

ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES CONCOURANT A LA MOBILITE DES TCR EN SURFACE DES LYMPHOCYTES T

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2008
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Sébastien Mathieu SOUBIES

Né le 29 septembre 1983 à PAU (64)

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

JURY

PRESIDENT :

M. Antoine BLANCHER

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme. Séverine BOULLIER

Mme. Lydie BRET-BENNIS

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES CONCOURANT A LA MOBILITE DES TCR EN SURFACE DES LYMPHOCYTES T

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2008
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Sébastien Mathieu SOUBIES

Né le 29 septembre 1983 à PAU (64)

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

JURY

PRESIDENT :

M. Antoine BLANCHER

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme. Séverine BOULLIER

Mme. Lydie BRET-BENNIS

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M.	G. VAN HAVERBEKE
	M.	P. DESNOYERS
Professeurs honoraires	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAUX
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUELFY
	M.	M. EECKHOUTTE
	M.	D. GRIESS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. DORCHIES Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale. Microbiologie, Immunologie*
- M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
- M. BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. MARTINEAU Guy-Pierre, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
- M. SAUTET Jean, *Anatomie*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
- M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*
- M. DUCOS de LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme KOLF-CLAUW Martine, *Pharmacie - Toxicologie*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. PICAVET Dominique, *Pathologie infectieuse*
- M. SANS Pierre, *Productions animales*
- Mlle. TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores domestiques*

INGENIEUR DE RECHERCHE

- M. TAMZALI Youssef, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*
- M. SEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mme BENNIS-BRET, Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCLAINVILLE –CAMUS, Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologie, Histologie*
Mme LETRON –RAYMOND, Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme TROEGELER –MEYNADIER, Annabelle, *Alimentation*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
Mlle GOSSOT Pauline, *Pathologie Chirurgicale*
M. NOUVEL Laurent-Xavier, *Pathologie de la reproduction*
Mlle RATTEZ Elise, *Médecine*
M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VOLMER Romain, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle BIBBAL Delphine, *H.I.D.A.O.A Sciences de l'Alimentation*
M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. RABOISSON Didier, *Productions animales*
M. TREVENNEC Karen, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

REMERCIEMENTS

A notre président de jury le Professeur Antoine Blancher

Professeur des Universités,

Praticien Hospitalier,

Immunologie (option biologique)

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

A Madame le Docteur Séverine Boullier,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Immunologie Générale et Médicale,

Qui a bien voulu accepter de diriger cette thèse,

Merci pour son soutien, sa disponibilité et sa gentillesse ainsi que ses conseils qui m'ont aidés ces dernières années,

Merci pour cet enseignement d'Immunologie qui m'a initié à cette fascinante discipline

Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus sincère gratitude.

A Madame le Docteur Lydie BRET-BENNIS

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE,

Physique et Chimie biologiques et médicales

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,

Qui s'est avérée une relectrice attentive et exigeante,

Qui enseigne avec une passion communicative la Biochimie

Qu'elle reçoive mes plus sincères remerciements.

A mes deux Mères,
Parties trop tôt.

A mon Père,

A notre amour si fort et si peu loquace. Je remercie chaque jour le Ciel d'être riche de cette richesse-ci.

A Sylvette,

Si forte, si douce et si attentive aux autres. Car il est bon de connaître des personnes dont on peut dire qu'elles sont des Justes.

A mon Parrain,

Toi qui a veillé sur moi depuis ma naissance.

A Annick, Michel, Bernard,

Ceux de ma famille dont la présence réchauffe mon cœur :.

A Annie,

Amie de notre famille, toujours présente et bienveillante.

A Cédric,

Dans un premier temps Carré par intérim' et depuis et surtout Ami. Soit remercié, toi qui as été un soutien sans faille jusque dans les plus noirs instants de ma vie. Le Ciel te bénisse.

A Johanne,

Qui a supporté mon caractère et est demeurée une amie toutes ces années. A ta capacité à rêver et à aimer les rêves des autres, à ta farouche volonté qui t'a menée là où tu es.

A Jonathan,

Si brillant, parfois si insupportable et souvent si aimable. Je suis si heureux et honoré de notre amitié même si je me demande encore parfois dans quelle mesure j'en suis digne.

A mes amis les Pigeons,

Celles et ceux avec qui j'ai partagé un certain nombre d'épreuves ces dernières années. De tels liens sont impérissables, et je vous souhaite une vie des plus douces.

A M. Bodin,

Qui m'a fait l'honneur de devenir mon directeur de thèse. Si j'ai un jour la chance de pouvoir enseigner, j'essaierai de le faire avec la même passion.

A Jean-Luc Guérin,

Merci de m'avoir initié au Monde Mystérieux et Fascinant des Palmipèdes.

A Romain Volmer,

Superviseur attentif. J'espère de tout cœur être l'étudiant à la hauteur de ce que tu mérites. Je suis tous les jours plus surpris que tu prennes aussi bien ma maladresse et mon étourderie (aux ressources insoupçonnées et inépuisables...). J'espère ne pas t'en réserver encore trop. Que nos recherches soient fructueuses !

Au Pr. Salvatore Valitutti,

Qui m'a accueilli dans son équipe "Dynamique des interactions lymphocytaires" de l' U563 INSERM et pour sa supervision.

A Sabina Mueller

Qui m'a enseigné, aidé pour tous les aspects techniques des expériences ainsi que pour la culture cellulaire. Merci aussi et surtout pour ta présence chaleureuse durant cette période parfois difficile.

A Iris,

Pour les conversations tard au laboratoire, pour ta passion, pour ton amitié.

A Mickael,

Pour toutes cette aide, toutes ces discussions tout au long de l'année. Il est difficile de suivre le chemin d'Aînés aussi talentueux !

A Nicolas,

Pour ta constante bonne humeur et ta gentillesse, et pour cette passion pour la Montagne.

A Loïc Dupré et son équipe,

Je suis heureux et honoré de connaître une personne telle que Toi.

A Margot,

La plus adorable des Pies, enfant chéri de la famille depuis maintenant six ans. Longue Vie à toi, Pie de mon cœur !

A ceux que je ne cite pas mais qui demeurent dans mon cœur.

Table des matières

Table des illustrations.....	16
Liste des abréviations employées	17
Première partie : Un aperçu de la dynamique des membranes plasmiques. Implications pour le TCR	19
1. Dynamique membranaire et mobilité des éléments de surface	20
1.1. La mosaïque fluide :	20
1.2. Limites au modèle de la mosaïque fluide :	22
1.3. Compartimentalisation par des barrières cytoplasmiques	22
1.4. Rôle potentiel des microdomaines lipidiques :	25
1.5. Transport dirigé de protéines en surface de cellules :	27
1.6. Une vision actuelle de la membrane plasmique :	27
2. Lymphocytes T et TCR	28
2.1. Le TCR	29
2.1.1. Structure	29
2.1.2. Le complexe CD3-TCR	29
2.1.3. Organisation et recombinaison des gènes codant pour le TCR $\alpha\beta$	31
2.2. Conséquences de l'engagement des TCR sur la biologie des lymphocytes T :	33
2.2.1. Education et sélection des LT :	33
2.2.2. Mise en place de la réponse immunitaire adaptative :	35
2.2.3. LT cytotoxiques et lyse cellulaire	35
2.3. Le TCR, récepteur-clé du système immunitaire :	37
3. Engagement des TCR et signalisation	37
3.1. Caractéristiques de l'interaction entre TCR et complexes peptide-CMH :	38
3.1.1. Données thermodynamiques :	38
3.1.2. Données cristallographiques et conformationnelles :	38
3.1.3. Données cinétiques :	39
3.2. Modèles actuels décrivant l'engagement des TCR	39
3.2.1. <i>Kinetic segregation</i>	39
3.2.2. Valence du TCR, oligomérisation et <i>microclusters</i> :	41
3.2.3. Engagement en série, hétérodimérisation :	41

3.2.4.	<i>Kinetic proofreading</i>	43
3.3.	Engagement des TCR et activation des lymphocytes T	43
3.3.1.	Acteurs proximaux	44
3.3.2.	Diversification du signal : les principales voies de signalisation :.....	44
3.3.2.1.	La PLC γ 1 :.....	45
3.3.2.2.	La voie calcique :	45
3.3.2.3.	La voie de la PKC θ :	45
3.3.2.4.	La voie des MAP kinases :	47
3.3.2.5.	La voie de la PI3K :.....	47
4.	La synapse immunologique, les synapses immunologiques	47
4.1.	Notion de synapse	47
4.2.	La synapse immunologique.....	49
4.3.	Pluralité des structures et plasticité des synapses immunologiques.....	49
4.4.	SI monocentrique mature	49
4.4.1.	SI immature	50
4.4.2.	Synapse sécrétrice	50
4.4.3.	Synapse multicentrique et partiellement organisée	51
4.5.	Fonctions des synapses immunologiques :.....	51
4.5.1.	SI et sélection thymique	51
4.5.2.	Production d'un signal durable pour l'activation de cellules :.....	51
4.5.3.	Modulation du signal transduit et dégradation des TCR :.....	51
4.5.4.	Sécrétion polarisée de facteurs hydrosolubles	52
4.5.5.	Prélude à une division asymétrique	53
	Seconde partie : Etude des mécanismes moléculaires concourant à la mobilité des TCR en surface des lymphocytes T	55
1.	Introduction	56
2.	Problématique et objectifs de travail :	57
3.	Matériels et méthodes	58
3.1.	Isolement et culture cellulaires :.....	58
3.1.1.	Purification de lymphocytes du sang périphérique humains :.....	58
3.1.2.	Expansion de LT :	58
3.1.3.	Clone T et CPA	58
3.2.	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> :	59
3.2.1.	Génération d'un fluorochrome :.....	59

3.2.2. Apprêtement des LT :.....	60
3.2.3. FRAP :.....	60
3.2.4. Analyse des expériences de FRAP :.....	60
3.2.5. Traitement par des drogues :.....	61
3.3. Immunofluorescence :.....	61
3.4. Quantification de la F-actine par marquage avec phalloïdine et cytométrie en flux :.....	62
4. Résultats :	62
4.1. Une nouvelle approche pour étudier la mobilité des TCR par FRAP :.....	62
4.2. La mobilité des TCR est semblable chez des LT naïfs et activés	64
4.3. L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ affecte la mobilité des TCR au moyen d'un mécanisme faisant intervenir le cytosquelette d'actine :.....	66
4.4. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induit une augmentation de la polymérisation du cytosquelette d'actine :.....	68
4.5. La stimulation antigénique affecte la dynamique des TCR sur des LT vivants.....	70
4.6. Les TCR sont acheminés vers la Synapse Immunologique par le cytosquelette d'actine	73
5. Discussion	75
Conclusion générale :	79
Références bibliographiques :	81

Table des illustrations

- Figure 1 : Schéma de la membrane plasmique vue comme une « mosaïque fluide » (Singer et Nicolson, 1972).....21
- Figure 2 : Les modes de diffusion des constituants membranaires révèlent la compartimentalisation de la membrane plasmique.....24
- Figure 3 : Le modèle des « *Fences and Pickets* » explique la compartimentalisation des constituants de la membrane plasmique.....26
- Figure 4 : Structure de la portion extracellulaire d'un TCR cristallisé.....30
- Figure 5 : Composition et stabilité d'un complexe TCR/CD3.....32
- Figure 6 : Schéma explicatif du mode de génération du TCR.....34
- Figure 7 : Chronologie des événements se déroulant durant l'éducation thymique des LT.....36
- Figure 8 : Modalités de l'activation d'un LT suivant le modèle du « *kinetic segregation* ».....40
- Figure 9 : Activation du TCR suivant le modèle de l'hétérodimérisation.....42
- Figure 10 : Voies de signalisation activées suite à l'engagement du TCR.....46
- Figure 11 : Visualisation de la synapse immunologique.....48
- Figure 12 : Principe des techniques de FRAP.....63
- Figure 13 : La mobilité des TCR est indépendante du stade d'activation des LT.....65
- Figure 14 : La mobilité des TCR est affectée par l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$67
- Figure 15 : L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ induit la polymérisation de l'actine dans les PBL.....69
- Figure 16 : L'interaction des LT avec leur antigène spécifique affecte la dynamique du TCR72
- Figure 17 : les TCR peuvent suivre la F-actine vers la SI de façon indépendante de l'antigène.....74

Liste des abréviations employées

AP-1 : *Activator Protein-1*.

AM : AcetoxyMethyl.

CBTL : *Cord Blood T Lymphocytes*.

CD : Cluster of Differentiation.

CDR : *Complementary Determining Region* .

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes.

