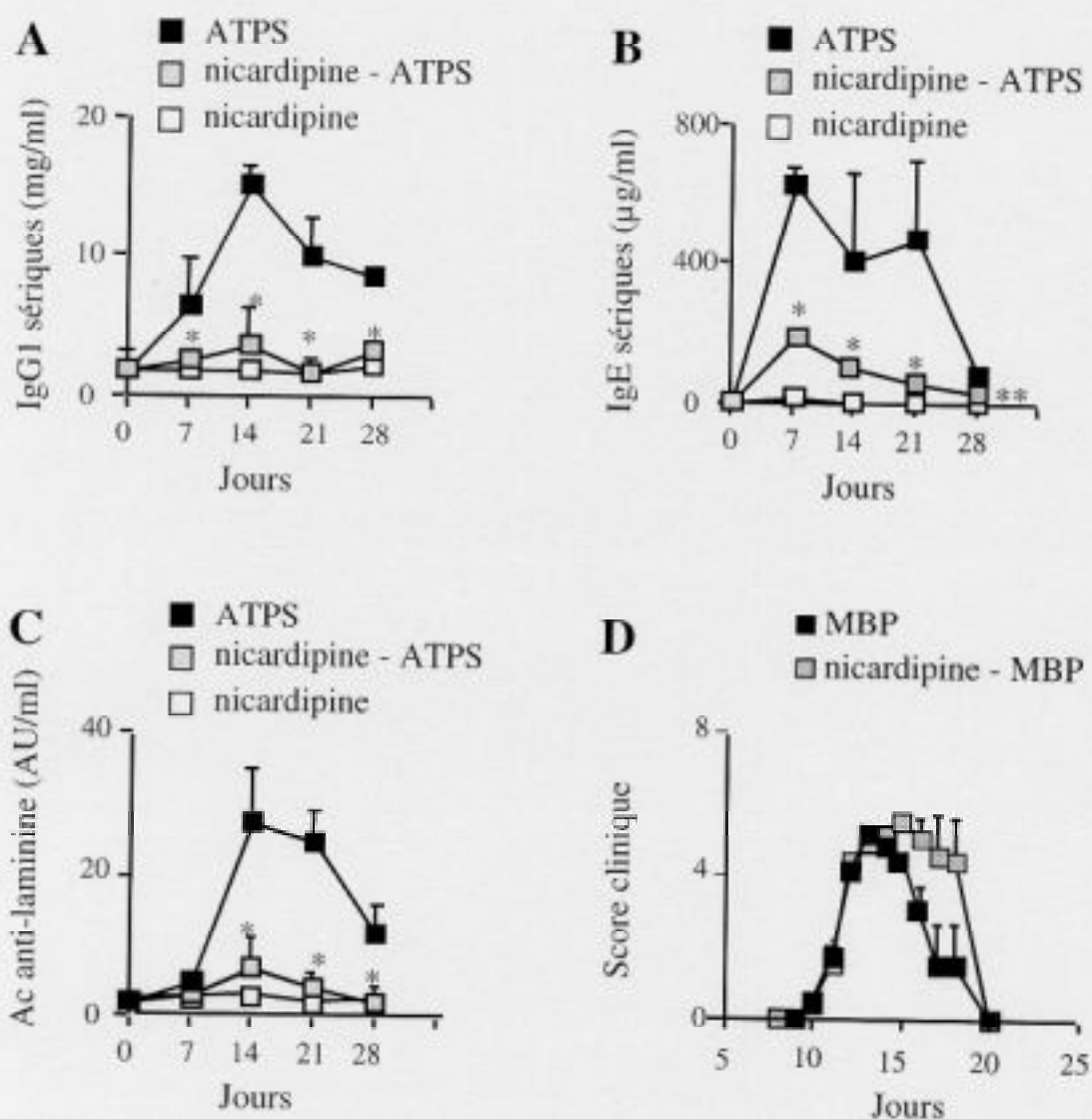


Figure 10 : La nicardipine, un inhibiteur des DHPR, prévient l'apparition d'une maladie autoimmune de type Th2, mais n'a pas d'effet sur une maladie de type Th1.

(A-C) Des rats BN sont injectés 3 fois par semaine avec de l'aurothiopropanol sulfonate (ATPS) ou du NaCl, et reçoivent ou non des injections de nicardipine 5 jours par semaine. Les concentrations d'IgG1 (A) et d'IgE (B) sériques, ainsi que d'auto-Ac anti-laminine (C) sont quantifiées chaque semaine.

* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ par comparaison des rats traités par ATPS et nicardipine avec les rats injectés seulement avec l'ATPS. AU = unités arbitraires.

(D) Des rats LEW sont immunisés avec la protéine basique de la myéline (MBP) et traités ou non avec la nicardipine. La sévérité de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale est évaluée quotidiennement, et les résultats expriment la moyenne + l'écart à la moyenne des scores cliniques individuels de 4 rats par groupe.

2. Etude des isoformes de PKC intervenant dans la synthèse d'IL-4

2.1. Etude des isoformes de PKC exprimées par les lymphocytes Th1 et Th2

Une analyse précédente avait montré que les PKC α , δ , ϵ , θ et ζ étaient exprimées au niveau de l'ARN messager aussi bien dans les lymphocytes T naïfs que dans les cellules Th1 et Th2. Nous avons recherché la présence de ces isoformes au niveau protéique, dans l'optique de découvrir une expression différentielle des isoformes de PKC entre les lymphocytes Th1 et Th2. Des expériences préliminaires d'immunoempreinte suggèrent que les deux sous-populations lymphocytaires coexpriment les PKC α , δ , θ et ζ . Les isoformes α et θ semblent présentes à des niveaux similaires, δ étant plus exprimée dans les lymphocytes Th2 et ζ dans les lymphocytes Th1 (non montré). La PKC ϵ n'a pas été détectée.

2.2. Effets d'oligonucléotides antisens ciblant les isoformes de PKC sur la production d'IL-4 et d'IFN γ par un hybridome T

Afin de juger l'implication préférentielle d'une isoforme de PKC dans la synthèse d'IL-4 et d'IFN γ , l'hybridome T 2G12.1 synthétisant ces deux cytokines a été transfecté avec des oligonucléotides antisens des isoformes α , δ , θ et ζ . Les oligonucléotides antisens α , δ et θ diminuent la synthèse d'IL-4, tandis que seul l'antisens de l'isoforme θ affecte la sécrétion d'IFN γ . L'antisens α entraîne un accroissement de la production d'IFN γ . La PKC ζ ne semble pas intervenir dans l'excrétion d'IL-4 ni d'IFN γ (Figure 11).

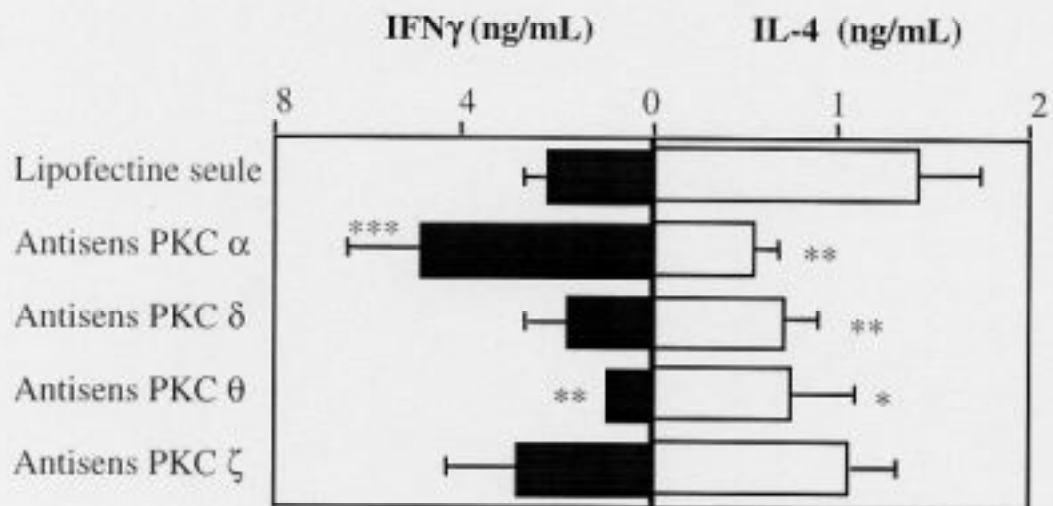


Figure 11 : Effets d'oligonucléotides antisens des isoformes de PKC sur la production d'IL-4 et d'IFN γ par un hybridome T murin.

Les cellules de l'hybridome T 2G12.1 sont traitées avec la lipofectine et transfectées ou non avec des oligonucléotides antisens des isoformes α , δ , ζ et θ de PKC. Vingt-quatre heures plus tard, elles sont stimulées par un Ac anti-TCR (1 μ g/mL) adsorbé sur plaque. Leur production de cytokines est évaluée par test ELISA après vingt-quatre heures de stimulation.

* p<0,02, ** p<0,005, *** p<0,002 par rapport aux cellules traitées uniquement avec la lipofectine.

DISCUSSION

Nous avons montré que les sous-unités $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ étaient exprimées sélectivement par les lymphocytes Th2, qu'elles se comportaient comme des récepteurs à la dihydropyridine (DHPR) et étaient impliquées dans la réponse calcique et la synthèse d'IL-4 par ces lymphocytes Th2.

1. Les récepteurs à la dihydropyridine : un nouveau canal calcique dans les lymphocytes Th2

Les canaux calciques présents à la membrane des lymphocytes T comprennent des canaux CRAC, des canaux cationiques non sélectifs activés par la libération de calcium, et des canaux proches de canaux dépendants du voltage (Grafton and Thwaite, 2001 ; Guse, 1998). La voie calcique joue un rôle très important dans l'activation du lymphocyte T ; elle fait intervenir la PLC γ qui génère l'IP3, ce dernier mobilisant les réserves intracellulaires de calcium et déclenchant un afflux soutenu de calcium à travers les canaux CRAC (Guse, 1998). Le contrôle de cette réponse est différent entre les lymphocytes Th1 et Th2, avec une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ plus ténue dans les cellules Th2 suite à une stimulation via le TCR (Fanger et al., 2000 ; Gajewski et al., 1994 ; Sloan-Lancaster et al., 1997).

Fanger et *al* (Fanger et al., 2000) ont trouvé le même nombre de canaux CRAC dans des clones Th1 et Th2, et ont expliqué les différences de réponse calcique par : (i) une plus faible densité de canaux potassiques activés par le calcium dans les lymphocytes Th2, et (ii) une meilleure clairance cytosolique du calcium chez les cellules Th2. La présence spécifique des DHPR dans les lymphocytes Th2 apporte un nouvel élément de réponse, et la contribution respective des canaux CRAC et des DHPR dans la réponse calcique de ces cellules devra être explorée.

Les sous-unités $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ confèrent la sensibilité à la DHP aux canaux calciques de type L (CCTL), qui sont définis comme des canaux activés par une forte variation de potentiel et exprimés dans les cellules excitables (Varadi et al., 1995). Les sous-unités $\alpha 1$ s'associent à différentes sous-unités auxiliaires ($\alpha 2$ - δ , β , et γ) qui peuvent moduler leurs propriétés fonctionnelles (Gurnett and Campbell, 1996 ; Isom et al., 1994). Nous ne savons pas si $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ forment un canal L classique dans les lymphocytes Th2. Cela paraît peu probable pour plusieurs raisons : (i) l'équipe de Cahalan (Fanger et al., 2000) n'a pas trouvé de canaux calciques dépendants du voltage dans les lymphocytes Th2 ni dans les lymphocytes Th1 ; (ii) l'utilisation du KCl ne permet pas d'induire une réponse calcique dans les lymphocytes Th2 (non montré).

Cependant, la dépendance au voltage de ces canaux peut être modulée par différents facteurs (Helton et al., 2002 ; Koschak et al., 2001 ; Scholze et al., 2001) ; ainsi la sous-unité $\alpha 1C$ exprimée en l'absence des sous-unités auxiliaires $\alpha 2$ - δ ou β forme un canal aux propriétés biophysiques proches d'un canal de type T activé par un faible voltage (Meir and Dolphin, 1998). De plus, des canaux calciques formés par $\alpha 1C$ ou $\alpha 1D$ (et éventuellement d'autres sous-unités non identifiées) ont été détectés dans des cellules non excitables comme les cellules épithéliales rénales (Barry et al., 1998), les ostéoblastes (Barry, 2000), les cellules dendritiques (Poggi et al., 1998), les cellules NK (Zocchi et al., 1998), et les lymphocytes B (Sadighi Akha et al., 1996). Ces données suggèrent qu'une dépolarisation de la membrane plasmique n'est pas nécessaire ou est insuffisante pour entraîner l'ouverture du DHPR dans le lymphocyte Th2. Nous voulons maintenant rechercher si des sous-unités auxiliaires sont associées à $\alpha 1$ dans le lymphocyte Th2, et éventuellement mener des études électrophysiologiques afin de comprendre le fonctionnement de ce canal dans la cellule Th2.