CRAC : *Calcium Release Activated Calcium Channel*.

cTEC : *cortical Thymic Epithelial Cells*.

Cy5 : Cyanine 5.

DAG : DiAcyl Glycérol.

DIG : *Detergent Insoluble Glycolipid-enriched complexes*.

DN : Double Négatif.

DP : Double Positif.

EBV : *Epstein-Barr Virus*.

Erk : *Extracellular regulated kinase*.

Fab : *antigen-binding Fragment*.

FACS : *Fluorescence Activated Cell Sorting*.

FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy.

FITC: *Fluorescein IsoThioCyanate*.

FLIP : *Fluorescence Loss In Photobleaching*.

FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching.

GFP : *Green Fluorescence Protein*.

GPI : Glycophosphatidyl Inositol.

IFN : Interféron.

Ig : Immunoglobuline.

IL : Interleukine.

IP3. Inositol 1,4,5-triPhosphate

ITAM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*.

JNK : *Jun N-terminal Kinase*.

LAT : *Linker for T cells Activation*.

LFA-1 : *Leukocyte Function-Associated Antigen 1*.

LT : Lymphocyte T.
LTc : Lymphocyte T cytotoxique
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*.
MAPKK : *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*.
MAPKKK : *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*.
Mek : *MAP Erk kinase*.
Mf : fraction Mobile.
mTEC : *medullary Thymic Epithelial Cells*.
NFAT : *Nuclear Factor for Activated T cells*.
NGF : *Nerve Growth Fractor*
PBL : *Peripheral Blood Lymphocyte*.
pCMH : complexe peptide-CMH.
PDZ : *Post-synaptic density 95, Disc large , Zonula occludens-1*.
PFA : Paraformaldéhyde.
PH : *Plekstrin Homology*
PI3K : *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase*.
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.
PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PTyr : Phospho Tyrosine.
RE : Réticulum Endoplasmique.
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*.
SEM : *Standard Error to the Mean*.
SH2 : Sarcome de Roux *Homology 2*.
SH3 : Sarcome de Roux *Homology 3*.
SI : Synapse Immunologique.
SLP-76 : *SH2-containing Leukocytes Protein of 76 kDa*.
SMAC : *Supra Molecular Activation Cluster*.
SP : Simple Positif.
SPT : *Single Particle Tracking*.
SVF : Sérum Foetal de Veau.
TdT : Terminal Deoxynucléotide Transferase.
TCR : *T Cell Receptor*.
TNF : *Tumor Necrosis Factor*.
ZAP-70 : *Zeta chain Associated Preotein of 70 kDa*.

Première partie : Un aperçu de la
dynamique des membranes plasmiques.
Implications pour le TCR.

1. Dynamique membranaire et mobilité des éléments de surface

L'objectif de ce premier chapitre n'est pas de réaliser une revue exhaustive de la biologie des membranes, mais de simplement rappeler quelques étapes dans la compréhension des mécanismes favorisant ou restreignant la diffusion latérale des protéines au sein de la membrane plasmique.

1.1. La mosaïque fluide :

En 1974, Singer et Nicolson proposent un modèle général décrivant la structure des membranes cellulaires et notamment de la membrane plasmique (Singer and Nicolson, 1972). Cette dernière est présentée comme une « mosaïque fluide ». La membrane est formée par une bicouche de phospholipides exposant leur tête polaire au milieu aqueux environnant et protégeant leur queue hydrophobe. Les protéines faisant partie de la membrane sont plus ou moins profondément ancrées dans cette bicouche soit dans sa périphérie (protéines périphériques) soit en la traversant (protéines intégrales). Des interactions de faible énergie avec les phospholipides environnants stabilisent les protéines dans la bicouche. Les phospholipides constituent la matrice de la membrane, lui conférant un caractère fluide rendant possibles les mouvements de translation des protéines membranaires, autrement dit leur diffusion latérale (Figure 1). Cette diffusion latérale est libre, *i.e.* simplement produite par les mouvements browniens. La diffusion latérale des protéines a ainsi pu être modélisée en se basant sur l'hypothèse de la mosaïque fluide (Saffman and Delbruck, 1975).

La diffusion latérale de protéines au sein de membranes cellulaires ou artificielles a pu être déterminé en utilisant la technique de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) (Axelrod et al., 1976). Cette diffusion latérale est en général quantifiée par le coefficient de diffusion, grandeur exprimée en $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

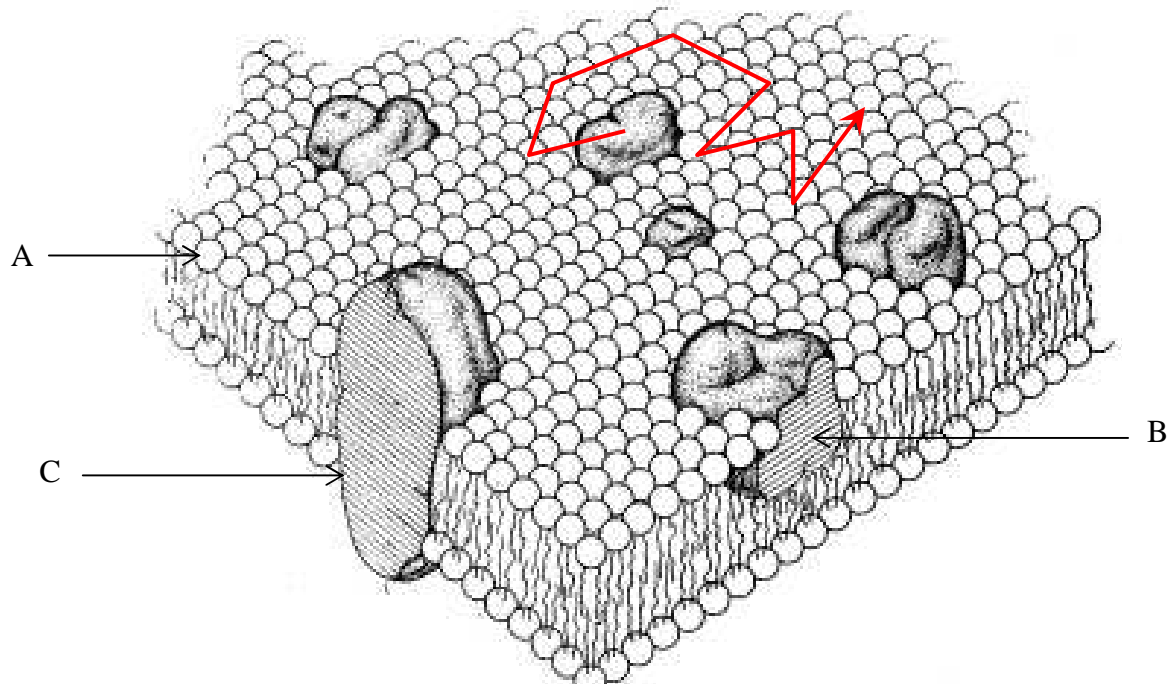


Figure 1 : Schéma de la membrane plasmique vue comme une « mosaïque fluide » (Singer and Nicolson, 1972).

Selon ce modèle de structure de la membrane plasmique, la matrice de la membrane est constituée de phospholipides (A) qui autorisent la diffusion latérale des protéines au cours du temps (représentée par la flèche rouge), présentes soit sous forme de protéines périphériques (B) ou de protéines dites transmembranaires ou intégrales (C).

D'après (Singer and Nicolson, 1972).

1.2. Limites au modèle de la mosaïque fluide :

Deux faits expérimentaux sont rapidement entrés en contradiction avec des prédictions issues du précédent modèle.

Premièrement, les mesures effectuées sur diverses protéines au sein de membranes cellulaires ont révélé un coefficient de diffusion nettement inférieur, d'un facteur 5 à 50, à celui des mêmes protéines mais mesuré au sein de membranes artificielles ((Kusumi et al., 2005), (Jacobson et al., 1987)). C'est seulement dans ce dernier cas que les constantes de diffusion des protéines correspondent aux valeurs attendues d'après la modélisation de Saffman. Des mécanismes agissent donc au sein des membranes cellulaires pour restreindre la diffusion des protéines. En outre, certaines protéines, tels les récepteurs à l'acétylcholine situés sur la zone post-synaptique des myocytes sont totalement immobiles (Tank et al., 1982). En revanche, des protéines situées au sein de bourgeonnements membranaires non soutenues par le cytosquelette d'actine possèdent une diffusion comparable à celle observée dans des membranes artificielles (Tank et al., 1982).

Deuxièmement, d'après le modèle proposé par Saffman et Delbrück, la diffusion d'un constituant protéique dans la membrane ne dépend pratiquement pas de sa taille. Ce fait a été vérifié dans des membranes artificielles (Peters and Cherry, 1982). On pourrait ainsi s'attendre à ce que suite à la formation d'un oligomère, il n'y ait pas de différence entre les caractéristiques de diffusion de l'édifice et celles du constituant initial. Cette prédiction s'est néanmoins vue contredite par diverses études portant sur la dynamique de récepteurs aux hormones (Nelson et al., 1999; Roess et al., 2000).

Ces observations convergent pour soutenir l'idée que la diffusion des protéines au sein de la membrane plasmique n'est pas libre : des contraintes (dont la nature sera précisée plus loin) restreignent cette diffusion.

1.3. Compartimentalisation par des barrières cytoplasmiques

L'étude de la protéine bande 3 des hématies (Sheetz et al., 1980) a permis de révéler que la diffusion de cette protéine au sein de la membrane plasmique était restreint par le réseau sous-membranaire constitué par une protéine nommée spectrine. Ce système est néanmoins

particulier aux hématies et l'on ne retrouve pas un tel réseau de spectrine dans d'autres types cellulaires.

Edidin montre en 1991 que des molécules ne différant que par leur mode d'ancrage à la membrane diffèrent également dans leur mobilité latérale: seule celle possédant un domaine cytoplasmique voit sa diffusion latérale restreinte, ce qui suggère l'existence de barrières cytoplasmiques contrariant la libre diffusion des protéines (Edidin et al., 1991). Une approche similaire, employant des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) mutées afin de posséder un domaine cytoplasmique de taille plus ou moins grande, a conduit à des conclusions similaires : des mesures par FRAP ainsi que l'emploi de « pinces optiques » (une méthode qui permet à l'aide d'un laser focalisé sur un objet, par exemple une bille microscopique, d'exercer une force sur cet objet) ont montré que la diffusion des molécules augmentait lorsque la taille de leur domaine cytoplasmique diminuait, de sorte que des barrières cytoplasmiques à la diffusion, situées à environ 2-3 nm sous la membrane plasmique, pouvaient être responsables de ce comportement (Edidin et al., 1994).

Des études menées en parallèle et employant du Suivi de particule isolée (*Single Particle Tracking*, SPT) à hautes résolutions temporelle (l'intervalle entre deux images étant de 33 ms) et spatiale ont conduit à des observations complémentaires (Figure 2). Au cours de ces études, le mouvement de diffusion des constituants membranaires est classé en différentes catégories : diffusion restreinte (la diffusion de la particule est limitée dans l'espace, comme si celle-ci était restreinte par un obstacle physique), diffusion stationnaire (la particule semble immobile) et diffusion libre (la diffusion de la particule ne subit aucune entrave). L'observation dans le temps permet de mettre en évidence l'alternance de « longues » (environ 30 s) périodes de diffusion restreinte et de brèves périodes de diffusion libre (Figure 2A) ((Kusumi et al., 1993), (Sako and Kusumi, 1994)), que les auteurs ont nommé Diffusion Saltatoire (*Hop Diffusion*).

Ces observations ont conduit les auteurs à proposer le modèle des « enclos du cytosquelette membranaire » (« *membrane skeleton fence* », (Kusumi et al., 1993) (Figure 2B) qui explique que c'est la compartimentalisation de la membrane plasmique qui est à l'origine de ces observations : le cytosquelette forme un réseau sous-membranaire qui confine les protéines dans des domaines d'environ 300-600 nm de côté, expliquant la diffusion restreinte.

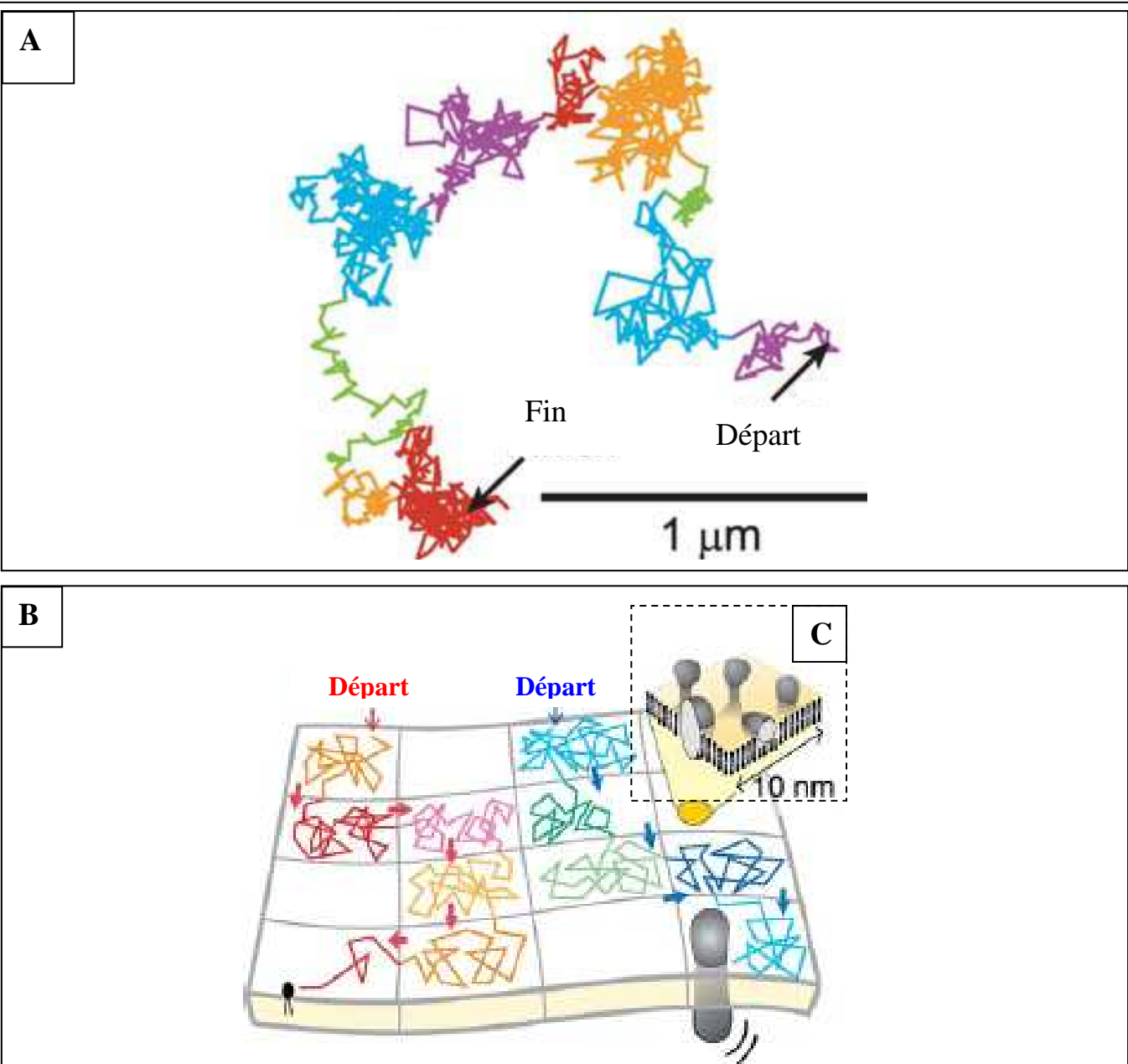


Figure 2 : Les modes de diffusion des constituants membranaires révèlent la compartimentalisation de la membrane plasmique.

A - La diffusion d'un constituant de la membrane plasmique (ici un phospholipide) marqué par une particule d'or colloïdale et suivi à haute résolution temporelle (25 μs) révèle le caractère alternativement restreint et rapide de cette diffusion. Ce phénomène de « *Hop-diffusion* », observé sur les protéines ainsi que les lipides membranaires, révèle la compartimentalisation de la membrane plasmique.

B - Le modèle du « *Membrane Skeleton Fence* » explique le caractère alternativement restreint et libre de la mobilité des constituants membranaires : la molécule, qu'elle soit une protéine transmembranaire (bleu) ou un phospholipide (rouge), est la plupart du temps confinée à l'intérieur d'un compartiment, ce qui explique les périodes de diffusion restreinte ; de temps-en-temps, elle franchit la limite entre deux compartiments (flèches bleu et rouge), ce qui se traduit par une brève période de diffusion libre.

C - Le détail montre à quelle échelle le modèle de la mosaïque fluide (Cf. Figure 1), selon lequel la diffusion latérale est libre au sein de la membrane, reste applicable en termes de mobilité des constituants membranaires.

D'après (Kusumi et al., 2005)

La constante réorganisation du cytosquelette ainsi que les fluctuations de la distance entre réseau sous-membranaire et membrane autorise le « saut » occasionnel d'un compartiment à un compartiment adjacent, expliquant la diffusion libre. L'occasionnelle liaison d'une protéine au cytosquelette explique le mode de diffusion stationnaire (cas du complexe E-cadhérine/caténine/actine, (Kusumi et al., 1993; Tomishige et al., 1998)).

L'observation que tous les constituants de la membrane, y compris des phospholipides (Fujiwara et al., 2002), sont soumis au phénomène de diffusion saltatoire a amené les auteurs à compléter le modèle du « *membrane skeleton fence* » pour prendre en compte le rôle des protéines transmembranaires ancrées au cytosquelette d'actine qui se comportent comme autant de « piquets » et contribuent à la restriction de diffusion des constituants membranaires. Le modèle résultant est nommé « *Fences and Pickets model* » (Figure 3 A et B) (Kusumi et al., 2005; Murase et al., 2004).

1.4. Rôle potentiel des microdomaines lipidiques :

Beaucoup de faits autour des microdomaines lipidiques (ou *lipid rafts*) sont encore sujets à controverse, que ce soit concernant leur existence, leur taille ou leur demi-vie d'existence. Sans entrer dans les détails, il semble souhaitable de souligner dans quelle mesure ces microdomaines peuvent contribuer à la compréhension de la mobilité des constituants membranaires.

Les microdomaines lipidiques (*lipid rafts*) sont définis en 1997 par Simons et Ikonen (Simons and Ikonen, 1997). Cette notion est basée sur une définition opérationnelle : les constituants des « *lipid rafts* » sont insolubles à 4°C dans le Triton X-100 (un détergent non ionique), ce qui forme des DIG (pour *Detergent Insoluble Glycolipid-enriched Complexes*). Cette fraction est enrichie en cholestérol et en sphingolipides, ce qui confère une faible densité durant la centrifugation sur gradient de sucrose. Des protéines possédant une ancre Glycophosphatidyl Inositol (GPI), des protéines doublement acylées par des acides gras saturés (*e.g.* la protéine kinase Fyn) se retrouvent dans les DIG.

Bien que ce point fasse encore l'objet de débats, il apparaît, suite à des études par FRAP (Kenworthy et al., 2004), que l'appartenance à des micro-domaines lipidiques n'influe pas sur la mobilité à grande échelle (de l'ordre du micromètre) des protéines membranaires.

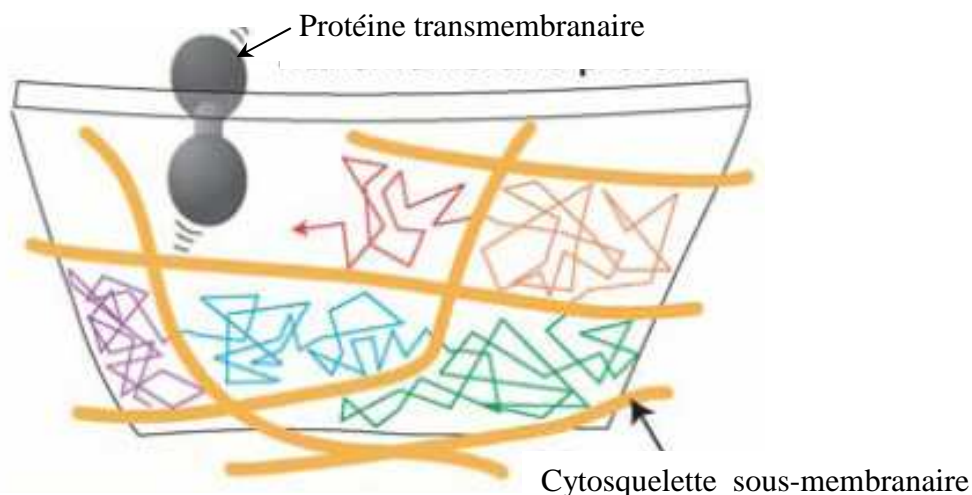
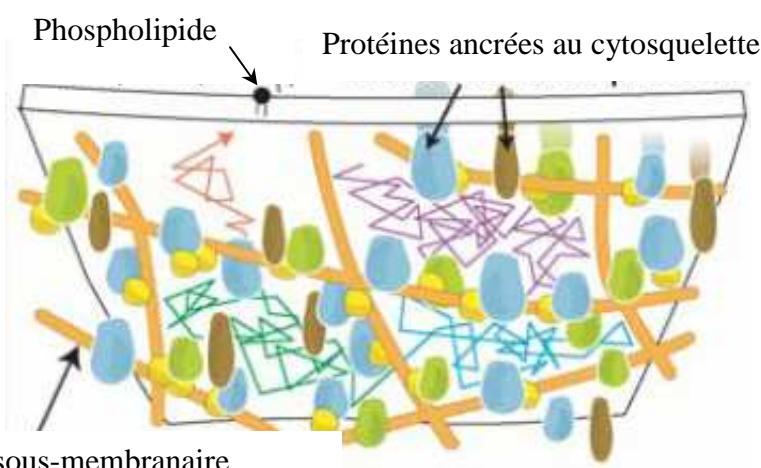
A**B**

Figure 3 : le modèle des « Fences and Pickets » explique la compartimentalisation des constituants de la membrane plasmique.

Le modèle des « Fences and Pickets » prend en compte la contribution de deux types de phénomènes pour expliquer le type de mobilité latérale observé par les constituants membranaires et le phénomène de « Hop-diffusion » :

A – Le réseau sous-membranaire d'actine constitue un obstacle élastique (*fence*) à la diffusion des constituants membranaires comportant un domaine cytoplasmique.

B – Les protéines ancrées au cytosquelette d'actine (*pickets*) forment autant d'obstacles contre lesquels viennent buter tous les constituants membranaires.

D'après (Kusumi et al., 2005)

Ces conclusions rejoignent celles d'études menées par FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*) montrant que l'existence de microdomaines lipidiques peut restreindre la mobilité des protéines membranaires à l'échelle submicrométrique (Lenne et al., 2006) : les protéines associées à ces domaines seraient dynamiquement incluses et exclues de ceux-ci et n'y demeureraient que peu de temps (de l'ordre de la ms).

1.5. Transport dirigé de protéines en surface de cellules :

Jusqu'ici, seuls des mécanismes responsables d'une restriction de la mobilité latérale de protéines ont été présentés. Néanmoins, certains cas témoignent d'une augmentation de la mobilité de protéines membranaires. Ainsi, la diffusion et la mobilité linéaire de $\beta 2$ intégrines augmente lorsque le cône de croissance axonal de neurites est soumis à un traitement par du *Neural Growth Factor* (NGF) (Grabham et al., 2000). Ce phénomène dépend de l'intégrité du cytosquelette d'actine et semble nécessiter l'intervention de la myosine de type II. Une liaison directe a par ailleurs été mise en évidence entre la Myosine X et la $\beta 2$ intégrine, ce qui suggère l'existence de mécanismes de transport actif de composants membranaires en surface des cellules par l'intermédiaire de moteurs moléculaires (Zhang et al., 2004).

Le phénomène de repolarisation de l'intégrine LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen 1*) est par ailleurs bien documenté pour les lymphocytes T lors de leur interaction avec une Cellule Présentatrice d'Antigènes (CPA) présentant des peptides agonistes (Wulfing and Davis, 1998).

Enfin, l'observation de LT en interaction avec une bicouche lipidique présentant des complexes peptide-CMH agonistes a révélé que les « *microclusters* » de TCR (cf. infra) convergent vers le centre de la zone de contact, témoignant d'un transport dirigé (Varma et al., 2006; Yokosuka et al., 2005). Les mécanismes à l'origine de ce phénomène demeurent flous même si une mobilité explicable par des moteurs moléculaires a déjà été recherchée (Jacobelli et al., 2004; Moss et al., 2002).