2. Régulation des DHPR dans les lymphocytes Th2

La régulation du DHPR suite à l'engagement du TCR n'est donc pas connue, mais la PKC pourrait jouer un rôle important. En effet, le PMA entraîne une entrée de calcium qui est inhibée par un antagoniste des DHPR (non montré). De plus, le PMA déclenche la synthèse d'IL-4 par les lymphocytes Th2. La capacité de la PKC à moduler les fonctions de la sous-unité $\alpha 1$ est documentée dans différents systèmes cellulaires, la PKC pouvant phosphoryler la queue cytosolique N-terminale d' $\alpha 1C$ (Shistik et al., 1998). Par ailleurs, l'entrée de calcium dans le lymphocyte B par des DHPR suite à la stimulation du BCR nécessite la production de GMP cyclique (GMPc) (Sadighi Akha et al., 1996) ; une intervention du GMPc devra donc être envisagée dans le lymphocyte Th2, d'autant plus que le GMPc peut induire une dépolarisation de la membrane plasmique (Kramer and Molokanova, 2001 ; Shaw et al., 1999).

Un autre point intéressant est de savoir si les DHPR sont les véritables effecteurs de la réponse calcique. En effet des modifications conformationnelles du canal permettent l'activation de récepteurs à la ryanodine (RyR) présents à la membrane du réticulum sarcoplasmique, dans le muscle squelettique (Catterall, 1995 ; Fill and Copello, 2002 ; Murayama and Ogawa, 2002) ; ces RyR libèrent alors les réserves intraréticulaires de calcium. Les lymphocytes T exprimant les RyR (Grafton and Thwaite, 2001 ; Guse, 1998), un couplage entre les DHPR et les RyR devra être exploré dans les lymphocytes Th2.

3. Effet d'inhibiteurs des canaux calciques sur des maladies de type Th2

Les inhibiteurs de canaux calciques ne constituent pas le traitement de choix des maladies allergiques, mais ils ont un effet bénéfique dans l'asthme en agissant sur l'hyperréactivité bronchique (Chand et al., 1988 ; D'Brot et al., 1989 ; Kivity et al., 1992 ; Verdiani et al., 1989), ainsi que dans l'allergie et l'urticaire (Negro-Alvarez et al., 1997 ; Pigatto et al., 1990). Nos résultats montrent qu'un inhibiteur des DHPR prévient le développement d'un désordre immunopathologique de type Th2 induit par les sels d'or chez le rat BN. Son absence d'effet sur une maladie autoimmune de type Th1 montre que cette molécule n'induit pas une immunosuppression globale. Les inhibiteurs des canaux calciques pourraient donc agir non seulement sur les mécanismes effecteurs finaux de l'allergie (par exemple les muscles lisses bronchiques dans l'asthme (Hirota et al., 2003)), mais aussi sur la production de cytokines par les cellules Th2 et ainsi sur la synthèse d'IgE.

4. Protéines kinases C et production d'IL-4

Nos premiers résultats concernant les isoformes de PKC impliquées dans la synthèse d'IL-4 ont été obtenus sur un hybridome T sécrétant à la fois de l'IL-4 et de l'IFN γ après stimulation de son TCR. Ils confirment un rôle majeur de la PKC θ dans la cellule T ; cette isoforme est connue pour intervenir dans l'activation de NF κ B et la synthèse d'IL-2 (Bauer et al., 2000 ; Sun et al., 2000), dans la mobilisation de calcium et l'activation de NFAT (Pfeifhofer et al., 2003). Son rôle dans la production d'IL-4 a également été montré (Mochly-Rosen and Kauvar, 2000 ; Ron et al., 1999). L'approche utilisée ici, basée sur des oligonucléotides antisens spécifiques de chaque isoforme, suggère que les PKC α et δ agissent électivement sur la sécrétion d'IL-4. Il est intéressant de noter que l'antisens ciblant la PKC α diminue la production d'IL-4 et augmente celle d'IFN γ , dans un hybridome T. Enfin, des expériences préliminaires réalisées sur les lymphocytes Th2 paraissent relever l'importance des PKC α et δ (non montré). Les PKC interviennent à de nombreuses étapes de la signalisation (Pfeifhofer et al., 2003) et jouent un rôle dans l'activation de facteurs de transcription (AP-1, NF κ B, NFAT), la modulation de l'expression du TCR à la membrane, le cycle cellulaire, ... Une dissection précise des étapes spécifiquement affectées par chaque isoforme sera donc nécessaire.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les DHPR sont des marqueurs spécifiques des lymphocytes Th2 ; ils participent à la réponse calcique et à la synthèse d'IL-4 par ces cellules.

1. Fonctionnement des canaux calciques sensibles à la dihydropyridine dans les lymphocytes Th2

Les mécanismes de régulation des sous-unités $\alpha 1$ de ces canaux restent à élucider : nous souhaitons donc rechercher les sous-unités auxiliaires qui y sont éventuellement associées, et étudier leurs propriétés électrophysiologiques dans les lymphocytes Th2. Des expériences préliminaires de patch-clamp ont été réalisées avec l'aide de P. Lory (CNRS, Montpellier) : dans les conditions utilisées, aucun courant calcique dépendant du voltage n'a pu être mis en évidence.

Par ailleurs, les canaux calciques de type L peuvent être régulés par quatre mécanismes différents de phosphorylation (Striessnig, 1999) :

- par la PKA qui se fixe sur plusieurs sites consensus dans la partie C-terminale d' $\alpha 1C$;
- par la voie NO-GMPc : le monoxyde d'azote active la guanylate cyclase, et le GMP cyclique ainsi produit induirait une activité phosphodiesterase augmentant la génération d'AMP cyclique ;
- par les tyrosines kinases ;
- par la PKC comme nous l'avons souligné plus haut.

Ces différentes voies, et notamment l'intervention du GMPc seront prochainement envisagées.

L'étude de souris invalidées pour les sous-unités $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ serait très intéressante. Les souris déficientes pour $\alpha 1D$ existent, avec pour seul phénotype des troubles du rythme cardiaque et une surdité (Platzer et al., 2000). L'analyse des réponses Th2 chez ces souris serait lourde d'enseignements. Les souris invalidées pour $\alpha 1C$ selon un mode non conditionnel ne sont pas viables. Mais très récemment, des souris transgéniques pour $\alpha 1C$ ont été développées avec le système Cre-LoxP : il serait captivant de croiser ces souris avec une souche exprimant la recombinaison Cre sous contrôle d'un promoteur spécifique des lymphocytes T.

2. Intérêt des inhibiteurs des canaux calciques dans le traitement de maladies de type Th2

Un inhibiteur des DHPR prévient efficacement l'apparition d'une maladie auto-immune de type Th2 associée à une hyperproduction d'IL-4. La présence élective des DHPR sur les lymphocytes Th2 différenciés renforce l'intérêt curatif d'un tel traitement. Il faudra donc confirmer son efficacité sur d'autres modèles animaux de maladie Th2, avant de rechercher l'implication des DHPR dans les manifestations allergiques chez l'homme. Le modèle murin d'asthme serait en l'occurrence très utile : un modèle d'hyper réactivité bronchique induite par l'inhalation d'antigène sera développé chez la souris BALB/c et le rat BN ; les paramètres pulmonaires (résistance et compliance pulmonaires) seront mesurés. Le liquide de lavage bronchoalvéolaire, les coupes histologiques de poumons, et les échantillons sanguins prélevés sur ces animaux permettront d'évaluer l'effet des inhibiteurs des DHPR sur le développement de la maladie.

L'IL-5 est une autre cytokine sécrétée par les lymphocytes Th2 et dont le rôle dans les manifestations immunopathologiques est reconnu : il est donc de première importance d'explorer le rôle des DHPR dans la synthèse de cette autre cytokine de type Th2, *in vitro* puis *in vivo*.

3. Rôles des isoformes de protéine kinase C dans les propriétés effectrices des lymphocytes Th2

L'identification des isoformes de PKC impliquées sélectivement dans la production d'IL-4 met en lumière les PKC α et δ . L'intervention de ces isoformes devra être confirmée dans les lymphocytes Th2, et différentes approches seront utilisées :

- des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des diverses classes de PKC ;
- des oligonucléotides antisens, de façon similaire à l'étude menée ici ;
- des dominants négatifs : j'ai participé à la production des plasmides codant ces protéines ; nous les transfecterons dans les lymphocytes Th2 ;
- enfin la technique d'interférence d'ARN est envisagée.

L'implication de ces PKC sera ensuite validée *in vivo* sur des modèles de maladie Th2, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des isoformes de PKC (Ishii et al., 1996), d'oligonucléotides antisens (déjà employés chez l'homme (Roychowdhury and Lahn, 2003)), ou par la technique de RNAi *in vivo*.

Cette étude permet donc d'envisager une nouvelle thérapie des maladies liées à une dérégulation de la réponse Th2, en ciblant DHPR et PKC.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, P. DESNOYERS, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
M. GOMES Bruno, Olivier
a été admis(e) sur concours en : 1998
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 15 septembre 2003
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

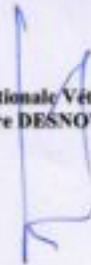
AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussignée, S. BOULLIER, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :
M. GOMES Bruno, Olivier
intitulée :
«Etude d'une voie de signalisation intervenant dans la production de cytokines par les lymphocytes T.»

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Séverine BOULLIER**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Pierre DESNOYERS**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Antoine BLANCHER**



**Vu le : 10 OCT. 2003
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes, *Nature* 383, 787-93.
- Abe, K., Rossman, K. L., Liu, B., Ritola, K. D., Chiang, D., Campbell, S. L., Burridge, K., and Der, C. J. (2000). Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA, *J Biol Chem* 275, 10141-9.
- Acuto, O., and Cantrell, D. (2000). T cell activation and the cytoskeleton, *Annu Rev Immunol* 18, 165-84.
- Adler, R., Boxstein, D., Schaff, P., and Kelly, D. (1982). Metallic mercury vapor poisoning simulating mucocutaneous lymph node syndrome, *J Pediatr* 101, 967-968.
- Afanasyeva, M., Wang, Y., Kaya, Z., Stafford, E. A., Dohmen, K. M., Sadighi Akha, A. A., and Rose, N. R. (2001). Interleukin-12 receptor/STAT4 signaling is required for the development of autoimmune myocarditis in mice by an interferon-gamma-independent pathway, *Circulation* 104, 3145-51.
- Agarwal, S., and Rao, A. (1998). Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation, *Immunity* 9, 765-75.
- al-Ramadi, B. K., Nakamura, T., Leitenberg, D., and Bothwell, A. L. (1996). Deficient expression of p56(lck) in Th2 cells leads to partial TCR signaling and a dysregulation in lymphokine mRNA levels, *J Immunol* 157, 4751-61.
- Alessi, D. R., and Cohen, P. (1998). Mechanism of activation and function of protein kinase B, *Curr Opin Genet Dev* 8, 55-62.
- Altman, A., Isakov, N., and Baier, G. (2000). Protein kinase C theta: a new essential superstar on the T-cell stage, *Immunol Today* 21, 567-73.

Ando, D. G., Clayton, J., Kono, D., Urban, J. L., and Sercarz, E. E. (1989). Encephalitogenic T cells in B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype, *Cell Immunol* *124*, 132-143.

Ardouin, L., Boyer, C., Gillet, A., Trucy, J., Bernard, A. M., Nunes, J., Delon, J., Trautmann, A., He, H. T., Malissen, B., and Malissen, M. (1999). Crippling of CD3-zeta ITAMs does not impair T cell receptor signaling, *Immunity* *10*, 409-20.

Arpaia, E., Shahar, M., Dadi, H., Cohen, A., and Roifman, C. M. (1994). Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase, *Cell* *76*, 947-58.

Asada, H., Ishii, N., Sasaki, Y., Endo, K., Kasai, H., Tanaka, N., Takeshita, T., Tsuchiya, S., Konno, T., and Sugamura, K. (1999). Grf40, A novel Grb2 family member, is involved in T cell signaling through interaction with SLP-76 and LAT, *J Exp Med* *189*, 1383-90.

Ashkar, S., Weber, G. F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M. E., Jansson, M., Zawaideh, S., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Glimcher, M. J., and Cantor, H. (2000). Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity, *Science* *287*, 860-4.

August, A., Sadra, A., Dupont, B., and Hanafusa, H. (1997). Src-induced activation of inducible T cell kinase (ITK) requires phosphatidylinositol 3-kinase activity and the Pleckstrin homology domain of inducible T cell kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11227-32.

Bach, E. A., Szabo, S. J., Dighe, A. S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Murphy, K. M., and Schreiber, R. D. (1995). Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets., *Science* *270*, 1215-1218.

Bachmann, M. F., McKall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D. E., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation, *Immunity* *7*, 549-57.

- Bacon, C. M., McVicar, D. W., Ortaldo, J. R., Rees, R. C., O'Shea, J. J., and Johnston, J. A. (1995a). Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12, *J Exp Med* *181*, 399-404.
- Bacon, C. M., Petricoin, E. F., 3rd, Ortaldo, J. R., Rees, R. C., Lerner, A. C., Johnston, J. A., and O'Shea, J. J. (1995b). Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 7307-11.
- Badou, A., Saoudi, A., Dietrich, G., Druet, E., Druet, P., and Pelletier, L. (1999). Mercuric chloride-induced autoimmunity, *CurrProt Immunol* *15*, 1-18.
- Badou, A., Savignac, M., Moreau, M., Leclerc, C., Foucras, G., Druet, P., Guéry, J. C., and Pelletier, L. (2001). Weak T cell receptor (TCR) stimulation induces a calcium signal that triggers IL-4 synthesis while MAP kinases are activated for stronger TCR engagement and control IFN γ production., *Eur J Immunol* *31*, 2487-2496.
- Badou, A., Savignac, M., Moreau, M., Leclerc, C., Pasquier, R., Druet, P., and Pelletier, L. (1997). HgCl₂-induced IL-4 gene expression in T cells involves protein kinase C-dependent calcium influx through L-type calcium channels, *J Biol Chem* *272*, 32411-8.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights, *Annu Rev Immunol* *14*, 649-83.
- Bancroft, A. J., Else, K. J., and Grencis, R. K. (1994). Low-level infection with *Trichuris muris* significantly affects the polarization of the CD4 response, *Eur J Immunol* *24*, 3113-8.
- Barbulescu, K., Becker, C., Schlaak, J. F., Schmitt, E., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Neurath, M. F. (1998). IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4⁺ T lymphocytes, *J Immunol* *160*, 3642-7.
- Baron, J. L., Madri, J. A., Ruddle, N. H., Hashim, G., and Janeway Jr, C. A. (1993). Surface expression of α 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma, *J Exp Med* *177*, 57-68.