1.6. Une vision actuelle de la membrane plasmique :

La vision de l'organisation de la membrane plasmique a évolué depuis le modèle de la mosaïque fluide : celle-ci ne constitue pas un continuum en deux-dimensions au sein duquel les protéines membranaires diffusent librement. Des contraintes agissent et restreignent la

mobilité des constituants membranaires et particulièrement des protéines. Ces contraintes ont divers supports physiques : la matrice-extra-cellulaire pourrait agir *via* la portion extra-cellulaire des protéines. La partition de la membrane plasmique, plus précisément l'existence de micro-domaines lipidiques pourrait influencer le déplacement des protéines en fonction de leur mode d'ancrage ainsi que de la séquence en acides aminés de leur portion transmembranaire. Enfin, le cytosquelette d'actine agirait par deux moyens : en formant un réseau, il limiterait par répulsion stérique la diffusion des protéines *via* leur domaine cytoplasmique ; de plus, en permettant l'ancrage de protéines par liaison directe ou indirecte au cytosquelette, il créerait autant de « piquets » relativement peu mobiles et contre lesquels viendraient butter tous les constituants membranaires, ce qui contribuerait à limiter leur diffusion latérale.

La mobilité des constituants membranaires est hautement variable dans le temps comme dans l'espace. Un exemple frappant est fourni par l'intégrine LFA-1 qui, sur un lymphocyte T en migration, est immobile au niveau des points focaux d'adhésion au substrat mais est capable de diffuser au sein de l'uropode (la région postérieure du lymphocyte en migration).

La partition de la membrane a par ailleurs des conséquences sur les fonctions de la membrane plasmique : elle permet l'organisation baso-apicale des cellules organisées en épithélium ; elle rend aussi possible la transduction de signaux et ainsi que l'organisation d'édifices macro-moléculaires. Par exemple, l'oligomérisation du récepteur en réponse à la liaison de son ligand hormone ralentit la diffusion latérale de l'édifice (Nelson et al., 1999; Roess et al., 2000), ce qui peut favoriser la liaison de molécules capables de transduire le signal dans le cytoplasme.

Les modalités d'organisation de la membrane plasmique peuvent moduler le comportement dynamique des constituants membranaires comme par exemple celui du TCR dans le cas de figure des Lymphocytes T (LT).

2. Lymphocytes T et TCR

Le propos de ce chapitre est de décrire les caractéristiques importantes relatives au TCR afin de comprendre comment ceux-ci peuvent influencer sa dynamique en surface des LT.

2.1. Le TCR

Le TCR (pour *T Cell Receptor*) ou Récepteur à l'Antigène des Lymphocytes T joue le rôle de « module de reconnaissance » des antigènes lorsque ceux-ci sont présentés dans le contexte du CMH. Nous nous focaliserons sur le TCR des LT $\alpha\beta$, qui représentent la majorité (95%) des LT de l'organisme et omettrons le TCR des LT $\gamma\delta$.

2.1.1. Structure

Le TCR est un hétérodimère comportant une chaîne α et une chaîne β , chacune étant une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la super-famille des Immunoglobulines (Ig). Le domaine N-terminal, extra-cellulaire, de chaque chaîne comporte une région constante (C) ainsi qu'une région variable (V) séparées par une région charnière (*cf. infra* le mode de génération de la région variable). Le domaine transmembranaire, hydrophobe, comporte des acides aminés chargés positivement, fait essentiel à la formation du complexe avec le CD3 (*cf. infra*). Le domaine cytoplasmique, court et ne comportant qu'entre trois et douze acides aminés, est dépourvu d'activité enzymatique (Bentley and Mariuzza, 1996). Les deux chaînes sont unies de façon covalente par un pont disulfure.

Le module de reconnaissance de l'antigène est formé par l'association des domaines V des chaînes α et β ($V\alpha$ et $V\beta$). Plus précisément, on trouve au sein de chaque région V des domaines hypervariables nommées « *Complementary Determining Region* » ou CDR (par analogie aux régions CDR des Immunoglobulines) (Figure 4). Les CDR 1 et 2 se lient au CMH tandis que les CDR3 se lient au peptide antigénique (Jorgensen et al., 1992; Sant'Angelo et al., 1996).

L'hétérodimère $\alpha\beta$ est responsable de la reconnaissance du peptide antigénique ; néanmoins, son court domaine cytoplasmique ne permet pas de transduction du signal suite à la reconnaissance du signal : ce rôle est dévolu au complexe CD3.

2.1.2. Le complexe CD3-TCR

Le CD3, module de transduction du signal associé au TCR, est un complexe se composant de six sous-unités constituées par les chaînes γ , δ , ϵ et ζ : un complexe CD3

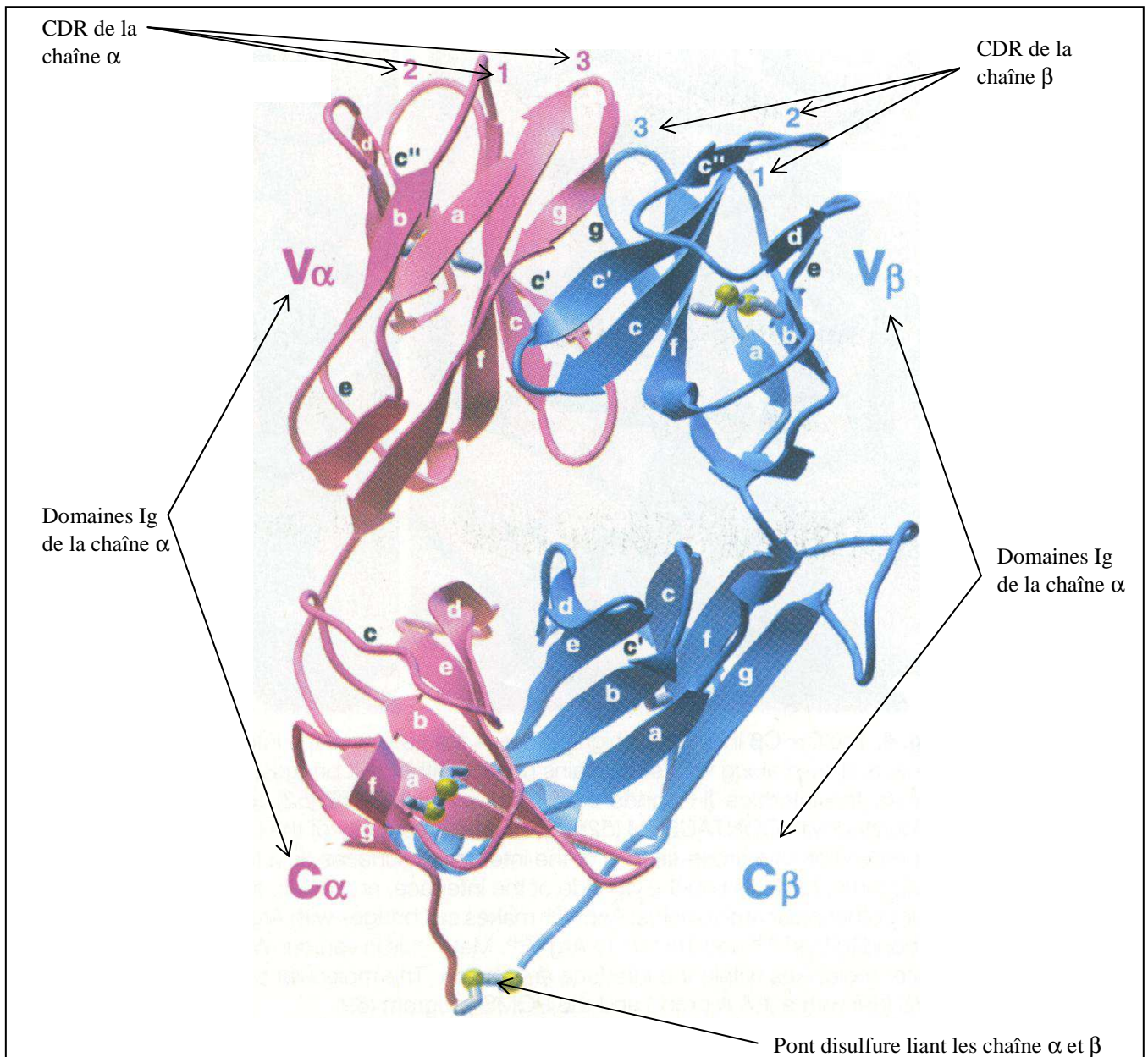


Figure 4 : Structure de la portion extracellulaire d'un TCR cristallisé.

Le TCR se compose de deux chaînes nommées respectivement α et β . Chacune des chaînes α (rose) et β (bleu) comporte une région constante (respectivement $C\alpha$ et $C\beta$) ainsi qu'une région variable (respectivement $V\alpha$ et $V\beta$). Au sein de cette dernière, les CDR 1, 2 et 3 sont le siège de la reconnaissance du peptide antigénique présenté par le CMH : à noter la position externe des CDR 1 et 2 qui permet l'interaction avec le CMH tandis que les CDR 3, plus internes, viennent reconnaître le peptide présenté par le CMH.

D'après (Bentley and Mariuzza, 1996)

comporte un hétérodimère $\gamma\epsilon$, un hétérodimère $\delta\epsilon$ ainsi qu'un homodimère $\zeta\zeta$ (Rudolph et al., 2006; Schumacher, 2002). Les chaînes γ , δ et ϵ comportent un domaine Ig en position extracellulaire alors que les chaînes ζ en sont dépourvues. Toutes les chaînes possèdent un domaine transmembranaire comprenant des acides aminés hydrophobes chargés négativement : cette propriété permet l'association des chaînes composant le CD3 au TCR (Figure 5). Les domaines cytoplasmiques des chaînes du CD3 renferment des motifs dits ITAM (pour *Immunoreceptor Tyrosines-based Activation Motif*), consistant en une séquence $YxxL(x)_{6-8}YxxL$. Plus précisément, les chaînes γ , δ et ϵ possèdent chacune un ITAM tandis que les chaînes ζ en comportent trois (Samelson et al., 1985). Les ITAM sont indispensables à la transduction du signal survenant après engagement du TCR : leur phosphorylation permet le recrutement de protéines impliquées dans la signalisation en aval du TCR (*cf. infra*).

Le complexe CD3 permet aussi une expression stable du TCR en surface des cellules. En effet, la formation du complexe TCR/CD3 s'effectue au sein du Réticulum Endoplasmique et suit une chronologie rigoureuse : un hétérodimère $\delta\epsilon$ se lie à la chaîne α du TCR ; d'autre part, un hétérodimère $\gamma\epsilon$ se lie à la chaîne β du TCR ; enfin, les deux chaînes du TCR sont liées par la formation d'un pont disulfure. L'hexamère $TCR\alpha\beta CD3\gamma\epsilon CD3\delta\epsilon$ résultant se lie enfin à un homodimère $\zeta\zeta$. Le complexe résultant est exporté à la surface des cellules (Alarcon et al., 1988; Huppa and Ploegh, 1997), où il demeure plusieurs heures avant d'être endocyté (Liu et al., 2000)

2.1.3. Organisation et recombinaison des gènes codant pour le TCR $\alpha\beta$

La structure du TCR au niveau des régions variables diffère d'un clone de LT à l'autre. L'ensemble des structures de TCR existant chez un individu détermine le répertoire T de cet individu ; on estime que l'étendue de ce répertoire est énorme, de l'ordre de 10^{13} .

L'unicité d'un TCR donné est obtenue au moyen de la recombinaison somatique des gènes codant pour le TCR ; cet événement se déroule au cours de l'ontogenèse des TCR, dans le thymus. Ce processus est très semblable dans son principe au réarrangement des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines. Chronologiquement, la recombinaison concerne d'abord la chaîne β du TCR; si cette première étape est fructueuse, le LT effectue celle du gène codant pour la chaîne α du TCR. La « qualité » de l'édifice est contrôlée par le processus des sélections thymiques (*cf. infra*).