Barry, E. (2000). Expression of mRNAs for the alpha 1 subunit of voltage-gated calcium channels in human osteoblast-like cell lines and in normal human osteoblasts., *Calcif Tissue Int* 66(2), 145-50.

Barry, E. L., Gesek, F. A., Yu, A. S., Lytton, J., and Friedman, P. A. (1998). Distinct calcium channel isoforms mediate parathyroid hormone and chlorothiazide-stimulated calcium entry in transporting epithelial cells, *J Membr Biol* 161, 55-64.

Bauer, B., Krumbock, N., Ghaffari-Tabrizi, N., Kampfer, S., Villunger, A., Wilda, M., Hameister, H., Utermann, G., Leitges, M., Uberall, F., and Baier, G. (2000). T cell expressed PKCtheta demonstrates cell-type selective function, *Eur J Immunol* 30, 3645-54.

Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P., and Crabtree, G. R. (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3, *Science* 275, 1930-4.

Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B, *Nature* 376, 167-70.

Bell, R. M., and Burns, D. J. (1991). Lipid activation of protein kinase C, *J Biol Chem* 266, 4661-4.

Bellacosa, A., Chan, T. O., Ahmed, N. N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., and Tsichlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain, *Oncogene* 17, 313-25.

Bendelac, A., Killeen, N., Littman, D. R., and Schwartz, R. H. (1994). A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules, *Science* 263, 1774.

Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H., and Roark, J. H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function, *Annu Rev Immunol* 15, 535-62.

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

Bonnechi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s, *J Exp Med* 187, 19-134.

Borges, E., Tietz, W., Steegmaier, M., Moll, T., Hallmann, R., Hamann, A., and Vestweber, D. (1997). P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin, *J Exp Med* 185, 573-8.

Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K., and Birnbaumer, L. (1999). Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5- trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14955-60.

Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., Barber, D. L., and Nadler, L. M. (1997). Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1, *Science* 278, 124-8.

Boutin, Y., Leitenberg, D., Tao, X., and Bottomly, K. (1997). Distinct biochemical signals characterize agonist- and altered peptide ligand-induced differentiation of naive CD4+ T cells into Th1 and Th2 subsets, *J Immunol* 159, 5802-5809.

Brdicka, T., Pavlistova, D., Leo, A., Bruyns, E., Korinek, V., Angelisova, P., Scherer, J., Shevchenko, A., Hilgert, I., Cerny, J., *et al.* (2000). Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation, *J Exp Med* 191, 1591-604.

Bretscher, P. A., Wei, G., Menon, J. N., and Bielefeldt-Ohmann, H. (1992). Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*, *Science* *257*, 539-42.

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*, 561-75.

Brysch, W., and Schlingensiepen, K.-H. (1994). Design and application of antisense oligonucleotides in cell culture, in vivo, and as therapeutic agents, *Cell Mol Neurobiol* *14*, 557-568.

Bulteau, L., Raymond, G., and Cognard, C. (1998). Antisense oligonucleotides against 'cardiac' and 'skeletal' DHP-receptors reveal a dual role for the 'skeletal' isoform in EC coupling of skeletal muscle cells in primary culture, *J Cell Sci* *111*, 2149-58.

Bunnell, S. C., Diehn, M., Yaffe, M. B., Findell, P. R., Cantley, L. C., and Berg, L. J. (2000). Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade, *J Biol Chem* *275*, 2219-30.

Burr, J. S., Savage, N. D., Messah, G. E., Kimzey, S. L., Shaw, A. S., Arch, R. H., and Green, J. M. (2001). Cutting edge: distinct motifs within cd28 regulate t cell proliferation and induction of bcl-x(l), *J Immunol* *166*, 5331-5.

Butcher, W. G., Powers, C., Olive, M., Vinson, C., and Gardner, K. (1998). Coordinate transactivation of the interleukin-2 CD28 response element by c-Rel and ATF-1/CREB2, *J Biol Chem* *273*, 552-60.

Cantrell, D. (1996). T cell antigen receptor signal transduction pathways, *Annu Rev Immunol* *14*, 259-74.

Cantrell, D. (1998). Lymphocyte signalling: a coordinating role for Vav?, *Curr Biol* 8, R535-8.

Caspi, R. R. (1986). T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAE) in the rat, *J Immunol* 136, 928-933.

Caspi, R. R., Chan, C.-C., Grubbs, B. G., Silver, P. B., Wiggert, B., Parsa, C. F., Bahmanyar, S., Billiau, A., and Heremans, H. (1994). Endogenous systemic IFN- γ has a protective effect against ocular autoimmunity in mice, *J Immunol* 152, 890-899.

Catterall, W. A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels, *Annu Rev Biochem* 64, 493-531.

Caulada-Benedetti, Z., al-Zamel, F., Sher, A., and James, S. (1991). Comparison of Th1- and Th2-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae, *J Immunol* 146, 1655-60.

Cautain, B., Damoiseaux, J., Bernard, I., Fournie, E., van Breda Vriesman, P., Druet, P., and Saoudi, A. (1999). Non-MHC determined resistance of Brown-Norway rats to develop experimental allergic encephalomyelitis is mediated by the endogenous production of transforming growth factor-beta, *Transplant Proc* 31, 1602-3.

Cautain, B., Damoiseaux, J., Bernard, I., van Straaten, H., van Breda Vriesman, P., Boneu, B., Druet, P., and Saoudi, A. (2001). Essential role of TGF-beta in the natural resistance to experimental allergic encephalomyelitis in rats, *Eur J Immunol* 31, 1132-40.

Cautain, B., Damoiseaux, J., Bernard, I., Xystrakis, E., Fournie, E., van Breda Vriesman, P., Druet, P., and Saoudi, A. (in revision). The CD8 T cell compartment plays a dominant role in the deficiency of Brown-Norway rats to mount a proper type-1 immune response., *J Immunol*.

Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization, *Nat Immunol* 1, 305-10.

Chambers, C. A. (2001). The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited, *Trends Immunol* 22, 217-23.

Chand, N., Diamantis, W., Mahoney, T. P., and Sofia, R. D. (1988). Allergic responses and subsequent development of airway hyperreactivity to cold provocation in the rat trachea: pharmacological modulation, *Eur J Pharmacol* 150, 95-101.

Chensue, S. W., Warmington, K. S., Lukacs, N. W., Lincoln, P. M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., and Kunkel, S. L. (1995). Monocyte chemotactic protein expression during schistosome egg granuloma formation. Sequence of production, localization, contribution, and regulation, *Am J Pathol* 146, 130-8.

Chow, C. W., Rincon, M., Cavanagh, J., Dickens, M., and Davis, R. J. (1997). Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway, *Science* 278, 1638-41.

Civil, A., Geerts, M., Aarden, L. A., and Verweij, C. L. (1992). Evidence for a role of CD28RE as a response element for distinct mitogenic T cell activation signals, *Eur J Immunol* 22, 3041-3.

Cloutier, J. F., and Veillette, A. (1996). Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells, *Embo J* 15, 4909-18.

Cloutier, J. F., and Veillette, A. (1999). Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase, *J Exp Med* 189, 111-21.

Coblyn, J. S., Weinblatt, M., Holdsworth, D., and Glass, D. (1981). Gold-induced thrombocytopenia. A clinical and immunogenetic study of twenty-three patients, *Ann Intern Med* 95, 178-81.

Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T., and Bottomly, K. (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells, *J Exp Med* *182*, 1591-6.

Constant, S. L., and Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches., *Annu Rev Immunol* *15*, 297-322.

Cookson, W. (2003). A new gene for asthma: would you ADAM and Eve it?, *Trends Genet* *19*, 169-72.

Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J. S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway, *Cell* *81*, 1137-46.

Coyle, A. J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J. A., *et al.* (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell- dependent immune responses, *Immunity* *13*, 95-105.

Coyle, A. J., Lloyd, C., Tian, J., Nguyen, T., Eriksson, C., Wang, L., Ottoson, P., Persson, P., Delaney, T., Lehar, S., *et al.* (1999). Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses, *J Exp Med* *190*, 895-902.

Crooks, M. E., Littman, D. R., Carter, R. H., Fearon, D. T., Weiss, A., and Stein, P. H. (1995). CD28-mediated costimulation in the absence of phosphatidylinositol 3- kinase association and activation, *Mol Cell Biol* *15*, 6820-8.

Cua, D. J., Hinton, D. R., and Stohlman, S. A. (1995). Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice, *J Immunol* *155*, 4052-4059.

D'Ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells, *J Immunol* *161*, 5111-5.

D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M., and Trinchieri, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon γ -production by suppressing natural killer stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells, *J Exp Med* *178*, 1041-1048.

D'Brot, J., Abraham, W. M., and Ahmed, T. (1989). Effect of calcium antagonist gallopamil on antigen-induced early and late bronchoconstrictor responses in allergic sheep, *Am Rev Respir Dis* *139*, 915-20.

Dahl, A. M., Klein, C., Andres, P. G., London, C. A., Lodge, M. P., Mulligan, R. C., and Abbas, A. K. (2000). Expression of bcl-X(L) restores cell survival, but not proliferation of effector differentiation, in CD28-deficient T lymphocytes, *J Exp Med* *191*, 2031-8.

Damoiseaux, J. G., Cautain, B., Bernard, I., Mas, M., van Breda Vriesman, P. J., Druet, P., Fournie, G., and Saoudi, A. (1999). A dominant role for the thymus and MHC genes in determining the peripheral CD4/CD8 T cell ratio in the rat., *J Immunol* *163*, 2983-2989.

Das, J., Chen, C. H., Yang, L., Cohn, L., Ray, P., and Ray, A. (2001). A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation, *Nat Immunol* *2*, 45-50.

Davies, D. E., Wicks, J., Powell, R. M., Puddicombe, S. M., and Holgate, S. T. (2003). Airway remodeling in asthma: new insights, *J Allergy Clin Immunol* *111*, 215-25; quiz 226.

Davignon, D., Martz, E., Reynolds, T., Kurzinger, K., and Springer, T. A. (1981). Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): mechanism of blockade of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions, *J Immunol* *127*, 590-5.

Davis, P., Ezeoke, A., Munro, J., Hobbs, J. R., and Hughes, G. R. (1973). Immunological studies on the mechanism of gold hypersensitivity reactions, *Br Med J* *3*, L7L-8.

Davis-Taber, R., Choi, W., Feng, J., Hoogenboom, L., McNally, T., Kroeger, P., Shieh, C. C., Simmer, R., Brioni, J. D., Sullivan, J. P., *et al.* (2000). Molecular characterization of human SUR2-containing K(ATP) channels, *Gene* 256, 261-70.

de Poorter, L. M., and Keltjens, J. T. (2001). Convenient fluorescence-based methods to measure membrane potential and intracellular pH in the Archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *J Microbiol Methods* 47, 233-41.

Del Prete, G., De Carli, M., Ricci, M., and Romagnani, S. (1991). Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity., *J Exp Med* 174, 809-813.

Denny, M. F., Kaufman, H. C., Chan, A. C., and Straus, D. B. (1999). The lck 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.

Dent, A. L., Hu-Li, J., Paul, W. E., and Staudt, L. M. (1998). T helper type 2 inflammatory disease in the absence of interleukin 4 and transcription factor STAT6, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13823-8.

Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., and Staudt, L. M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6, *Science* 276, 589-92.

Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I. H., Han, J., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms, *Science* 267, 682-5.

DeSilva, D. R., Urdahl, K. B., and Jenkins, M. K. (1991). Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation, *J Immunol* 147, 3261-7.

Di Bartolo, V., Mege, D., Germain, V., Pelosi, M., Dufour, E., Michel, F., Magistrelli, G., Isacchi, A., and Acuto, O. (1999). Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling, *J Biol Chem* 274, 6285-94.

Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., and Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration., *Nature* 386, 855-8.

Dolmetsch, R. E., Xu, K., and Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression, *Nature* 392, 933-936.

Dong, C., Juedes, A. E., Temann, U. A., Shresta, S., Allison, J. P., Ruddle, N. H., and Flavell, R. A. (2001a). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function, *Nature* 409, 97-101.

Dong, C., Temann, U. A., and Flavell, R. A. (2001b). Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions, *J Immunol* 166, 3659-62.

Dong, C., Yang, D. D., Wysk, M., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1998). Defective T cell differentiation in the absence of jnk1., *Science* 282, 2092-2095.

Druet, E., Praddaude, F., Druet, P., and Dietrich, G. (1998). Non-immunoglobulin serum proteins prevent the binding of IgG from normal rats and from rats with Th2-mediated autoimmune glomerulonephritis to various autoantigens including glomerular antigens., *Eur J Immunol* 28, 183-192.