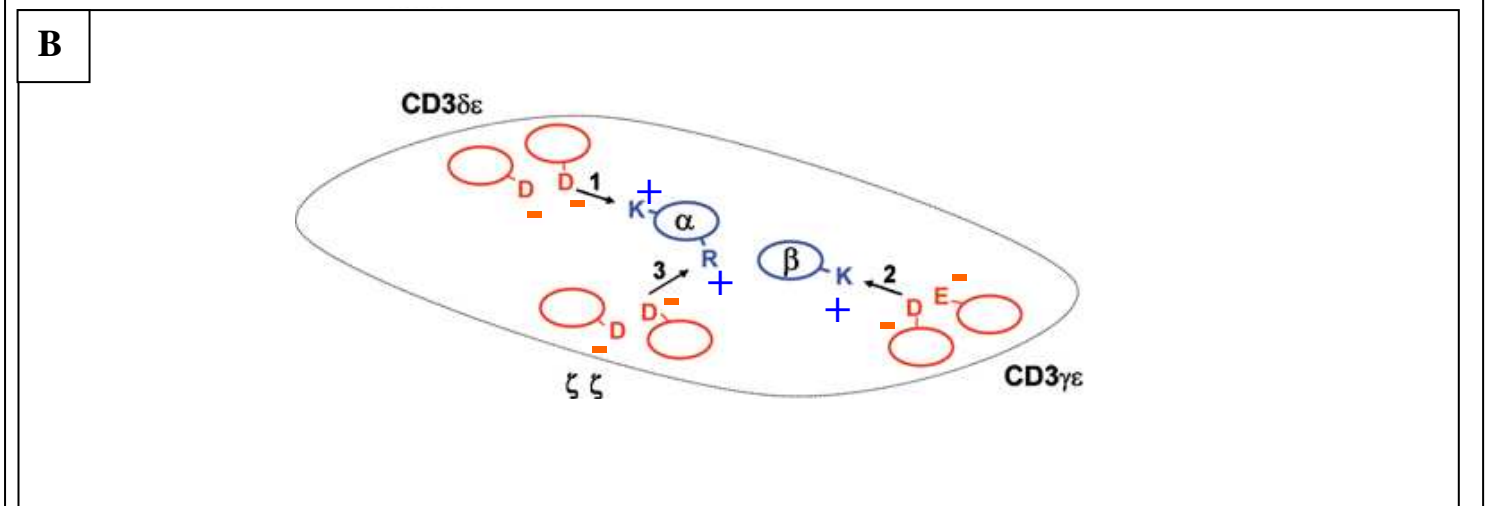
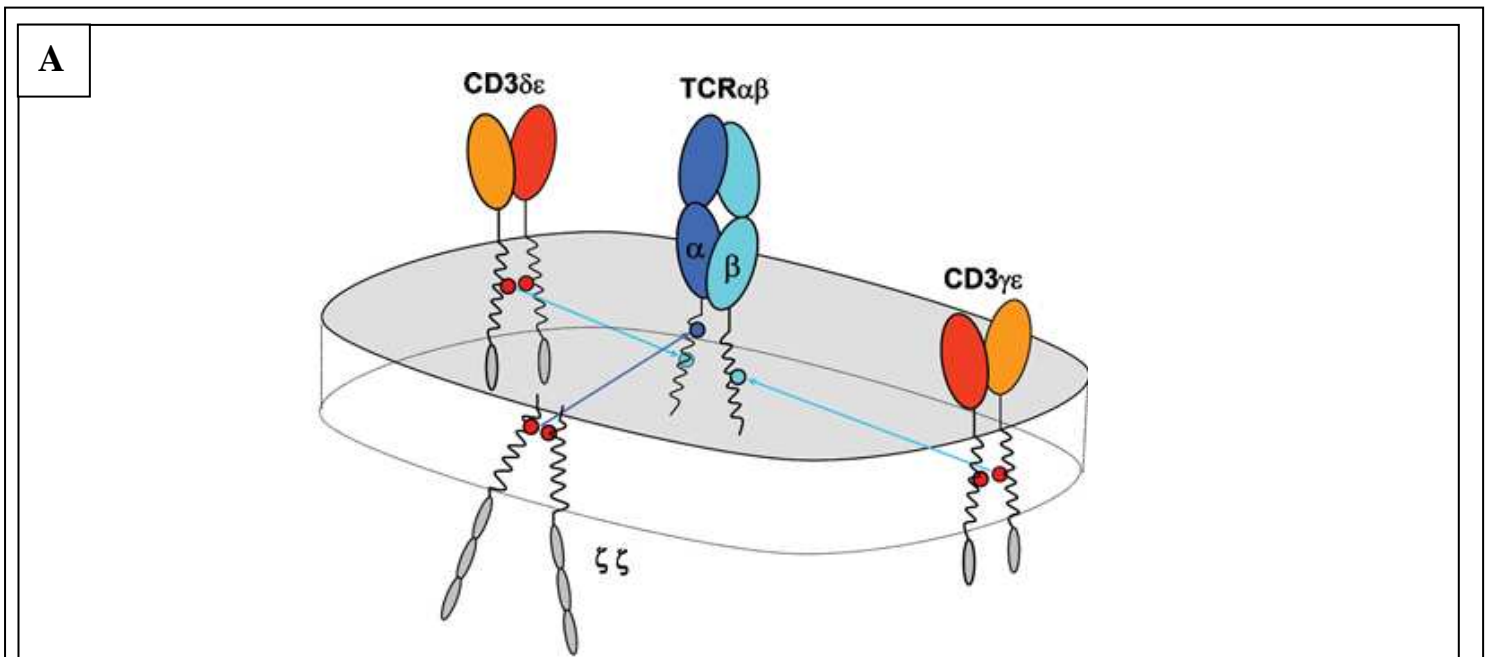


Figure 5 : Composition et stabilité du complexe TCR/CD3.

A - Un complexe TCR/CD3 se compose d'un ensemble TCR $\alpha\beta$, d'une hétérodimère $\delta\epsilon$, d'un hétérodimère $\gamma\epsilon$ ainsi que d'un homodimère $\zeta\zeta$. Les ITAM des chaînes qui en composent sont représentés en gris.

B - La charge des chaînes latérale des acides aminés transmembranaires des différentes chaînes (représentée en rouge ou bleu) explique l'association stable du complexe TCR/CD3. Chacun des résidus chargés positivement du domaine transmembranaire des chaînes α ou β du TCR permet l'association distincte et spécifique avec un dimère de composants du CD3 : la Lysine (K) de la chaîne α permet l'association au dimère $\delta\epsilon$, l'Arginine (R) de cette même chaîne permet l'association au dimère $\zeta\zeta$ tandis que la Lysine de la chaîne β permet l'association au dimère $\gamma\epsilon$.

D'après Call et al., 2005

Dans leur configuration germinale, les gènes codant pour les chaînes α et β du TCR comportent des groupes de segments V (variable), D (diversité, pour la chaîne β seulement), J (jonctionnel) et C (constant) : c'est la combinaison aléatoire entre les segments V, (D), J et C qui détermine l'unicité du TCR (Figure 6) ; cette recombinaison est assurée par un complexe enzymatique nommée recombinaison (Nikolich-Zugich et al., 2004).

Plus précisément, la recombinaison passe par un clivage opéré au niveau de sites de reconnaissance, suivi de l'excision de nucléotides. La ligation est précédée par l'ajout de quelques nucléotides par la *Terminal Deoxynucléotide Transferase* (TdT) (diversité N). L'ensemble de ces mécanismes confère au répertoire T une grande étendue. En contrepartie, un grand nombre de réarrangements s'avèrent non fonctionnels et conduisent à la mort des cellules au sein desquels ils s'opèrent (*cf. infra*).

2.2. Conséquences de l'engagement des TCR sur la biologie des lymphocytes

T :

2.2.1. Education et sélection des LT :

L'engagement des TCR est indispensable à la survie des progéniteurs des lymphocytes ou thymocytes lors de leur maturation dans le thymus (Figure 7). Ces étapes permettent de s'assurer que la recombinaison somatique a produit un TCR correct. Les différentes étapes de la maturation des thymocytes peuvent être suivies par l'étude du niveau d'expression d'un certain nombre de marqueurs de surface, tels le CD4 et le CD8. On distingue ainsi des thymocytes Doubles Négatifs (DN), Doubles Positifs (DP) et Simples Positifs (SP). Une classification plus précise des DN est obtenue à l'aide de l'expression des marqueurs CD25 et CD44 (Figure 7). Lorsque les thymocytes, jusque là DN, expriment un TCR composé des chaînes α et β , ils deviennent DP : les sélections s'opèrent alors.

En premier lieu, une sélection dite positive s'opère dans le cortex thymique : les thymocytes DP capables d'interagir avec les complexes peptide-CMH présentés par les Cellules Epithéliales Corticales Thymiques (cTEC) reçoivent un signal de survie (Bouso et al 2002) et entament une migration vers la médulla thymique. Les autres meurent par négligence.

Les thymocytes ayant atteint la médulla thymique subissent alors le processus de sélection négative : ils entrent en contact avec des cellules médullaires thymiques (mTEC) ainsi que des

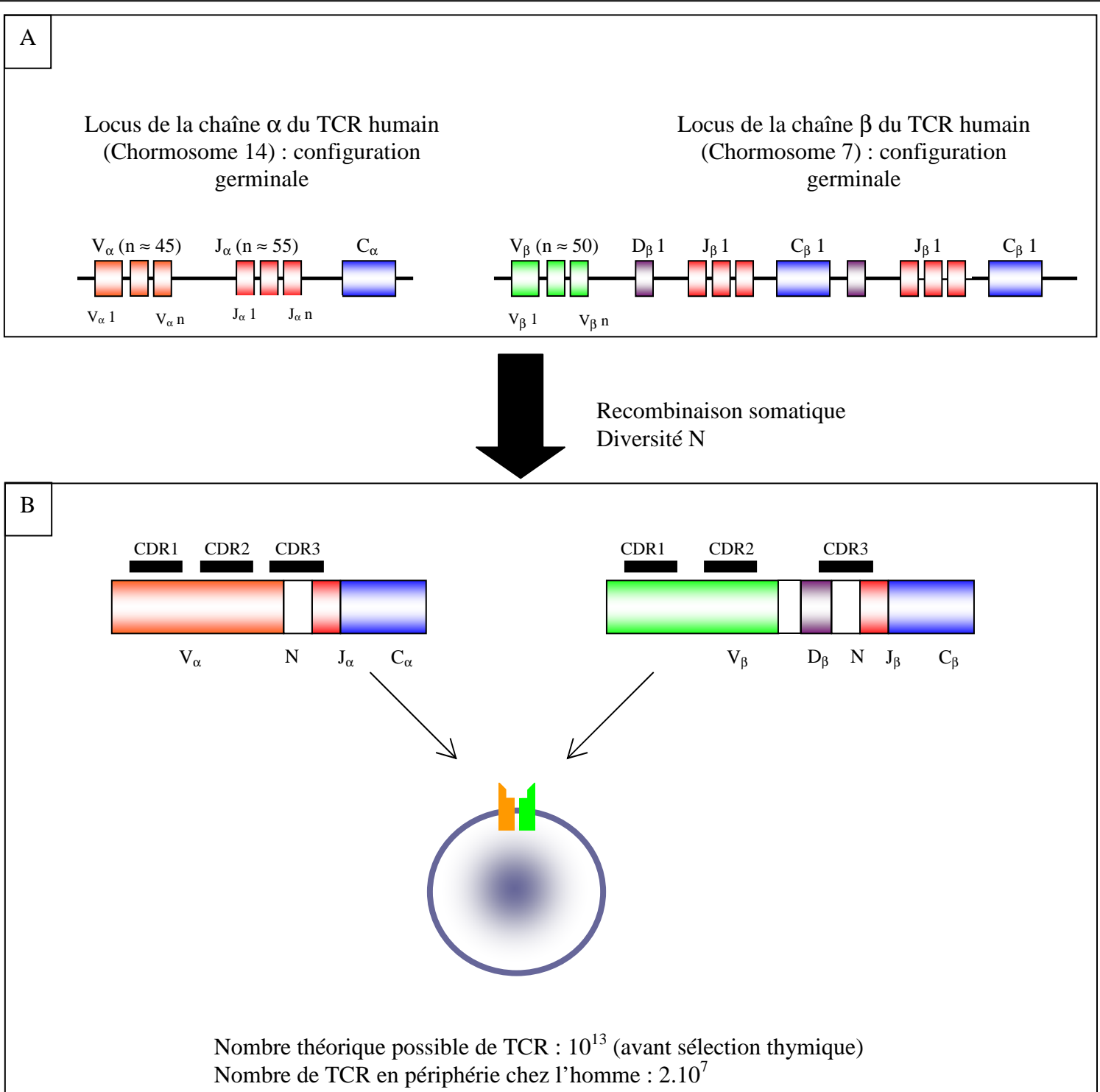


Figure 6 : Schéma explicatif du mode de recombinaison du TCR.

A - Le locus de la chaîne α du TCR comporte de nombreux segments codant pour la région variable ($V\alpha$) ainsi que la région Jonctionnelle ($J\alpha$) entre région variable et région constante ($C\alpha$). L'organisation du locus de la chaîne β du TCR est similaire, avec en plus des segments $D\beta$ (Diversité).