Druet, P., Druet, E., Potdevin, F., and Sapin, C. (1978). Immune type glomerulonephritis induced by HgCl₂ in the Brown Norway rat, *Ann Immunol (Inst Pasteur)* 129C, 777-792.

Druet, P., Sheela, R., and Pelletier, L. (1996). TH1 and TH2 lymphocytes in autoimmunity., *Adv Nephrol* 25, 217-241.

Dubey, C., Bellon, B., Hirsch, F., Kuhn, J., Vial, M.-C., Goldman, M., and Druet, P. (1991). Increased expression of class II major histocompatibility complex molecules on B cells in rats susceptible or resistant to HgCl₂-induced autoimmunity, *Clin Exp Immunol* 86, 118-125.

Dumont, F. J., Staruch, M. J., Fischer, P., DaSilva, C., and Camacho, R. (1998). Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production, *J Immunol* *160*, 2579-89.

Dustin, M. L., and Cooper, J. A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling, *Nat Immunol* *1*, 23-9.

Dustin, M. L., and Springer, T. A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1, *Nature* *341*, 619-24.

Egerton, M., Fitzpatrick, D. R., Catling, A. D., and Kelso, A. (1996). Differential activation of T cell cytokine production by the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway, *Eur J Immunol* *26*, 2279-85.

Elwood, W., Lotvall, J. O., Barnes, P. J., and Chung, K. F. (1991). Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized brown-Norway rats, *J Allergy Clin Immunol* *88*, 951-60.

Evavold, B. D., and Allen, P. M. (1991). Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand, *Science* *252*, 1308-1310.

Fanger, C. M., Neben, A. L., and Cahalan, M. D. (2000). Differential Ca²⁺ influx, KCa channel activity, and Ca²⁺ clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes, *J Immunol* *164*, 1153-60.

Ferber, I. A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C. G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), *J Immunol* *156*, 5-7.

Feske, S., Giltman, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M., and Rao, A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes, *Nat Immunol* *2*, 316-24.

Fill, M., and Copello, J. A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels, *Physiol Rev* 82, 893-922.

Fillastre, J. P., Druet, P., and Mery, J. P. (1988). Proteinuric nephropathies associated with drugs and substances of abuse. In *The nephrotic syndrome*, J. S. Cameron, and R. J. Glasscock, eds. (New York, Marcel Dekker), pp. 697-744.

Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E., and Weiss, A. (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLC γ 1 and the Ras pathway, *Immunity* 9, 617-26.

Finkelman, F. D., Morris, S. C., Orekhova, T., Mori, M., Donaldson, D., Reiner, S. L., Reilly, N. L., Schopf, L., and Urban, J. F., Jr. (2000). Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses, *J Immunol* 164, 2303-10.

Fitch, F. W., McKisic, M. D., Lancki, D. W., and Gajewski, T. F. (1993). Differential regulation of murine T lymphocyte subsets, *Annu Rev Immunol* 11, 29-48.

Flanagan, W. M., Corthesy, B., Bram, R. J., and Crabtree, G. R. (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A, *Nature* 352, 803-7.

Fleming, I., MacKenzie, S. J., Vernon, R. G., Anderson, N. G., Houslay, M. D., and Kilgour, E. (1998). Protein kinase C isoforms play differential roles in the regulation of adipocyte differentiation, *Biochem J* 333, 719-27.

Fournie, G. J., Cautain, B., Xystrakis, E., Damoiseaux, J., Mas, M., Lagrange, D., Bernard, I., Subra, J. F., Pelletier, L., Druet, P., and Saoudi, A. (2001). Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases, *Immunol Rev* 184, 145-60.

Fowell, D., McKnight, A. J., Powrie, F., Dyke, R., and Mason, D. (1991). Subsets of CD4⁺ T cells and their role in the induction and prevention of autoimmunity, *Immunol Rev* 123, 37-64.

Fowell, D. J., Shinkai, K., Liao, X. C., Beebe, A. M., Coffman, R. L., Littman, D. R., and Locksley, R. M. (1999). Impaired NFATc translocation and failure of Th2 development in Itk-deficient CD4+ T cells, *Immunity* *11*, 399-409.

Fraser, J. D., Irving, B. A., Crabtree, G. R., and Weiss, A. (1991). Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28, *Science (Wash DC)* *251*, 313.

Fraser, J. D., Straus, D., and Weiss, A. (1993). Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression, *Immunol Today* *14*, 357-362.

Freeman, G. J., Borriello, F., Hodes, R. J., Reiser, H., Gribben, J. G., Ng, J. W., Kim, J., Goldberg, J. M., Hathcock, K., Laszlo, G., *et al.* (1993a). Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production, *J Exp Med* *178*, 2185-2192.

Freeman, G. J., Borriello, F., Hodes, R. J., Reiser, H., Hathcock, K. S., Laszlo, G., McKnight, A. J., Kim, J., Du, L., Lombard, D. B., and *et al.* (1993b). Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7- deficient mice, *Science* *262*, 907-9.

Fruman, D. A., Snapper, S. B., Yballe, C. M., Davidson, L., Yu, J. Y., Alt, F. W., and Cantley, L. C. (1999). Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha, *Science* *283*, 393-7.

Gajewski, T. F., Lancki, D. W., Stack, R., and Fitch, F. W. (1994). "Anergy" of T_H0 helper T lymphocytes induces downregulation of T_H1 characteristics and a transition to a T_H2-like phenotype, *J Exp Med* *179*, 481-91.

Gajewski, T. F., Schell, S. R., and Fitch, F. W. (1990). Evidence implicating utilization of different T cell receptor-associated signaling pathways by TH1 and TH2 clones, *J Immunol* *144*, 4110-20.

Galli, S. J. (1993). New concepts about the mast cell, *N Engl J Med* *328*, 257-65.

Germain, R. N., and Stefanova, I. (1999). The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation, *Annu Rev Immunol* *17*, 467-522.

Gillespie, K. M., Qasim, F. J., Tibbats, L. M., Thiru, S., Oliveira, D. B. G., and Mathieson, P. W. (1995). Interleukin-4 gene expression in mercury-induced autoimmunity, *Scand J Immunol* *41*, 268-272.

Gillespie, K. M., Saoudi, A., Kuhn, J., Whittle, C. J., Druet, P., Bellon, B., and Mathieson, P. W. (1996). Th1/Th2 cytokine gene expression after mercuric chloride in susceptible and resistant rat strains, *Eur J Immunol* *10*, 2388-2392.

Girvin, A. M., Dal Canto, M. C., Rhee, L., Salomon, B., Sharpe, A., Bluestone, J. A., and Miller, S. D. (2000). A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule- deficient mice and monoclonal antibody blockade, *J Immunol* *164*, 136-43.

Glimcher, L. H., and Murphy, K. M. (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up, *Genes Dev* *14*, 1693-711.

Goldman, M., and Druet, P. (1995). The TH1/TH2 concept and its relevance to renal disorders and transplantation immunity, *Nephrol Dial Transplant* *10*, 1282-4.

Gong, Q., Cheng, A. M., Akk, A. M., Alberola-Ila, J., Gong, G., Pawson, T., and Chan, A. C. (2001). Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency, *Nat Immunol* *2*, 29-36.

Gonzalo, J. A., Lloyd, C. M., Wen, D., Albar, J. P., Wells, T. N., Proudfoot, A., Martinez, A. C., Dorf, M., Bjerke, T., Coyle, A. J., and Gutierrez-Ramos, J. C. (1998). The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness, *J Exp Med* *188*, 157-67.

Gor, D. O., Rose, N. R., and Greenspan, N. S. (2003). TH1-TH2: a procrustean paradigm, *Nat Immunol* *4*, 503-5.

Gourley, T., Roys, S., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., Flavell, R. A., and Chang, C. H. (1999). A novel role for the major histocompatibility complex class II transactivator CIITA in the repression of IL-4 production, *Immunity* *10*, 377-86.

Grafton, G., and Thwaite, L. (2001). Calcium channels in lymphocytes, *Immunology* *104*, 119-26.

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*, 221-7.

Green, J. M., Noel, P. J., Sperling, A. I., Walunas, T. L., Gray, G. S., Bluestone, J. A., and Thompson, C. B. (1994). Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice, *Immunity* *1*, 501-508.

Gudmundsdottir, H., Wells, A. D., and Turka, L. A. (1999). Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity, *J Immunol* *162*, 5212-23.

Guéry, J. C., Galbiati, F., Smiroldo, S., and Adorini, L. (1996). Selective development of T helper (Th)₂ cells induced by continuous administration of low dose soluble proteins to normal and β 2-microglobulin-deficient BALB/c mice, *J Exp Med* *183*, 485-497.

Güler, M. L., Gorham, J. D., Hsieh, C.-S., Mackey, A. J., Steen, R. G., Dietrich, W. F., and Murphy, K. M. (1996). Genetic susceptibility to Leishmania: IL-12 responsiveness in T_H1 cell development, *Science* *271*, 984-987.

Guler, M. L., Jacobson, N. G., Gubler, U., and Murphy, K. M. (1997). T cell genetic background determines maintenance of IL-12 signaling: effects on BALB/c and B10.D2 T helper cell type 1 phenotype development, *J Immunol* *159*, 1767-74.

Guo, L., Hu-Li, J., Zhu, J., Pannetier, C., Watson, C., McKenzie, G. J., McKenzie, A. N., and Paul, W. E. (2001). Disrupting Il13 impairs production of IL-4 specified by the linked allele, *Nat Immunol* 2, 461-6.

Gurnett, C. A., and Campbell, K. P. (1996). Transmembrane auxiliary subunits of voltage-dependent ion channels, *J Biol Chem* 271, 27975-8.

Guse, A. H. (1998). Ca²⁺ signaling in T-lymphocytes, *Crit Rev Immunol* 18, 419-48.

Han, J., Das, B., Wei, W., Van Aelst, L., Mosteller, R. D., Khosravi-Far, R., Westwick, J. K., Der, C. J., and Broek, D. (1997). Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases, *Mol Cell Biol* 17, 1346-53.

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, 558-60.

Harada, Y., Tanabe, E., Watanabe, R., Weiss, B. D., Matsumoto, A., Ariga, H., Koiwai, O., Fukui, Y., Kubo, M., June, C. H., and Abe, R. (2001). Novel role of phosphatidylinositol 3-kinase in CD28-mediated costimulation, *J Biol Chem* 276, 9003-8.

Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L., and Locksley, R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine Leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets, *J Exp Med* 169, 59.

Helton, T. D., Kojetin, D. J., Cavanagh, J., and Horne, W. A. (2002). Alternative splicing of a beta4 subunit proline-rich motif regulates voltage-dependent gating and toxin block of Cav2.1 Ca²⁺ channels, *J Neurosci* 22, 9331-9.

Hill, C. S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF, *Cell* 81, 1159-70.

Hirota, K., Hashiba, E., Yoshioka, H., Kabara, S., and Matsuki, A. (2003). Effects of three different L-type Ca²⁺ entry blockers on airway constriction induced by muscarinic receptor stimulation, *Br J Anaesth* *90*, 671-5.

Hirsch, F., Couderc, J., Sapin, C., Fournie, G., and Druet, P. (1982). Polyclonal effect of HgCl₂ in the rat, its possible role in an experimental autoimmune disease, *Eur J Immunol* *12*, 620-625.

Ho, I. C., Hodge, M. R., Rooney, J. W., and Glimcher, L. H. (1996). The proto-oncogene *c-maf* is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4., *Cell* *85*, 973-983.

Ho, I. C., Lo, D., and Glimcher, L. H. (1998). *c-maf* promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms., *J Exp Med* *188*, 1859-66.

Ho, I. C., Vorhees, P., Marin, N., Oakley, B. K., Tsai, S. F., Orkin, S. H., and Leiden, J. M. (1991). Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene, *Embo J* *10*, 1187-92.

Hodge, M. R., Ranger, A. M., Charles de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M. J., and Glimcher, L. H. (1996). Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice., *Immunity* *4*, 397-405.

Hoey, T., Sun, Y. L., Williamson, K., and Xu, X. (1995). Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins, *Immunity* *2*, 461-72.

Holgate, S. T. (1999a). The epidemic of allergy and asthma, *Nature* *402*, B2-4.

Holgate, S. T. (1999b). Genetic and environmental interaction in allergy and asthma, *J Allergy Clin Immunol* *104*, 1139-46.

Hoshino, K., Kashiwamura, S., Kuribayashi, K., Kodama, T., Tsujimura, T., Nakanishi, K., Matsuyama, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). The absence of interleukin 1 receptor-

related T1/ST2 does not affect T helper cell type 2 development and its effector function, *J Exp Med* 190, 1541-8.

Hosken, N. A., Shibuya, K., Heath, A. W., Murphy, K. M., and O'Garra, A. (1995). The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model, *J Exp Med* 182, 1579-84.

House, C., and Kemp, B. E. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain, *Science* 238, 1726-8.

Howard, J. G. (1986). Immunological regulation and control of experimental leishmaniasis, *Int Rev Exp Pathol* 28, 79-116.

Hsieh, C.-S., Heimberger, A. B., Gold, J. S., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1992). Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an $\alpha\beta$ T-cell-receptor transgenic system, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6065-6069.

Hsieh, C.-S., Macatonia, S. E., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1995). T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro, *J Exp Med* 181, 713-721.

Hsieh, C.-S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of T_H1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages, *Science* 260, 547-549.

Huang, C., Ma, W., and Dong, Z. (1997). Signal transduction through atypical PKCs, but not the EGF receptor, is necessary for UVC-induced AP-1 activation in immortal murine cells, *Oncogene* 14, 1945-54.

Hutchcroft, J. E., and Bierer, B. E. (1996). Signaling through CD28/CTLA-4 family receptors: puzzling participation of phosphatidylinositol-3 kinase, *J Immunol* 156, 4071-4.

Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28, *Nature* 397, 263-6.

Ichiba, T., Kuraishi, Y., Sakai, O., Nagata, S., Groffen, J., Kurata, T., Hattori, S., and Matsuda, M. (1997). Enhancement of guanine-nucleotide exchange activity of C3G for Rap1 by the expression of Crk, CrkL, and Grb2, *J Biol Chem* 272, 22215-20.

Ip, Y. T., and Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development, *Curr Opin Cell Biol* 10, 205-19.

Irvine, R. F. (1990). 'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism, *FEBS Lett* 263, 5-9.

Isakov, N., and Altman, A. (2002). Protein kinase C(theta) in T cell activation, *Annu Rev Immunol* 20, 761-94.

Ishii, H., Jirousek, M. R., Koya, D., Takagi, C., Xia, P., Clermont, A., Bursell, S. E., Kern, T. S., Ballas, L. M., Heath, W. F., *et al.* (1996). Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor, *Science* 272, 728-31.

Ishikawa, H., Claudio, E., Dambach, D., Raventos-Suarez, C., Ryan, C., and Bravo, R. (1998). Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50, *J Exp Med* 187, 985-96.

Isom, L. L., De Jongh, K. S., and Catterall, W. A. (1994). Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels, *Neuron* 12, 1183-94.

Izquierdo, M., Bowden, S., and Cantrell, D. (1994). The role of Raf-1 in the regulation of extracellular signal-regulated kinase 2 by the T cell antigen receptor., *J Exp Med* 180, 401-406.

Jacobson, N. G., Szabo, S. J., Güler, M. L., Gorham, J. D., and Murphy, K. M. (1995a). Regulation of interleukin-12 signal transduction during T helper phenotype development, *Res Immunol* *146*, 446-456.

Jacobson, N. G., Szabo, S. J., Weber-Nordt, R. M., Zhong, Z., Schreiber, R. D., Darnell, J. E. J., and Murphy, K. M. (1995b). Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4., *J Exp Med* *181*, 1755-1762.

Jankovic, D., Kullberg, M. C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Paul, W. E., and Sher, A. (2000). Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile, *J Immunol* *164*, 3047-55.

Jenkins, M. K., Pardoll, D. M., Mizuguchi, J., Quill, H., and Schwartz, R. H. (1987). T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of unresponsive state, *Immunol Rev* *95*, 113-135.

Jensen, W. A., Pleiman, C. M., Beaufils, P., Wegener, A. M., Malissen, B., and Cambier, J. C. (1997). Qualitatively distinct signaling through T cell antigen receptor subunits, *Eur J Immunol* *27*, 707-16.

Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Plataniias, L. C., and Yi, T. (1996). Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2- domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1, *Mol Cell Biol* *16*, 6985-92.

Julia, V., Rassoulzadegan, M., and Glaichenhaus, N. (1996). Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen, *Science* *274*, 421-3.

Kamogawa, Y., Minasi, L.-a., Carding, S. R., Bottomly, K., and Flavell, R. A. (1993). The relationship of IL-4 and IFN γ -producing T cells studied by lineage ablation of IL-4 producing cells, *Cell* *75*, 985-95.

Kamp, T. J., and Hell, J. W. (2000). Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C, *Circ Res* 87, 1095-102.

Kane, L. P., Andres, P. G., Howland, K. C., Abbas, A. K., and Weiss, A. (2001). Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines, *Nat Immunol* 2, 37-44.

Kang, S. M., Tran, A. C., Grilli, M., and Lenardo, M. J. (1992). NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes, *Science* 256, 1452-6.

Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., and Grusby, M. J. (1996a). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells, *Immunity* 4, 313-9.

Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T., and Grusby, M. J. (1996b). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice, *Nature* 382, 174-7.

Karpus, W. J., Kennedy, K. J., Kunkel, S. L., and Lukacs, N. W. (1998). Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1-related cytokines, *J Exp Med* 187, 733-41.

Karpus, W. J., Lukacs, N. W., Kennedy, K. J., Smith, W. S., Hurst, S. D., and Barrett, T. A. (1997). Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production, *J Immunol* 158, 4129-36.

Kashiwakura, J., Suzuki, N., Nagafuchi, H., Takeno, M., Takeba, Y., Shimoyama, Y., and Sakane, T. (1999). Txk, a nonreceptor tyrosine kinase of the Tec family, is expressed in T helper type 1 cells and regulates interferon gamma production in human T lymphocytes, *J Exp Med* 190, 1147-54.

Kawabuchi, M., Satomi, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Nada, S., Nagai, K., Tarakhovsky, A., and Okada, M. (2000). Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases, *Nature* 404, 999-1003.

Kero, J., Gissler, M., Hemminki, E., and Isolauri, E. (2001). Could TH1 and TH2 diseases coexist? Evaluation of asthma incidence in children with coeliac disease, type 1 diabetes, or rheumatoid arthritis: a register study, *J Allergy Clin Immunol* 108, 781-3.

Kersh, E. N., Shaw, A. S., and Allen, P. M. (1998). Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation, *Science* 281, 572-5.

Khoury, S. J., Hancock, W. W., and Weiner, H. L. (1992). Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor β , interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain, *J Exp Med* 176, 1355-64.

Kiani, A., Viola, J. P., Lichtman, A. H., and Rao, A. (1997). Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1, *Immunity* 7, 849-60.

Kiely, P. D. W., Thiru, S., and Oliveira, D. B. G. (1995). Inflammatory polyarthritis induced by mercuric chloride in the Brown Norway rat, *Lab Invest* 73, 284-93.

Kim, J. I., Ho, I. C., Grusby, M. J., and Glimcher, L. H. (1999). The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines, *Immunity* 10, 745-51.

Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L., and Muallem, S. (1998). Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels, *Nature* 396, 478-82.

Kivity, S., Brayer, M., and Topilsky, M. (1992). Combined effect of nifedipine and diltiazem on methacholine-induced bronchoconstriction in asthmatic patients, *Ann Allergy* 68, 175-9.

Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., and Schuler, G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via

MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10, *J Exp Med* 184, 741-6.

Koizumi, S., Lipp, P., Berridge, M. J., and Bootman, M. D. (1999). Regulation of ryanodine receptor opening by luminal Ca(2+) underlies quantal Ca(2+) release in PC12 cells, *J Biol Chem* 274, 33327-33.

Kopf, M., Brombacher, F., Hodgkin, P. D., Ramsay, A. J., Milbourne, E. A., Dai, W. J., Ovington, K. S., Behm, C. A., Kohler, G., Young, I. G., and Matthaei, K. I. (1996). IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses, *Immunity* 4, 15-24.

Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses, *Nature* 362, 245-8.

Kopp, E. B., and Ghosh, S. (1995). NF-kappa B and rel proteins in innate immunity, *Adv Immunol* 58, 1-27.

Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J., and Striessnig, J. (2001). alpha 1D (Cav1.3) subunits can form l-type Ca2+ channels activating at negative voltages, *J Biol Chem* 276, 22100-6.

Kramer, R. H., and Molokanova, E. (2001). Modulation of cyclic-nucleotide-gated channels and regulation of vertebrate phototransduction., *J Exp Biol* 204, 2921-31.

Kubo, M., Ransom, J., Webb, D., Hashimoto, Y., Tada, T., and Nakayama, T. (1997). T-cell subset-specific expression of the IL-4 gene is regulated by a silencer element and STAT6, *EMBO J* 16, 4007-20.

Kubo, R. T., Born, W., Kappler, J. W., Marrack, P., and Pigeon, M. (1989). Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine $\alpha\beta$ T cell receptors, *J immunol* 142, 2736-42.

Kuchroo, V. K., Prabhu, M. P., Brown, J. A., Ranger, A. M., Zamvill, S. S., Sobel, R. A., Weiner, H. L., Nabavi, N., and Glimcher, L. H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy, *Cell* 80, 707-18.

Kuhn, R., Rajewsky, K., and Muller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice, *Science* 254, 707-10.

Kundig, T. M., Shahinian, A., Kawai, K., Mittrucker, H. W., Sebзда, E., Bachmann, M. F., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. (1996). Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells, *Immunity* 5, 41-52.

Kusakawa, S., and Heiner, D. C. (1976). Elevated levels of immunoglobulins E in the acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome, *Pediatr Res* 10, 108-11.

Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., and Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase, *Nature* 358, 417-21.

Lafaille, J. J., Van de Keere, F., Hsu, A. L., Baron, J. L., Haas, W., Raine, C. S., and Tonegawa, S. (1997). Myelin Basic Protein-specific T Helper (Th2) Cells Cause Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Immunodeficient Hosts Rather Than Protect them from the Disease, *JExpMed* 186, 307-312.

Lam-Tse, W. K., Lernmark, A., Drexhage, H. A. (2002). Animal models of endocrine/organ-specific autoimmune diseases: do they really help us to understand human autoimmunity ? *Springer Semin Immunopathol* 24, 297-321.

Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells, *Nat Immunol* 1, 311-6.

Launois, P., Maillard, I., Pingel, S., Swihart, K. G., Xenarios, I., Acha-Orbea, H., Diggelmann, H., Locksley, R. M., MacDonald, H. R., and Louis, J. A. (1997). IL-4 rapidly

produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice, *Immunity* 6, 541-9.

Law, C. L., Ewings, M. K., Chaudhary, P. M., Solow, S. A., Yun, T. J., Marshall, A. J., Hood, L., and Clark, E. A. (1999). GrpL, a Grb2-related adaptor protein, interacts with SLP-76 to regulate nuclear factor of activated T cell activation, *J Exp Med* 189, 1243-53.

Lederer, J. A., Perez, V. L., Des Roches, L., Kim, S. M., Abbas, A. K., and Lichtman, A. H. (1996). Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation, *J Exp Med* 184, 397-406.

Lee, G. R., Fields, P. E., and Flavell, R. A. (2001). Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level, *Immunity* 14, 447-59.

Lee, H. J., O'Garra, A., Arai, K., and Arai, N. (1998). Characterization of cis-regulatory elements and nuclear factors conferring Th2-specific expression of the IL-5 gene: a role for a GATA-binding protein, *J Immunol* 160, 2343-52.

Lenschow, D. J., Ho, S. C., Sattar, H., Rhee, L., Gray, G., Nabavi, N., Herold, K. C., and Bluestone, J. A. (1995). Differential effects of anti-B7.1 and anti-B7.2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse, *J Exp Med* 181, 1145-55.

Letourneur, F., and Klausner, R. D. (1992). Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 ϵ , *Science* 255, 79-82.

Lewis, R. S. (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes, *Annu Rev Immunol* 19, 497-521.

Li, B., Tournier, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1999). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation, *EMBO J* 18, 420-32.

Liblau, R. S., Singer, S. M., and McDevitt, H. O. (1995). Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases, *Immunol Today* *16*, 34-8.

Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F. X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G. L., and Karin, M. (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2, *Science* *268*, 286-90.

Liu, K. Q., Bunnell, S. C., Gurniak, C. B., and Berg, L. J. (1998). T cell receptor-initiated calcium release is uncoupled from capacitative calcium entry in Itk-deficient T cells, *J Exp Med* *187*, 1721-7.

Liu, S. K., Fang, N., Koretzky, G. A., and McGlade, C. J. (1999). The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors, *Curr Biol* *9*, 67-75.

Locksley, R. M., and Scott, P. (1991). Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function, *Immunol Today* *12*, A58-61.

Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., and Dayer, J. M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes, *Nature* *391*, 344-5.

Lohning, M., Stroehmann, A., Coyle, A. J., Grogan, J. L., Lin, S., Gutierrez-Ramos, J. C., Levinson, D., Radbruch, A., and Kamradt, T. (1998). T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function, *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6930-5.

Lu, B., Rutledge, B. J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., North, R., Gerard, C., and Rollins, B. J. (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice, *J Exp Med* *187*, 601-8.

Lu, H. T., Yang, D. D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1999). Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice, *Embo J* *18*, 1845-57.

Lu, P., Zhou, X., Chen, S. J., Moorman, M., Morris, S. C., Finkelman, F. D., Linsley, P., Urban, J. F., and Gause, W. C. (1994). CTLA-4 ligands are required to induce an in vivo interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite, *J Exp Med* 180, 693-8.

Lupher, M. L., Jr., Rao, N., Lill, N. L., Andoniou, C. E., Miyake, S., Clark, E. A., Druker, B., and Band, H. (1998). Cbl-mediated negative regulation of the Syk tyrosine kinase. A critical role for Cbl phosphotyrosine-binding domain binding to Syk phosphotyrosine 323, *J Biol Chem* 273, 35273-81.

Lupher, M. L., Jr., Reedquist, K. A., Miyake, S., Langdon, W. Y., and Band, H. (1996). A novel phosphotyrosine-binding domain in the N-terminal transforming region of Cbl interacts directly and selectively with ZAP-70 in T cells, *J Biol Chem* 271, 24063-8.

Lupher, M. L., Jr., Songyang, Z., Shoelson, S. E., Cantley, L. C., and Band, H. (1997). The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70, *J Biol Chem* 272, 33140-4.