B - La recombinaison somatique consiste en l'excision de certains segments suivie de l'aboutement des régions flanquantes : la mise bout-à-bout aléatoire d'un segment V (avec un segment D pour la chaîne β) avec un segment J et un segment C permet de générer de nombreuses combinaisons possibles pour chaque chaîne du TCR. Les régions N, qui sont générées au cours du processus de recombinaison, ajoutent à la diversité possible. Les CDR de chaque chaîne sont localisés (trait noir).

cellules dendritiques issues de la moelle osseuse. Ces populations cellulaires présentent à leur surface, en association avec leur CMH, des peptides issus de protéines présentes dans tout l'organisme. Les thymocytes dont les TCR interagissent avec une trop forte affinité avec ces peptides subissent une anergie ou entrent en apoptose. Les thymocytes dont les TCR s'avèrent « moyennement » affins pour ces complexes peuvent gagner la périphérie : ce sont dès lors des lymphocytes T naïfs CD4⁺ ou CD8⁺.

Les processus de sélection permettent de s'assurer de la fonctionnalité et de l'innocuité des TCR générés lors de la recombinaison somatique. Plus précisément, la sélection positive constitue un premier filtre permettant de ne retenir que les thymocytes ayant généré un TCR fonctionnel. La sélection négative, quant à elle, permet d'inactiver voire d'éliminer les thymocytes dont les TCR reconnaissent avec une trop forte affinité des peptides issus du soi, ce qui rend ces cellules potentiellement auto-réactives et donc dangereuses. Ce dernier processus n'est toutefois pas d'une efficacité absolue : des mécanismes assurant la tolérance en périphérie permettent d'y suppléer.

2.2.2. Mise en place de la réponse immunitaire adaptative :

La reconnaissance d'un peptide antigénique par les TCR des lymphocytes T CD4⁺ est indispensable à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Suite à l'engagement de leur TCR dans le contexte d'une bonne costimulation par les CPA (*e.g.* engagement du CD28 exprimé par les LT par le CD80 ou le CD86 exprimé par la CPA), les LT amorcent une prolifération et une différenciation en LT auxiliaires (*helpers*). Suivant la nature du pathogène ainsi du contexte, plusieurs profils de différenciation sont possibles : T_H1, T_H2, T_H17. Quel que soit le profil d'orientation, les LT auxiliaires permettent la prolifération et l'activation des types cellulaires effecteurs capables de détruire le pathogène à l'origine de la stimulation.

2.2.3. LT cytotoxiques et lyse cellulaire

Suite à leur activation par des CPA et des LT auxiliaires, les LT CD8⁺ se différencient en LT cytotoxiques. Ceux-ci peuvent, en réponse à la reconnaissance du peptide antigénique à l'origine de leur activation, induire la lyse cellulaire des cellules présentant ce peptide. Notons que dans ce contexte, l'engagement du TCR est crucial. Il a par ailleurs été montré que seulement 1 à 2 peptides antigéniques présentés en surface d'une cellule-cible suffisent à

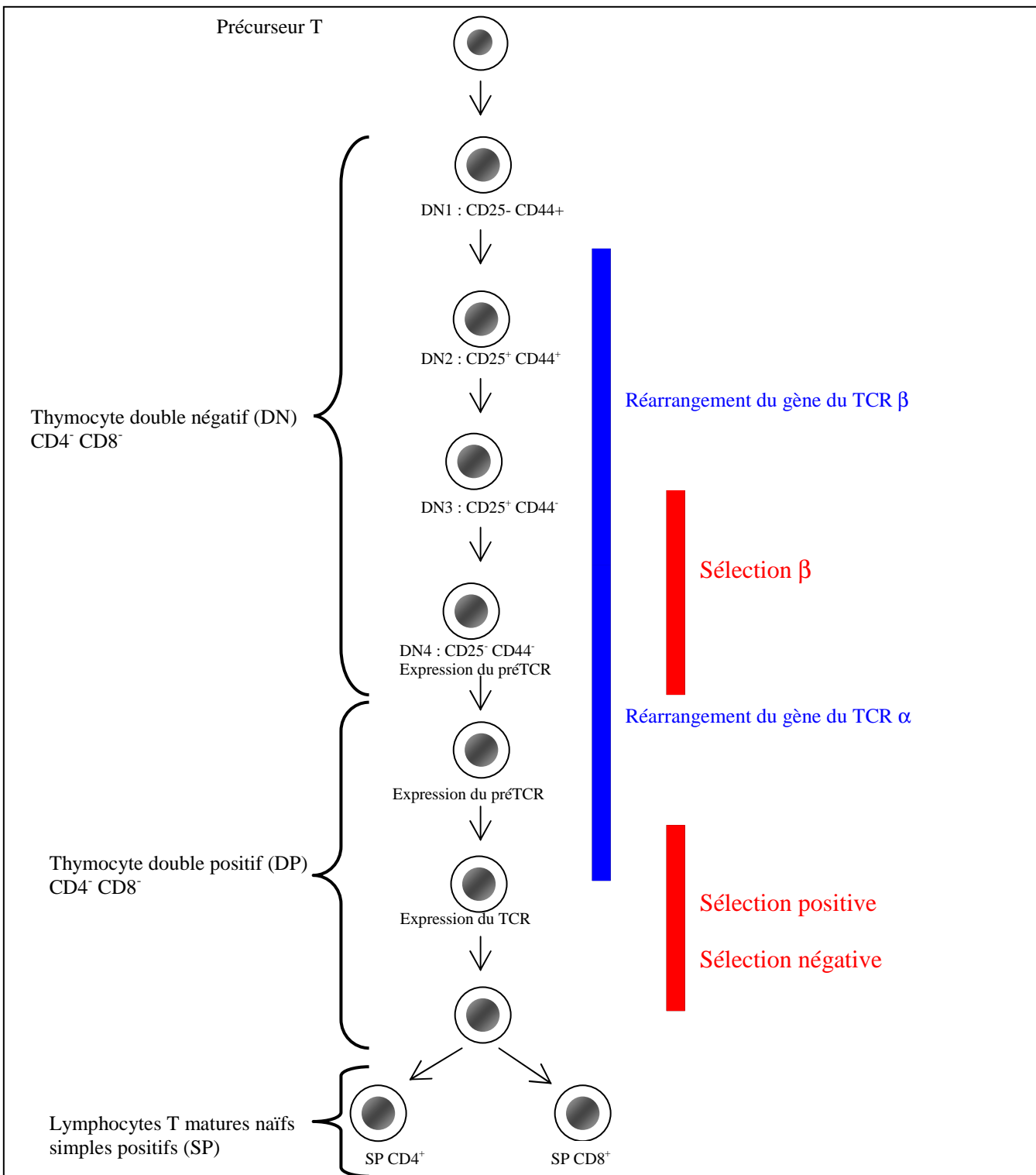


Figure 7 : Chronologie des événements se déroulant durant l'éducation thymique des LT.

Les différents stades de maturation des thymocytes sont marqués par l'évolution de l'expression de plusieurs marqueurs de surface : l'expression du CD4 et du CD8 permet une première classification en thymocytes Doubles Négatifs (DN), Doubles positifs (DP) et Simples Positifs (SP). Parmi les DN, l'expression de CD25 et de CD44 permet d'établir une chronologie plus fine : on distingue ainsi quatre stades DN notés DN1 à DN4.

Le TCR des thymocytes est généré par recombinaison somatique des gènes codant pour les deux chaînes composant le TCR : la chaîne β subit la recombinaison en premier : si son association avec la chaîne pTα (l'ensemble formant le pré-TCR) est correcte (sélection β), la recombinaison du gène de la chaîne α est initiée ; les thymocytes exprimant un TCR mature deviennent doubles positifs et peuvent alors subir les sélections positive et négative. Les cellules non délétées (lymphocytes T matures naïfs) quittent le thymus.

D'après (Sebzda et al., 1999)

déclencher la mise à mort de la cible (Irvine et al., 2002; Purbhoo et al., 2004; Sykulev et al., 1996) : cette donnée souligne la sensibilité de la reconnaissance effectuée par le TCR.

2.3. Le TCR, récepteur-clé du système immunitaire :

A la lumière de ces données, le TCR apparaît comme un récepteur dont la diversité est obtenue par un mécanisme original de recombinaison jouant sur un nombre immense de combinaisons possibles. Le TCR n'est qu'un module de reconnaissance ; pour être fonctionnel, il doit être couplé aux chaînes du CD3, ce complexe étant indispensable au bon développement et aux fonctions des LT $\alpha\beta$. L'engagement du TCR avec un complexe peptide-CMH est un événement prépondérant dans la physiologie du LT et qui est intensément étudié.

3. Engagement des TCR et signalisation

L'étude des caractéristiques de l'interaction entre TCR et complexes peptide-CMH est une étape nécessaire à la compréhension des mécanismes conduisant à l'activation des LT. Toutefois, il semble nécessaire de garder à l'esprit que ces études très fines se veulent simplificatrices : le TCR ainsi que les complexes peptide-CMH, normalement membranaires, se retrouvent sous forme solubilisée et le rôle de toutes les autres molécules de surface (qui modifient l'interaction due uniquement au TCR) est négligé. Ces conditions de travail appellent à une certaine critique lorsque l'on souhaite transposer les résultats obtenus à leur contexte physiologique.

Au cours de ce chapitre, quelques données importantes dans l'étude du TCR seront précisées : elles permettront de mieux comprendre les modèles proposés pour l'engagement des TCR.

3.1. Caractéristiques de l'interaction entre TCR et complexes peptide-CMH :

3.1.1. Données thermodynamiques :

Ces données ont été obtenues par l'étude de molécules solubilisées, soit par résonance plasmonique de surface (technique permettant l'étude des caractéristiques de liaison entre un ligand, en phase liquide et son récepteur fixé sur un support), soit par compétition entre des ligands marqués radioactivement et des ligands froids. Les données obtenues montrent une constante de dissociation de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-6} M, ce qui est une valeur élevée (qui témoigne donc d'une faible affinité) si on la compare à celle d'autres réactions biologiques (*e.g.* interaction anticorps-antigène) (Matsui et al., 1991).

Certains auteurs ont modifié la séquence peptidique des épitopes présentés par le CMH : cette approche dite par ligands altérés s'est révélée très instructive : elle a permis de corrélérer la notion d'affinité aux réponses biologiques observées sur des LT. Il a ainsi mis en évidence que certains ligands altérés s'avèrent antagonistes (De Magistris et al., 1992) tandis que d'autres ne peuvent activer qu'une partie des fonctions biologiques des LT (production de cytokines mais pas de prolifération par exemple) (Bluestone et al., 1992; Evavold and Allen, 1991).

3.1.2. Données cristallographiques et conformationnelles :

La cristallisation des TCR couplés à un complexe peptide-CMH (pCMH) a permis d'élucider le détail de la structure du TCR lors de sa liaison au complexe peptide-CMH (Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996). Les principales caractéristiques de cette liaison consistent en un contact légèrement en diagonale des acteurs ; une liaison des CDR1 et CDR2 au CMH tandis que le CDR3 se lie au peptide antigénique.

Néanmoins, cette approche n'a pas permis de distinguer de différence notable dans le mode de liaison d'un TCR donné à un peptide agoniste, agoniste partiel ou à un antagoniste, ni d'identifier de changement conformationnel stable du TCR, bien que l'existence de déformations transitoires pendant le processus de liaison ne puisse être exclue. De plus, une telle approche ne tient pas compte du rôle des corécepteurs (CD4 ou CD8) qui en se liant dans le même temps que le TCR au CMH, modifie l'avidité de ce dernier pour le TCR.

D'autre part, le complexe pCMH est peu déformable par lui-même ; par ailleurs, certains constituants du complexe TCR-CD3, tel le CD3 ϵ , subissent après activation une modification pouvant être détectée par des anticorps monoclonaux (Gil et al., 2002). De telles données ainsi

que les mesures de la Δc_p (variation de la chaleur massique) des TCR, qui traduit leur capacité à se déformer, ont conduit à imaginer une interaction entre TCR et les complexes peptides-CMH en deux temps : une première étape permettrait l'interaction entre les CDR1 et 2 avec le CMH ; par la suite, la capacité de déformation du CDR3 (ainsi que d'autres paramètres d'ordre cinétique, *cf. infra*) déterminerait la qualité de son interaction avec le peptide antigénique : le TCR, le cas échéant, subirait des modifications conformationnelles qui constitueraient le début de la transduction du signal.

3.1.3. Données cinétiques :

L'emploi de la résonance plasmonique de surface a permis de compléter la compréhension de l'interaction entre TCR et pCMH en fournissant des données cinétiques relatives à cette interaction telles que les constantes d'association et de dissociation des complexes. Il a été ainsi découvert que le temps de demi-vie des complexes conditionne la qualité de l'interaction : les agonistes partiels déterminent une interaction relativement courte dans le temps tandis que les antagonistes forment un complexe stable dans le temps. Les peptides agonistes permettraient une interaction dont la demi-vie, de durée intermédiaire, assurerait une transduction optimale du signal (Kalergis et al., 2001).