Ma, H. T., Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K., and Gill, D. L. (2000). Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels, *Science* 287, 1647-51.

Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M., and O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells, *J Immunol* 154, 5071-9.

Mackay, K., and Mochly-Rosen, D. (2001). Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart, *J Mol Cell Cardiol* 33, 1301-7.

Mackenzie, S., Fleming, I., Houslay, M. D., Anderson, N. G., and Kilgour, E. (1997). Growth hormone and phorbol esters require specific protein kinase C isoforms to activate mitogen-activated protein kinases in 3T3-F442A cells, *Biochem J* 324, 159-65.

Madrenas, J., Wange, R. L., Wang, J. L., Isakov, N., Samelson, L. E., and Germain, R. N. (1995). Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists, *Science* 267, 459-60.

Magram, J., Connaughton, S. E., Warriar, R. R., Carvajal, D. M., Wu, C. Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D. A., and Gately, M. K. (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses, *Immunity* 4, 471-81.

Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. (1999). CD8alpha+ and CD8alpha-subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo, *J Exp Med* 189, 587-92.

Malherbe, L., Filippi, C., Julia, V., Foucras, G., Moro, M., Appel, H., Wucherpfennig, K., Guery, J. C., and Glaichenhaus, N. (2000). Selective activation and expansion of high-affinity CD4+ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*, *Immunity* 13, 771-82.

Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain, *Cell* 73, 381-93.

Mas, M., Subra, J. F., Lagrange, D., Pilipenko-Appolinaire, S., Kermarrec, N., Gauguier, D., Druet, P., and Fournie, G. J. (2000). Rat chromosome 9 bears a major susceptibility locus for IgE response, *Eur J Immunol* 30, 1698-705.

Mason, D. (1991). Genetic variation in the stress response: susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and implications for human inflammatory disease, *Immunol Today* 12, 57-60.

Masuda, E. S., Naito, Y., Tokumitsu, H., Campbell, D., Saito, F., Hannum, C., Arai, K., and Arai, N. (1995). NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus, *Mol Cell Biol* 15, 2697-706.

McAdam, A. J., Chang, T. T., Lumelsky, A. E., Greenfield, E. A., Boussiotis, V. A., Duke-Cohan, J. S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V. K., *et al.* (2000). Mouse

inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells, *J Immunol* 165, 5035-40.

McAdam, A. J., Greenwald, R. J., Levin, M. A., Chernova, T., Malenkovich, N., Ling, V., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2001). ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching, *Nature* 409, 102-5.

McCaffrey, P. G., Luo, C., Kerppola, T. K., Jain, J., Badalian, T. M., Ho, A. M., Burgeon, E., Lane, W. S., Lambert, J. N., Curran, T., *et al.* (1993). Isolation of the cyclosporine-sensitive T cell transcription factor NFATp, *Science* 262, 750-4.

McGuire, K. L., and Iacobelli, M. (1997). Involvement of Rel, Fos, and Jun proteins in binding activity to the IL-2 promoter CD28 response element/AP-1 sequence in human T cells, *J Immunol* 159, 1319-27.

McKenzie, A. N. J., Culpepper, J. A., de Waal Maleyft, R., Brière, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B. G., Menon, S., *et al.* (1993). Interleukin-13, a novel T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B cell function, *Proc Natl Acad Sci (USA)* 90, 3735.

McKenzie, G. J., Emson, C. L., Bell, S. E., Anderson, S., Fallon, P., Zurawski, G., Murray, R., Grecis, R., and McKenzie, A. N. (1998). Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice, *Immunity* 9, 423-32.

McKnight, A. J., Barclay, A. N., and Mason, D. W. (1991). Molecular cloning of rat interleukine 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire of subsets of CD4⁺ T cells, *Eur J Immunol* 21, 1187-94.

McMenamin, C., and Holt, P. G. (1993). The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8⁺ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4⁺T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production, *J Exp Med* 178, 889-99.

- Mege, D., Di Bartolo, V., Germain, V., Tuosto, L., Michel, F., and Acuto, O. (1996). Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways, *J Biol Chem* 271, 32644-52.
- Meir, A., and Dolphin, A. C. (1998). Known calcium channel alpha1 subunits can form low threshold small conductance channels with similarities to native T-type channels, *Neuron* 20, 341-51.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F. X., Abo, A., and Karin, M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs, *Cell* 81, 1147-57.
- Mochly-Rosen, D., and Gordon, A. S. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity, *Faseb J* 12, 35-42.
- Mochly-Rosen, D., and Kauvar, L. M. (2000). Pharmacologic regulation of network kinetics by protein kinase C localization, *Semin Immunol* 12, 55-61.
- 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., and et al. (1992). Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck, *Nature* 357, 161-4.
- Monks, C. R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., and Kupfer, A. (1997). Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation, *Nature* 385, 83-6.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989a). Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells, *Adv Immunol* 46, 111-47.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989b). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Annu Rev Immunol* 7, 145.
- Mosmann, T. R., and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, *Immunol Today* 17, 138-46.

Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., Kung, A. L., Cereb, N., Yao, T. P., Yang, S. Y., and Reiner, S. L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection, *Science* 292, 1907-10.

Murayama, T., and Ogawa, Y. (2002). Roles of two ryanodine receptor isoforms coexisting in skeletal muscle, *Trends Cardiovasc Med* 12, 305-11.

Murphy, E. E., Terres, G., Macatonia, S. E., Hsieh, C. S., Mattson, J., Lanier, L., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K., and O'Garra, A. (1994). B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation, *J Exp Med* 180, 223-31.

Murphy, K. M., Heimberger, A. B., and Loh, D. Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺ TCR^{lo} thymocytes in vivo, *Science* 250, 1720-3.

Nakajima, A., Watanabe, N., Yoshino, S., Yagita, H., Okumura, K., and Azuma, M. (1997). Requirement of CD28-CD86 co-stimulation in the interaction between antigen-primed T helper type 2 and B cells, *Int Immunol* 9, 637-44.

Nakamura, Y., Ghaffar, O., Olivenstein, R., Taha, R. A., Soussi-Gounni, A., Zhang, D. H., Ray, A., and Hamid, Q. (1999). Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma, *J Allergy Clin Immunol* 103, 215-22.

Negro-Alvarez, J. M., Carreno-Rojo, A., Funes-Vera, E., Garcia-Canovas, A., Abellan-Aleman, A. F., and Rubio del Barrio, R. (1997). Pharmacologic therapy for urticaria, *Allergol Immunopathol (Madr)* 25, 36-51.

Nel, A. E., and Slaughter, N. (2002). T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy, *J Allergy Clin Immunol* 109, 901-15.

Neukirch, F., Lyon-Caen, O., Clanet, M., Bousquet, J., Feingold, J., and Druet, P. (1997). Asthma, nasal allergies, and multiple sclerosis., *J Allergy Clin Immunol* 99, 270-1.

Newton, A. C. (1993). Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22, 1-25.

Newton, A. C. (1995a). Protein kinase C. Seeing two domains, *Curr Biol* 5, 973-6.

Newton, A. C. (1995b). Protein kinase C: structure, function, and regulation, *J Biol Chem* 270, 28495-8.

Northrop, J. P., Ho, S. N., Chen, L., Thomas, D. J., Timmerman, L. A., Nolan, G. P., Admon, A., and Crabtree, G. R. (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation, *Nature* 369, 497-502.

O'Brian, C. A., and Ward, N. E. (1991). Stimulation of the ATPase activity of rat brain protein kinase C by phospho acceptor substrates of the enzyme, *Biochemistry* 30, 2549-54.

O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets, *Immunity* 8, 275-83.

Okkenhaug, K., Wu, L., Garza, K. M., La Rose, J., Khoo, W., Odermatt, B., Mak, T. W., Ohashi, P. S., and Rottapel, R. (2001). A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals, *Nat Immunol* 2, 325-32.

Oro, A. S., Guarino, T. J., Driver, R., Steinman, L., and Umetsu, D. T. (1996). Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE-mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis., *J Allergy Clin Immunol* 97, 1402-8.

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, 1063-8.

Ostergaard, H. L., Shackelford, D. A., Hurley, T. R., Johnson, P., Hyman, R., Sefton, B. M., and Trowbridge, I. S. (1989). Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded

tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8959-63.

Oukka, M., Ho, I. C., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Grusby, M. J., and Glimcher, L. H. (1998). The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells, *Immunity* 9, 295-304.

Ouyang, W., Jacobson, N. G., Bhattacharya, D., Gorham, J. D., Fenoglio, D., Sha, W. C., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (1999). The Ets transcription factor ERM is Th1-specific and induced by IL-12 through a Stat4-dependent pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3888-93.

Ouyang, W., Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., and Murphy, K. M. (2000). Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment, *Immunity* 12, 27-37.

Ouyang, W., Ranganath, S., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T., Sha, W., and Murphy, K. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism, *Immunity* 9, 745-55.

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, 327-9.

Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice, *Science* 286, 1374-7.

Paul, W. E., Seder, R. A., and Plaut, M. (1993). Lymphokine and cytokine production by FcεRI+ cells, *Adv Immunol* 53, 1-29.

Pelletier, L., Galceran, M., Pasquier, R., Ronco, P., Verroust, P., Bariety, J., and Druet, P. (1987a). Down-modulation of Heymann's nephritis by mercuric chloride, *Kidney Int* 32, 227-32.

Pelletier, L., Pasquier, R., Rossert, J., and Druet, P. (1987b). HgCl₂ induces non specific immunosuppression in LEW rats, *Eur J Immunol* 17, 49-54.

Pelletier, L., Rossert, J., Pasquier, R., Villarroya, H., Belair, M.-F., Vial, M.-C., Oriol, R., and Druet, P. (1988). Effect of HgCl₂ on experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. HgCl₂-induced downmodulation of the disease, *Eur J Immunol* 18, 243-7.

Pelosi, M., Di Bartolo, V., Mounier, V., Mege, D., Pascussi, J. M., Dufour, E., Blondel, A., and Acuto, O. (1999). Tyrosine 319 in the interdomain B of ZAP-70 is a binding site for the Src homology 2 domain of Lck, *J Biol Chem* 274, 14229-37.

Perez-Villar, J. J., and Kanner, S. B. (1999). Regulated association between the tyrosine kinase Emt/Itk/Tsk and phospholipase-C gamma 1 in human T lymphocytes, *J Immunol* 163, 6435-41.

Pfeiffer, C., Stein, J., Southwood, S., Ketelaar, H., Sette, A., and Bottomly, K. (1995). Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo, *J Exp Med* 181, 1569-74.

Pfeifhofer, C., Kofler, K., Gruber, T., Tabrizi, N. G., Lutz, C., Maly, K., Leitges, M., and Baier, G. (2003). Protein Kinase C {theta} Affects Ca²⁺ Mobilization and NFAT Cell Activation in Primary Mouse T Cells, *J Exp Med* 197, 1525-1535.

Pigatto, P. D., Fumagalli, M., Bigardi, A., Altomare, G., and Finzi, A. F. (1990). Nimodipine versus terfenadine in the treatment of physical stimulus- induced urticaria, *Allergy* 45, 71-4.

Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels., *Cell* 102, 89-97.

Poggi, A., Rubartelli, A., and Zocchi, M. R. (1998). Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in human dendritic cell function. Competition by HIV-1 Tat, *J Biol Chem* 273, 7205-9.

Prasad, K. V., Cai, Y. C., Raab, M., Duckworth, B., Cantley, L., Shoelson, S. E., and Rudd, C. E. (1994). T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2834-8.

Premack, B. A., and Gardner, P. (1992). Signal transduction by T-cell receptors: mobilization of Ca and regulation of Ca-dependent effector molecules., *Am J Physiol* 263, 1119-40.

Prigent, P., Saoudi, A., Pannetier, C., Graber, P., Bonnefoy, Y., Druet, P., and Hirsch, F. (1995). Mercuric chloride, a chemical responsible for Th2-mediated autoimmunity in Brown-Norway rats, directly triggers T cells to produce IL-4., *J Clin Invest* 96, 1484-9.

Prouvost-Danon, A., Abadie, A., Sapin, C., Bazin, H., and Druet, P. (1981). Induction of IgE synthesis and potentiation of anti-ovalbumin antibody IgE response by HgCl₂ in the rat, *J Immunol* 126, 699-702.

Pulendran, B., Smith, J. L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C. R. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1036-41.

Rajagopal, K., Sommers, C. L., Decker, D. C., Mitchell, E. O., Korthauer, U., Sperling, A. I., Kozak, C. A., Love, P. E., and Bluestone, J. A. (1999). RIBP, a novel Rlk/Txk- and itk-binding adaptor protein that regulates T cell activation, *J Exp Med* 190, 1657-68.

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.* (1997). A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains, *J Biol Chem* 272, 22059-66.

Randriamampita, C., and Tsien, R. Y. (1993). Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx, *Nature* 364, 809.

Ranger, A. M., Das, M. P., Kuchroo, V. K., and Glimcher, L. H. (1996). B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4-producing T cells, *Int Immunol* 8, 1549-60.

Ranger, A. M., Hodge, M. R., Gravallesse, E. M., Oukka, M., Davidson, L., Alt, F. W., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Grusby, M., and Glimcher, L. H. (1998). Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc, *Immunity* 8, 125-34.