3.2. Modèles actuels décrivant l'engagement des TCR

Divers modèles sont évoqués pour expliquer l'activation des LT : chacun de ces modèles se focalise sur quelques faits expérimentaux qu'il explique avec précision. Il en résulte que les divers modèles actuels ne sont pas mutuellement exclusifs : certains aspects peuvent en effet se compléter. Seuls quelques modèles parmi les plus représentatifs sont ici présentés.

3.2.1. *Kinetic segregation*

Ce modèle, présenté par Davis and Van der Merwe en 1996, se base sur la taille du TCR et des autres molécules accessoires, relativement faible si on la compare à celle d'autres molécules membranaires telles que les phosphatases CD45 et CD148, et sur la corrélation

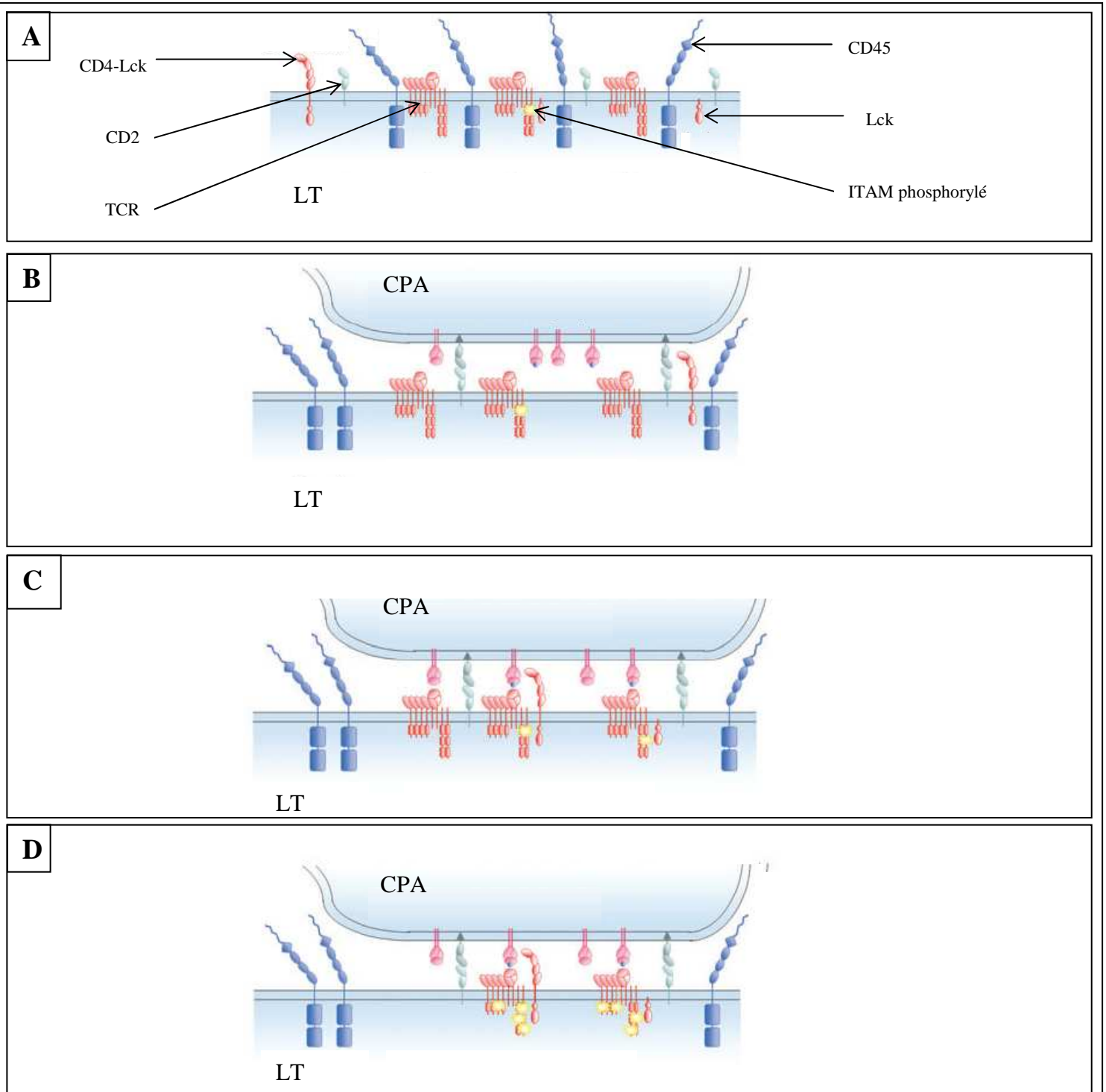


Figure 8 : Modalités de l'activation d'un LT suivant le modèle du « kinetic segregation ».

A – En l'absence d'interaction, des molécules « activatrices » comme les kinases associées au TCR (en rouge, *e.g.* Lck) face interne de la membrane plasmique sont dispersées au milieu de phosphatases (en bleu, *e.g.* CD45). La résultante en terme phosphorylation (en jaune) et donc de signal transduit est nulle.

B – La rencontre avec une CPA et son apposition intime permet sur le site de contact l'exclusion des phosphatases (qui sont des glycoprotéines de grande taille).

C – L'interaction entre le TCR et le peptide antigénique éventuellement présenté par la CPA permet le rapprochement des kinases et de leurs substrats ainsi que la phosphorylation des sites ITAM, sans action possible des phosphatases.

D – La résultante en terme de phosphorylation est positive : le signal transduit permet l'activation du LT.

D'après (Davis and van der Merwe, 2006).

entre l'activité enzymatique et la taille des molécules en question (Figure 8). L'engagement du TCR et des molécules accessoires permet un rapprochement des membranes du LT et de la CPA. Ce rapprochement résulte en l'exclusion par répulsion stérique des grandes phosphatases : la zone de contact se trouve donc localement enrichie en molécules membranaires associées à des activités de protéines kinases, ce qui permet l'activation proximale du LT (Davis and van der Merwe, 2006).

Ce modèle explique aisément l'importance des temps de demi-vie des complexes TCR-pCMH : il est en effet nécessaire d'avoir une interaction relativement durable pour permettre le rapprochement des membranes, l'exclusion des grandes phosphatases et la phosphorylation des acteurs proximaux. Il ne propose toutefois rien en ce qui concerne le devenir des TCR une fois engagés et ne prévoit pas le rôle des corécepteurs CD4 et CD8.

3.2.2. Valence du TCR, oligomérisation et *microclusters* :

La question de la valence du TCR reste l'objet de débats contradictoires. Le fait que des anticorps dirigés contre le CD3 puissent activer des LT en provoquant un pontage des TCR semble à première vue indiquer la nécessité d'une oligomérisation de TCR en vue de l'activation des LT.

L'observation plus récente qu'un seul complexe peptide-CMH suffit à une réaction des LTc ou des LT CD4⁺ (Irvine et al., 2002; Purbhoo et al., 2004; Sykulev et al., 1996) remet en cause cette hypothèse.

L'observation de l'organisation de TCR et autres composants de signalisation en *microclusters* (Varma et al., 2006; Yokosuka et al., 2005), de même que la purification de TCR multimériques, (Alarcon et al., 2006; Schamel et al., 2005; Schamel et al., 2006)) pourrait en revanche soutenir la première hypothèse. Ces dernières approches ne précisent pas la nature biochimique des interactions entre TCR, ni le rôle que cette oligomérisation pourrait jouer dans l'activation des LT.

3.2.3. Engagement en série, hétérodimérisation :

Un autre fait biologique ayant marqué les chercheurs concerne la disponibilité en peptides antigéniques d'une spécificité donnée sur une même CPA : les CPA étant capables de présenter une vaste variété de peptides antigéniques du soi et du non-soi, comment un LT peut

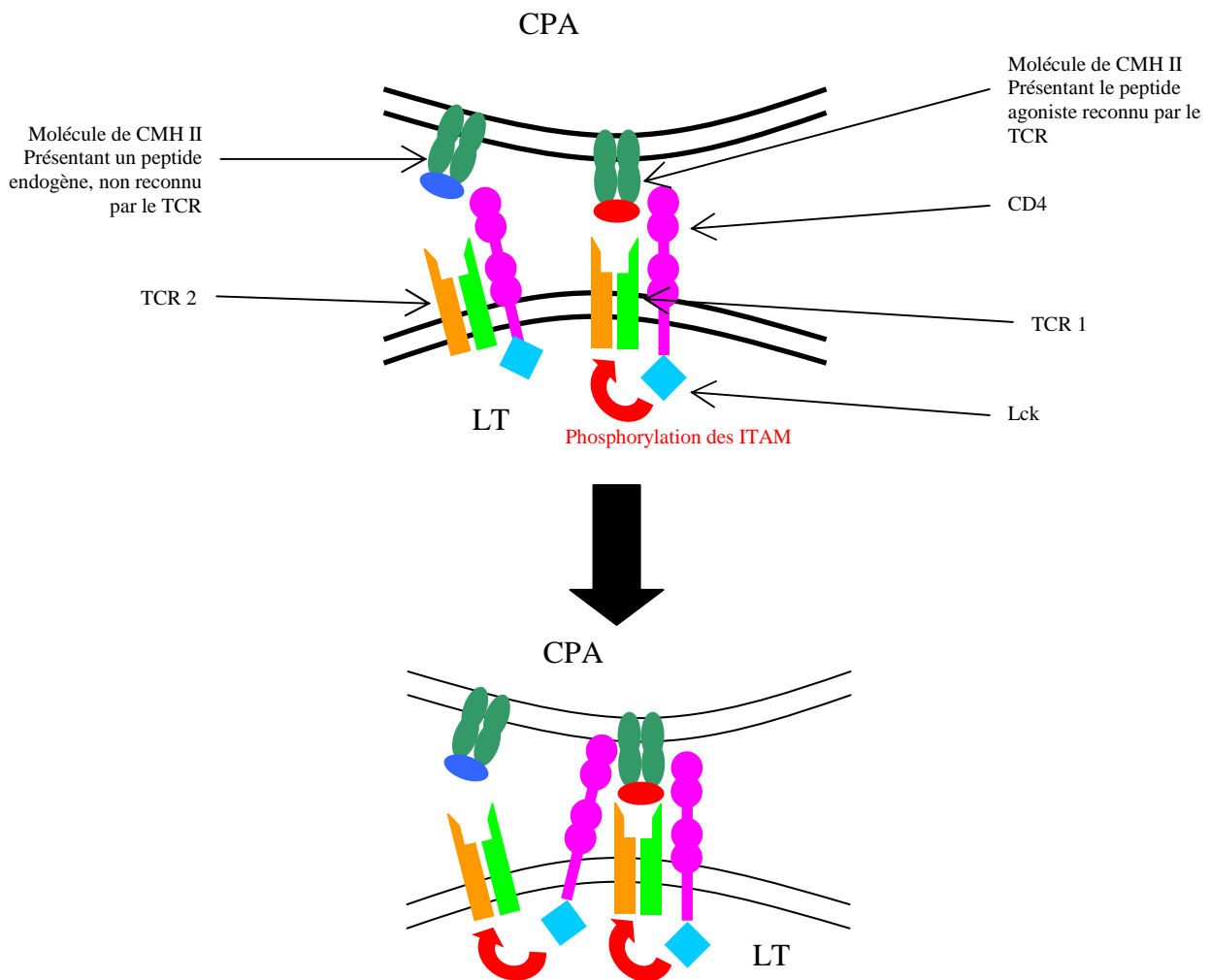


Figure 9 : Activation du TCR suivant le modèle de l'hétérodimérisation.

Le modèle de l'hétérodimérisation propose une explication à l'activation d'un LT par un faible nombre de complexes peptide-CMH exposés par une CPA. Les co-récepteurs (CD4 dans l'exemple) à proximité d'un TCR ayant reconnu un peptide agoniste (TCR1) peuvent phosphoryler un TCR n'ayant pas été engagé (TCR2), ce qui permet une amplification du signal d'activation en présence de peu de peptides agonistes.

D'après (Purbhoo et al., 2004)

-il être activé par le faible nombre de copies présentes du peptide qu'il est capable de reconnaître ? Une réponse est fournie par le modèle de l'engagement en série (Valitutti et al., 1995b) qui postule que quelques-uns de ces peptides suffisent à activer de nombreux TCR présents sur le LT : les TCR sont acheminés jusqu'au site de contact, activés puis internalisés en vue d'être dégradés.