Rao, N., Lupper, M. L., Jr., Ota, S., Reedquist, K. A., Druker, B. J., and Band, H. (2000). The linker phosphorylation site Tyr292 mediates the negative regulatory effect of Cbl on ZAP-70 in T cells, *J Immunol* 164, 4616-26.

Ravichandran, K. S., Lee, K. K., Songyang, Z., Cantley, L. C., Burn, P., and Burakoff, S. J. (1993). Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation, *Science* 262, 902-5.

Ravichandran, K. S., Lorenz, U., Shoelson, S. E., and Burakoff, S. J. (1995). Interaction of Shc with Grb2 regulates association of Grb2 with mSOS, *Mol Cell Biol* 15, 593-600.

Reedquist, K. A., Fukazawa, T., Panchamoorthy, G., Langdon, W. Y., Shoelson, S. E., Druker, B. J., and Band, H. (1996). Stimulation through the T cell receptor induces Cbl association with Crk proteins and the guanine nucleotide exchange protein C3G, *J Biol Chem* 271, 8435-42.

Reif, K., Burgering, B. M., and Cantrell, D. A. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin-2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase, *J Biol Chem* 272, 14426-33.

Reiner, S. L., and Locksley, R. M. (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*, *Annu Rev Immunol* 13, 151-77.

Reiner, S. L., and Seder, R. A. (1999). Dealing from the evolutionary pawnshop: how lymphocytes make decisions, *Immunity* 11, 1-10.

Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., and Flavell, R. A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells, *J Exp Med* 185, 461-9.

Rincon, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M. S., Penix, L. A., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1998). Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway, *EMBO J* 17, 2817-29.

Rincon, M., Flavell, R. A., and Davis, R. A. (2000). The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses, *Free Radic Biol Med* 28, 1328-37.

Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y. J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation, *Science* 283, 1183-1186.

Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S. B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., and O'Garra, A. (1997). IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB, *Immunity* 7, 571-81.

Röcken, M., Saurat, J.-H., and Hauser, C. (1992). A common precursor for CD4⁺ T cells producing IL-2 or IL-4, *J Immunol* 148, 1031-6.

Rogers, P. R., and Croft, M. (1999). Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance, *J Immunol* 163, 1205-13.

Romagnani, S. (1991). Human T_{H1} and T_{H2} subsets : doubt no more, *Immunol Today* 12, 256-7.

Ron, D., Napolitano, E. W., Voronova, A., Vasquez, N. J., Roberts, D. N., Calio, B. L., Caothien, R. H., Pettiford, S. M., Wellik, S., Mandac, J.B., and Kauvar, L. M. (1999). Direct interaction in T-cells between thetaPKC and the tyrosine kinase p59fyn., *J Biol Chem* 274, 19003-10.

Roychowdhury, D., and Lahn, M. (2003). Antisense therapy directed to protein kinase C-alpha (Affinitak, LY900003/ISIS 3521): potential role in breast cancer, *Semin Oncol* 30, 30-3.

Sabapathy, K., Hu, Y., Kallunki, T., Schreiber, M., David, J. P., Jochum, W., Wagner, E. F., and Karin, M. (1999). JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development, *Curr Biol* 9, 116-25.

Sadighi Akha, A. A., Willmott, N. J., Brickley, K., Dolphin, A. C., Galione, A., and Hunt, S. V. (1996). Anti-Ig-induced calcium influx in rat B lymphocytes mediated by cGMP through a dihydropyridine-sensitive channel, *J Biol Chem* 271, 7297-300.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1998). Flexible Programs of Chemokine Receptor Expression on Human Polarized T Helper 1 and 2 Lymphocytes, *J Exp Med* 187, 875-883.

Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells, *Science* 277, 2005-7.

Sanchez, I., Hughes, R. T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J. R., Avruch, J., Kyriakis, J. M., and Zon, L. I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun, *Nature* 372, 794-8.

Saoudi, A., Castedo, M., Nochy D., Mandet, C., Pasquier, R., Druet, P., and Pelletier, L. (1995). Self reactive anti-class II Th2 cell lines derived from gold salt-injected rats trigger B cell polyclonal activation and transfer autoimmunity in CD8-depleted normal syngeneic recipients, *Eur J Immunol* 25, 1972-1979.

Saoudi, A., Kuhn, J., Huygen, K., de Kozak, Y., Velu, T., Goldman, M., Druet, P., and Bellon, B. (1993). TH2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a TH1-dependent autoimmune disease, *Eur J Immunol* 23, 3096-3103.

Savignac, M., Badou, A., Moreau, M., Leclerc, C., Guery, J. C., Paulet, P., Druet, P., Ragab-Thomas, J., and Pelletier, L. (2001a). Protein kinase C-mediated calcium entry dependent

upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis, *Faseb J* 15, 1577-9.

Savignac, M., Badou, B., Delmas, C., Subra, J. F., De Cramer, S., Paulet, P., Cassar, G., Druet, P., Saoudi, A., and Pelletier, L. (2001b). Gold is a T cell polyclonal activator in BN and LEW rats but favors IL-4 expression only in autoimmune prone BN rats, *Eur J Immunol* 31, 2266-2276.

Schaeffer, E. M., Debnath, J., Yap, G., McVicar, D., Liao, X. C., Littman, D. R., Sher, A., Varmus, H. E., Lenardo, M. J., and Schwartzberg, P. L. (1999). Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity, *Science* 284, 638-41.

Scharenberg, A. M., and Kinet, J. P. (1998). PtdIns-3,4,5-P3: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals, *Cell* 94, 5-8.

Schmedt, C., Saijo, K., Niidome, T., Kuhn, R., Aizawa, S., and Tarakhovsky, A. (1998). Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T- lineage cells, *Nature* 394, 901-4.

Schmits, R., Kundig, T. M., Baker, D. M., Shumaker, G., Simard, J. J., Duncan, G., Wakeham, A., Shahinian, A., van der Heiden, A., Bachmann, M. F., *et al.* (1996). LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor, *J Exp Med* 183, 1415-26.

Schneider, H., Cai Y.C., Prasad, K. V., Shoelson, S. E., and Rudd, C. E. (1995). T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras., *Eur J Immunol* 25, 1044-1050.

Scholze, A., Plant, T. D., Dolphin, A. C., and Nurnberg, B. (2001). Functional expression and characterization of a voltage-gated CaV1.3 (alpha1D) calcium channel subunit from an insulin-secreting cell line, *Mol Endocrinol* 15, 1211-21.

Schweitzer, A. N., Borriello, F., Wong, R. C., Abbas, A. K., and Sharpe, A. H. (1997). Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86, *J Immunol* *158*, 2713-22.

Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R., Pearce, E., and Sher, A. (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis: T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to two different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens, *J Exp Med* *168*, 1675.

Seder, R. A., and Paul, W. E. (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells, *Annu Rev Immunol* *12*, 635-673.

Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M., and Fazekas de St Groth, B. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice, *J Exp Med* *176*, 1091-8.

Senn, K. A., McCoy, K. D., Maloy, K. J., Stark, G., Frohli, E., Rulicke, T., and Klemenz, R. (2000). T1-deficient and T1-Fc-transgenic mice develop a normal protective Th2-type immune response following infection with *Nippostrongylus brasiliensis*, *Eur J Immunol* *30*, 1929-38.

Sha, W. C., Liou, H. C., Tuomanen, E. I., and Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses, *Cell* *80*, 321-30.

Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K. P., Kündig, T. M., Kishiara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P. S., Thompson, C. B., and Mak, T. W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice, *Science* *261*, 609-612.

Shapiro, V. S., Truitt, K. E., Imboden, J. B., and Weiss, A. (1997). CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites., *Mol Cell Biol* *17*, 4051-4058.

Shaw, P. J., Charles, S. L., and Salt, T. E. (1999). Actions of 8-bromo-cyclic-GMP on neurones in the rat thalamus in vivo and in vitro, *Brain Res* *833*, 272-7.

Shibuya, K., Robinson, D., Zonin, F., Hartley, S. B., Macatonia, S. E., Somoza, C., Hunter, C. A., Murphy, K. M., and O'Garra, A. (1998). IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice, *J Immunol* *160*, 1708-16.

Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., *et al.* (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene., *Nature* *380*, 630-633.

Shistik, E., Ivanina, T., Blumenstein, Y., and Dascal, N. (1998). Crucial role of N terminus in function of cardiac L-type Ca²⁺ channel and its modulation by protein kinase C., *J Biol Chem* *273*, 17901-17909.

Siegel, M. D., Zhang, D. H., Ray, P., and Ray, A. (1995). Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine EL-4 cells requires the GATA-3 and CLE0 elements, *J Biol Chem* *270*, 24548-55.

Singh, R. A., Zang, Y. C., Shrivastava, A., Hong, J., Wang, G. T., Li, S., Tejada-Simon, M. V., Kozovska, M., V.M., R., and Zhang, J. Z. (1999). Th1 and Th2 deviation of myelin-autoreactive T cells by altered peptide ligands is associated with reciprocal regulation of Lck, Fyn, and ZAP-70, *J Immunol* *163*, 6393-402.

Sligh, J. E., Jr., Ballantyne, C. M., Rich, S. S., Hawkins, H. K., Smith, C. W., Bradley, A., and Beaudet, A. L. (1993). Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1, *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 8529-33.

Sloan-Lancaster, J., Shaw, A. S., Rothbard, J. B., and Allen, P. M. (1994). Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy, *Cell* *79*, 913-22.

Sloan-Lancaster, J., Steinberg, T. H., and Allen, P. M. (1997). Selective loss of the calcium ion signaling pathway in T cells maturing toward a T helper 2 phenotype, *J Immunol* *159*, 1160-8.

Smith, A. L., and de St Groth, B. F. (1999). Antigen-pulsed CD8alpha+ dendritic cells generate an immune response after subcutaneous injection without homing to the draining lymph node, *J Exp Med* *189*, 593-8.

Snapper, C. M., Zelazowski, P., Rosas, F. R., Kehry, M. R., Tian, M., Baltimore, D., and Sha, W. C. (1996). B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching, *J Immunol* *156*, 183-91.

Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., and et al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences, *Cell* *72*, 767-78.

Sosinowski, T., Pandey, A., Dixit, V. M., and Weiss, A. (2000). Src-like adaptor protein (SLAP) is a negative regulator of T cell receptor signaling, *J Exp Med* *191*, 463-74.

Springer, T. A. (1990). Adhesion molecules of the immune system, *Nature* *346*, 425-434.

Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell* *76*, 301-14.

Springer, T. A., Dustin, M. L., Kishimoto, T. K., and Marlin, S. D. (1987). The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system, *Annu Rev Immunol* *5*, 223-52.

Stein, P. H., Fraser, J. D., and Weiss, A. (1994). The cytoplasmic domain of CD28 is both necessary and sufficient for costimulation of interleukin-2 secretion and association with phosphatidylinositol 3'-kinase, *Mol Cell Biol* *14*, 3392-402.

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*, 741-50.

Steinman, L. (1993). Autoimmune disease, *Scientific American* *269*, 75-83.

Straus, D. B., and Weiss, A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor., *Cell* 70, 585-593.

Striessnig, J. (1999). Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels, *Cell Physiol Biochem* 9, 242-69.

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, 727-36.

Su, B., and Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression, *Current Opinion in Immunology* 8, 402-411.

Su, Z., Csutora, P., Hunton, D., Shoemaker, R. L., Marchase, R. B., and Blalock, J. E. (2001). A store-operated nonselective cation channel in lymphocytes is activated directly by Ca(2+) influx factor and diacylglycerol, *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1284-92.

Subramanian, G., Kazura, J. W., Pearlman, E., Jia, X., Malhotra, I., and King, C. L. (1997). B7-2 requirement for helminth-induced granuloma formation and CD4 type 2 T helper cell cytokine expression, *J Immunol* 158, 5914-20.

Sugawara, T., Moriguchi, T., Nishida, E., and Takahama, Y. (1998). Differential roles of ERK and p38 MAP kinase Pathways in positive and negative selection of T lymphocytes, *Immunity* 9, 565-574.

Sun, Z., Arendt, C. W., Ellmeier, W., Schaeffer, E. M., Sunshine, M. J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P. L., and Littman, D. R. (2000). PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes, *Nature* 404, 402-7.

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

Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U., and Murphy, K. M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells, *J Exp Med* 185, 817-24.

Szabo, S. J., Jacobson, N. G., Dighe, A. S., Gubler, U., and Murphy, K. M. (1995). Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling, *Immunity* 2, 665-75.

Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling, *Nature* 380, 627-30.

Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice, *Immunity* 8, 383-90.

Takemoto, N., Koyano-Nakagawa, N., Yokota, T., Arai, N., Miyatake, S., and Arai, K. (1998). Th2-specific DNase I-hypersensitive sites in the murine IL-13 and IL-4 intergenic region, *Int Immunol* 10, 1981-5.

Tamura, T., Nakano, H., Nagase, H., Morokata, T., Igarashi, O., Oshimi, Y., Miyazaki, S., and Nariuchi, H. (1995). Early activation signal transduction pathways of Th1 and Th2 cell clones stimulated with anti-CD3. Roles of protein tyrosine kinases in the signal for IL-2 and IL-4 production, *J Immunol* 155, 4692-701.

Tamura, T., Yanagida, T., and Nariuchi, H. (1993). Difference in signal transduction pathway for IL-2 and IL-4 production in T helper 1 and T helper 2 cell clones in response to anti-CD3, *J Immunol* 151, 6051-61.

Tang, J., Sawadkiosol, S., Chang, J. H., and Burakoff, S. J. (1999). SLAP, a dimeric adapter protein, plays a functional role in T cell receptor signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9775-80.

Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P., and Bottomly, K. (1997a). Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4⁺ T cell differentiation, *J Immunol* *159*, 5956-63.

Tao, X., Grant, C., Constant, S., and Bottomly, K. (1997b). Induction of IL-4-producing CD4⁺ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding, *J Immunol* *158*, 4237-44.

Taylor, S. S., and Radzio-Andzelm, E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif, *Structure* *2*, 345-55.

Thierfelder, W. E., van Deursen, J. M., Yamamoto, K., Tripp, R. A., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Sangster, M. Y., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G. C., and Ihle, J. N. (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells, *Nature* *382*, 171-4.

Timmerman, L. A., Clipstone, N. A., Ho, S. N., Northrop, J. P., and Crabtree, G. R. (1996). Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression, *Nature* *383*, 837-840.

Tournade, H., Pelletier, L., Guéry, J. C., Pasquier, R., Nochy, D., Hinglais, N., Guilbert, B., and Druet, P. (1991). Experimental gold-induced autoimmunity, *Nephrol Dial Transplant* *6*, 621-630.

Townsend, M. J., Fallon, P. G., Matthews, D. J., Jolin, H. E., and McKenzie, A. N. (2000). T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses, *J Exp Med* *191*, 1069-76.

Trinchieri, G. (1993). Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells, *Immunol Today* *14*, 335-338.

Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity, *Annu Rev Immunol* *13*, 251-76.

Truitt, K. E., Hicks, C. M., and Imboden, J. B. (1994). Stimulation of CD28 triggers an association between CD28 and phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells, *J Exp Med* *179*, 1071-1076.

Tseng, S. Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J. E., Pai, S. I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D. M., and Tsuchiya, H. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells, *J Exp Med* *193*, 839-46.

Tuosto, L., and Acuto, O. (1998). CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement, *Eur J Immunol* *28*, 2131-42.

Tuosto, L., Michel, F., and Acuto, O. (1996). p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen- stimulated T cells, *J Exp Med* *184*, 1161-6.

van den Biggelaar, A. H., van Ree, R., Rodrigues, L. C., Lell, B., Deelder, A. M., Kremsner, P. G., and Yazdanbakhsh, M. (2000). Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10, *Lancet* *356*, 1723-7.

van Oers, N. S., Tohlen, B., Malissen, B., Moomaw, C. R., Afendis, S., and Slaughter, C. A. (2000). The 21- and 23-kD forms of TCR zeta are generated by specific ITAM phosphorylations, *Nat Immunol* *1*, 322-8.

Varadi, G., Mori, Y., Mikala, G., and Schwartz, A. (1995). Molecular determinants of Ca²⁺ channel function and drug action, *Trends Pharmacol Sci* *16*, 43-9.

Verdiani, P., Di Carlo, S., and Baronti, A. (1989). Effect of nisoldipine (BAY k 5552) on methacholine-induced bronchoconstriction in patients with nonspecific bronchial hyperreactivity, *Ann Allergy* *63*, 498-502.

Viola, A., and Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds, *Science* *273*, 104-106.

von der Weid, T., Beebe, A. M., Roopenian, D. C., and Coffman, R. L. (1996). Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4+NK1.1- T cell population, *J Immunol* *157*, 4421-7.

Walzl, G., Matthews, S., Kendall, S., Gutierrez-Ramos, J. C., Coyle, A. J., Openshaw, P. J., and Hussell, T. (2001). Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology, *J Exp Med* *193*, 785-92.

Ward, S. G., June, C. H., and Olive, D. (1996). PI3-kinase: a pivotal pathway in T cell activation?, *Immunol Today* *17*, 187-197.

Ward, S. G., Wilson, A., Turner, L., Westwick, J., and Sansom, D. M. (1995). Inhibition of CD28-mediated T cell costimulation by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor wortmannin, *Eur J Immunol* *25*, 526-32.

Wardlaw, A. J., Moqbel, R., and Kay, A. B. (1995). Eosinophils: biology and role in disease, *Adv Immunol* *60*, 151-266.

Weber, J. R., Orstavik, S., Torgersen, K. M., Danbolt, N. C., Berg, S. F., Ryan, J. C., Tasken, K., Imboden, J. B., and Vaage, J. T. (1998). Molecular cloning of the cDNA encoding pp36, a tyrosine-phosphorylated adaptor protein selectively expressed by T cells and natural killer cells, *J Exp Med* *187*, 1157-61.

Williams, B. L., Schreiber, K. L., Zhang, W., Wange, R. L., Samelson, L. E., Leibson, P. J., and Abraham, R. T. (1998). Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T- cell line, *Mol Cell Biol* *18*, 1388-99.

Wills-Karp, M. (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness, *Annu Rev Immunol* *17*, 255-81.

Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., and Donaldson, D. D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma, *Science* 282, 2258-61.

Wu, J., Motto, D. G., Koretzky, G. A., and Weiss, A. (1996). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation., *Immunity* 4, 593-602.

Xanthoudakis, S., Viola, J. P., Shaw, K. T., Luo, C., Wallace, J. D., Bozza, P. T., Luk, D. C., Curran, T., and Rao, A. (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1, *Science* 272, 892-5.

Xu, D., Chan, W. L., Leung, B. P., Huang, F.-p., Wheeler, R., Piedrafita, D., Robinson, J. H., and Liew, F. Y. (1998). Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells., *J Exp Med* 187, 787-794.

Xu, X., Sun, Y. L., and Hoey, T. (1996). Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain, *Science* 273, 794-7.

Yablonski, D., Kadlecsek, T., and Weiss, A. (2001). Identification of a phospholipase c-gamma1 (plc-gamma1) sh3 domain- binding site in slp-76 required for t-cell receptor-mediated activation of plc-gamma1 and nfat, *Mol Cell Biol* 21, 4208-18.

Yablonski, D., Kuhne, M. R., Kadlecsek, T., and Weiss, A. (1998). Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC-gamma1 in an SLP-76- deficient T cell, *Science* 281, 413-6.

Yamasaki, S., Tachibana, M., Shinohara, N., and Iwashima, M. (1997). Lck-independent triggering of T-cell antigen receptor signal transduction by staphylococcal enterotoxins, *J Biol Chem* 272, 14787-91.

Yang, D. D., Conze, D., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Davis, R. J., Rincon, M., and Flavell, R. A. (1998a). Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2, *Immunity* 9, 575-85.

Yang, J., Murphy, T. L., Ouyang, W., and Murphy, K. M. (1999a). Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4⁺ T cells : evidence for two distinct pathways for promoter activation, *Eur J Immunol* 29, 548-55.

Yang, L., Cohn, L., Zhang, D. H., Homer, R., Ray, A., and Ray, P. (1998b). Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation, *J Exp Med* 188, 1739-50.

Yang, W. C., Ghiotto, M., Barbarat, B., and Olive, D. (1999b). The role of Tec protein-tyrosine kinase in T cell signaling, *J Biol Chem* 274, 607-17.

Yang, W. C., Ghiotto, M., Castellano, R., Collette, Y., Auphan, N., Nunes, J. A., and Olive, D. (2000). Role of Tec kinase in nuclear factor of activated T cells signaling, *Int Immunol* 12, 1547-52.

Yang, W. C., and Olive, D. (1999). Tec kinase is involved in transcriptional regulation of IL-2 and IL-4 in the CD28 pathway, *Eur J Immunol* 29, 1842-9.

Yin, T., Shen, R., Feng, G. S., and Yang, Y. C. (1997). Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases, *J Biol Chem* 272, 1032-7.

Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengere, L. E., Wakeham, A. C., Bouchard, D., Kong, Y. Y., Ohteki, T., Shahinian, A., Bachmann, M., *et al.* (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production, *Immunity* 8, 115-24.

Yoshida, T., Ikuta, K., Sugaya, H., Maki, K., Takagi, M., Kanazawa, H., Sunaga, S., Kinashi, T., Yoshimura, K., Miyazaki, J., *et al.* (1996). Defective B-1 cell development and impaired immunity against *Angiostrongylus cantonensis* in IL-5R alpha-deficient mice, *Immunity* 4, 483-94.

Yoshimoto, T., Bendelac, A., Watson, C., Hu-Li, J., and Paul, W. E. (1995). Role of NK1.1⁺ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production, *Science* 270, 1845-7.

Yoshimoto, T., Mizutani, H., Tsutsui, H., Noben-Trauth, N., Yamanaka, K., Tanaka, M., Izumi, S., Okamura, H., Paul, W. E., and Nakanishi, K. (2000). IL-18 induction of IgE: dependence on CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6, *Nat Immunol* *1*, 132-7.

Yoshimoto, T., Okamura, H., Tagawa, Y. I., Iwakura, Y., and Nakanishi, K. (1997). Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells., *Proc Natl Acad Sci U S A (United States)* *94*, 3948-3953.

Yoshimoto, T., and Paul, W. E. (1994). CD4^{pos} NK1-1^{pos} T cells promptly produced interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3, *J Exp Med* *179*, 1285-1295.

Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., and Nakanishi, K. (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production, *J Immunol* *161*, 3400-7.

Yoshinaga, S. K., Whoriskey, J. S., Khare, S. D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M. A., Kohno, T., *et al.* (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS, *Nature* *402*, 827-32.

Young, H. A., Ghosh, P., Ye, J., Lederer, J., Lichtman, A., Gerard, J. R., Penix, L., Wilson, C. B., Melvin, A. J., McGurn, M. E., *et al.* (1994). Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN- γ gene, *J Immunol* *153*, 3603-3610.

Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., and Ray, A. (1997). Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene, *J Biol Chem* *272*, 21597-603.

Zhang, D. H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P., and Ray, A. (1999a). Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3, *Immunity* *11*, 473-82.

Zhang, D. H., Yang, L., and Ray, A. (1998a). Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3, *J Immunol* *161*, 3817-21.

Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P., and Samelson, L. E. (1998b). 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.* (1999b). Essential role of LAT in T cell development, *Immunity* *10*, 323-32.

Zhang, W., Tribble, R. P., and Samelson, L. E. (1998c). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation, *Immunity* *9*, 239-46.

Zheng, C. F., and Guan, K. L. (1993). Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal- regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2, *J Biol Chem* *268*, 11435-9.

Zheng, W., and Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells., *Cell* *89*, 587-96.

Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J. C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P., and McKeon, F. (1998). Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1, *Cell* *93*, 851-61.

Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J. A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C. T., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., O'Garra, A., Robinson, D., Rocchi, M., *et al.* (1998). The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells, *J Immunol* *161*, 547-51.

Zocchi, M. R., Rubartelli, A., Morgavi, P., and Poggi, A. (1998). HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels., *J Immunol* *161*, 2938-2943.

Zurawski, G., and de Vries, J. E. (1994). Interleukin 13, an interleukin-4 like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells, *Immunol Today* *15*, 19-26.

Toulouse, 2003

NOM : GOMES

PRENOM : BRUNO

TITRE : ETUDE D'UNE VOIE DE SIGNALISATION INTERVENANT DANS LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES LYMPHOCYTES T

RESUME : Les lymphocytes T auxiliaires sont hétérogènes, avec les lymphocytes Th1 producteurs d'interféron gamma et les lymphocytes Th2 qui sécrètent l'interleukine (IL)-4. Ce travail porte sur l'étude, à la fois *in vitro* et *in vivo*, d'une voie de signalisation spécifique aux lymphocytes Th2, impliquant protéine kinase C (PKC) et récepteur à la dihydropyridine (DHPR) dans la production d'IL-4. L'auteur montre que les sous-unités $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$, constitutives des DHPR, sont présentes spécifiquement dans les lymphocytes Th2, et qu'elles contrôlent l'entrée de calcium et la synthèse d'IL-4. *In vivo* chez le rat, un inhibiteur des DHPR prévient l'apparition d'une maladie auto-immune de type Th2 mais n'a aucun effet sur le développement d'une maladie de type Th1. L'intervention sélective des PKC α et δ dans la production d'IL-4 est mise en évidence dans un hybridome T. Cette étude permet d'envisager une nouvelle thérapie des maladies liées à une dérégulation de la réponse Th2 en ciblant DHPR et PKC.

MOTS-CLES : Lymphocytes T – Cytokines – Calcium – Protéine kinase C

ENGLISH TITLE : STUDY OF A SIGNALING PATHWAY IMPLICATED IN CYTOKINE PRODUCTION BY T LYMPHOCYTES

ABSTRACT : Helper T lymphocytes are heterogeneous in terms of cytokine production, with Th1 and Th2 cells. The aim of this work is to study both *in vitro* and *in vivo* a Th2 lymphocytes-specific signaling pathway which, implicates protein kinase C (PKC) and dihydropyridine receptor (DHPR) in IL-4 production. The author shows that $\alpha 1C$ and $\alpha 1D$ subunits, known to be DHP sensitive, are selectively expressed on murine Th2 cells, and play a role in TCR-dependent calcium response and IL-4 production. *In vivo*, administration of a calcium channel blocker prevents the development of a Th2-mediated autoimmune disease but does not improve the course of a Th1-related autoimmune disease. This study also emphasizes selective implication of PKC α and δ in IL-4 secretion by a T cell hybridoma. These data not only identify a new functional marker of Th2 cells, but should also prompt to investigate DHPR and specific PKC inhibitors effectiveness in modulating Th2-mediated disorders.

KEY WORDS : T lymphocytes – Cytokines – Calcium – Protein kinase C