Le modèle de l'hétérodimérisation (Krogsgaard and Davis, 2005) complète le précédent en explicitant le rôle des corécepteurs : lorsqu'un TCR d'un LT est engagé par un complexe peptide-CMH dont il est spécifique, le corécepteur (CD4 ou CD8) présent en surface du LT participe à l'interaction en se liant lui aussi au CMH, renforçant ainsi l'avidité du complexe : le corécepteur active par ailleurs des kinases de la famille des Src qui phosphorylent les ITAM des composants du CD3, initiant ainsi la transduction du signal (Figure 9). Les complexes peptide-CMH non spécifiques du LT, en se rassemblant sur le site de l'interaction, lient transitoirement les TCR sans donner des interactions « productives » *per se*. En revanche, les corécepteurs engagés aux côtés d'un TCR subissant une interaction productive peuvent phosphoryler les TCR « voisins » et ainsi amplifier le signal initial, rendant possible l'activation d'un LT par très peu de peptides dont il est spécifique.

3.2.4. *Kinetic proofreading*

Ce modèle s'appuie sur l'observation que l'interaction entre LT et CPA ne résulte en l'activation du LT qu'après plusieurs heures de signalisation du côté du LT. Il postule que la transduction du signal suite à l'engagement du TCR passe par une suite de réactions réversibles, avant de permettre une réaction irréversible : il faut donc du temps avant d'atteindre ce seuil d'irréversibilité (McKeithan, 1995).

3.3. Engagement des TCR et activation des lymphocytes T

En aval des acteurs proximaux, qui sont activés suite à l'engagement du TCR, on peut distinguer schématiquement quatre voies de signalisation. Néanmoins, ces voies, qui font intervenir des acteurs distincts, se régulent mutuellement de façon très étroite. La signalisation qui fait suite à l'engagement du TCR permet une pleine activation des LT en permettant leur prolifération, leur différenciation, la production de cytokines voire de matériels spécifiques tels les granules lytiques des LTc (Figure 10).

3.3.1. Acteurs proximaux

Ces événements rapides suivent l'engagement du TCR : ils consistent essentiellement en l'activation des kinases associées aux co-récepteurs (Figure 10). Ces kinases phosphorylent les ITAM du complexe TCR/CD3, ce qui fait de ces derniers des sites de reconnaissance pour des protéines adaptatrices qui permettent la diversification du signal.

Les protéines kinase de la famille Src (Sarcome de Roux) sont au nombre de neuf ; Lck et Fyn sont exprimées chez les lymphocytes T. Lck est associée aux co-récepteurs CD4 et CD8. Lorsque le LT est au repos, Lck est maintenue dans un état inactif par une phosphorylation sur la Tyrosine 505. Ce dernier site est déphosphorylé au moment de la rencontre avec la CPA par la phosphatase CD45. L'activation résultante de Lck permet la phosphorylation des ITAM du complexe TCR/CD3.

La phosphorylation des ITAM permet le recrutement de protéines adaptatrices comportant des domaines SH2 (*Src Homology domain 2*), telle ZAP-70. Cette dernière, une fois phosphorylée par Lck, va recruter et activer des protéines adaptatrices telles que LAT (*Linker for T cell Activation*), SLP-76 (*SH2-containing Leukocytes protein of 76 kDa*) qui en recrutant des protéines supplémentaires, initient ainsi la signalisation par les quatre principales voies. A noter que l'engagement des molécules de costimulation (*e.g.* CD28) renforce l'activation de ces voies (Figure 10).

3.3.2. Diversification du signal : les principales voies de signalisation :

On peut distinguer quatre voies principales activées en aval du TCR : la voie calcique, la voie des MAP Kinases, la voie de la PKC- θ et celle de la PI3K (Figure 10). Ces voies conduisent à des événements spécifiques mais contribuent toutes à la prolifération des LT par l'activation de facteurs de transcription. En outre, certains acteurs, qui ont un rôle dans deux ou plusieurs voies, contribuent à la régulation réciproque de ces voies. Les acteurs de ces voies sont présentés succinctement :

3.3.2.1. La PLC γ 1 :

La PhosphoLipase γ existe sous deux isoformes : la PLC γ 1, qui possède une expression réduite aux cellules du lignage hématopoïétique, est la forme majoritairement exprimée par les LT. Suite à l'engagement du TCR, la PLC γ 1 est recrutée par LAT et activée : elle hydrolyse alors le PIP2 (PhosphatidyInositol 4,5-bisPhosphate) en IP3 (Inositol 1,4,5-triPhosphate) et en diacyglycérol (DAG) : la génération de ces seconds messagers est un prélude à la mise en place des voies de transduction du signal.

3.3.2.2. La voie calcique :

L'IP3 produit suite à l'engagement du TCR (*cf. supra*) se fixe sur des récepteurs à l'IP3 (IP3R) présents sur la face cytoplasmique du Réticulum Endoplasmique (RE). Il en résulte une ouverture des canaux calciques du RE et une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) : cette élévation, bien que transitoire, suffit à l'ouverture des canaux calciques CRAC (*Calcium Release Activated Calcium channels*) situés sur la membrane plasmique (Zweifach and Lewis, 1993) . L'afflux de Ca^{2+} l'origine extracellulaire résultant conduit à une augmentation forte et durable de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cette augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ constitue un « signal d'arrêt » permettant l'arrêt de la migration du LT et sa correcte activation par la CPA (Negulescu et al., 1996).

Le calcium peut se fixer sur la Calmoduline qui active une phosphatase nommée Calcineurine. Cette dernière déphosphoryle le facteur de transcription NFAT (*Nuclear Factor for Activated T cells*), qui est transloqué dans le noyau, et stimule la synthèse d'IL-2, ce qui contribue ainsi à l'activation de la cellule. Il est important de noter que la synthèse des cytokines nécessite le maintien dans le temps d'une forte $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sans quoi NFAT est exporté hors du noyau (Timmerman et al., 1996), ce qui interrompt l'expression de l'IL-2 (Valitutti et al., 1995a).

3.3.2.3. La voie de la PKC θ :

La PKC θ est la seule isoforme de la PKC qui soit recrutée sur le site de contact entre LT et CPA (Monks et al., 1998). Son recrutement ainsi que son activation sont dus au DAG ainsi qu'à Lck. Une fois activée, la PKC θ phosphoryle I κ B, favorisant ainsi sa reconnaissance par

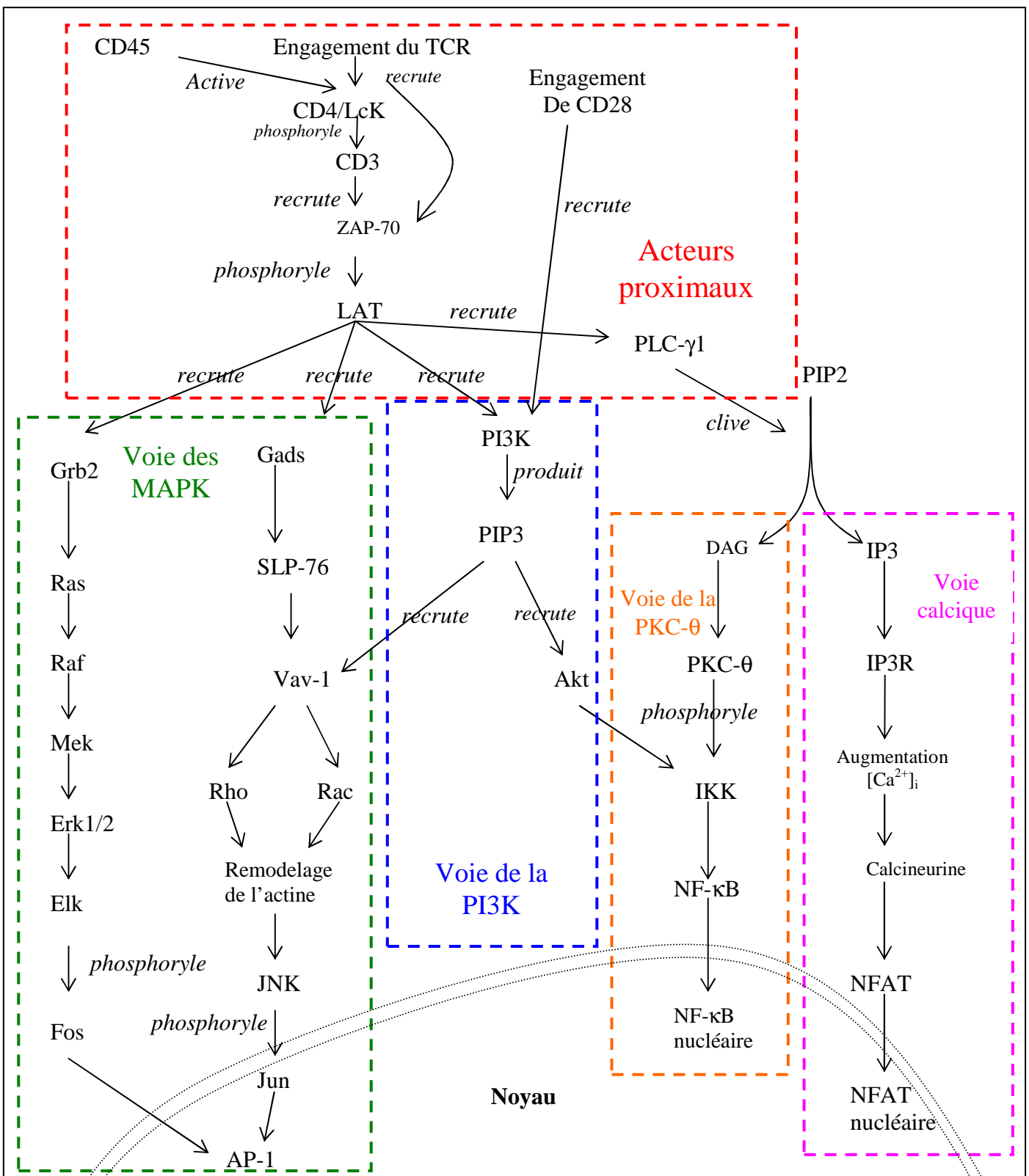


Figure 10 : Voies de signalisation activées suivant l'engagement du TCR.

L'engagement du TCR par son peptide agoniste permet l'activation de molécules dites acteurs proximaux puis en une diversification du signal par l'activation de plusieurs voies de signalisation que l'on peut schématiquement regrouper en 4 voies : la voies des MAPK (vert), la voie calcique (rose), la voie de la PI3K (bleu) et la voie de la PKC θ (orange). Ces voies permettent d'activer des facteurs de transcription (tels que AP-1, NF- κ B ou NFAT) qui permettent l'activation et la différenciation des LT.

les ubiquitine-ligases et sa dégradation subséquente par le protéasome (Isakov and Altman, 2002). L'élimination de IκB permet de révéler le signal de localisation nucléaire de NF-κB, ce qui résulte en sa translocation dans le noyau et la transcription de gènes.

3.3.2.4. La voie des MAP kinases :

L'engagement du TCR permet le recrutement de Grb2/Sos à la membrane plasmique. Il en résulte l'activation de la GTPase Ras. Cette dernière active Raf-1, une MAPKKK (*Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase*). S'ensuit une cascade de phosphorylations : Raf-1 active Mek (MAPKK ou *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase*), qui active Erk1/2 (MAPK ou *Mitogen Activated Protein Kinase*). Erk1/2 peuvent gagner le noyau et phosphoryler divers facteurs de transcription ; ce qui aboutit à la l'activation de c-Fos. En parallèle, une cascade d'activations impliquant la GTPase Rac conduit à la phosphorylation de JNK et de c-Jun. Ce dernier, en s'associant à c-Fos, forme le facteur de transcription AP-1.

3.3.2.5. La voie de la PI3K :

La PI3K est recrutée à la membrane plasmique suite à l'engagement du TCR. Cette enzyme permet la phosphorylation des phosphatidylinositides membranaires sur la position 3' du cycle inositol. Les produits de cette réaction permettent le recrutement au niveau de la membrane plasmique d'acteurs possédant un domaine PH (*Plekstrin Homology*), lesquels contribuent à la survie cellulaire et au remodelage du cytosquelette d'actine.

4. La synapse immunologique, les synapses immunologiques

4.1. Notion de synapse

C'est en 1984 que Norcross (Norcross, 1984) postule une base synaptique pour la communication entre cellules du système immunitaire. La notion de synapse, fondée par analogie avec la synapse neuronale, implique l'idée d'un transfert d'information et celle d'une structure morphologique précise accompagnant ce transfert (Friedl and Storim, 2004).

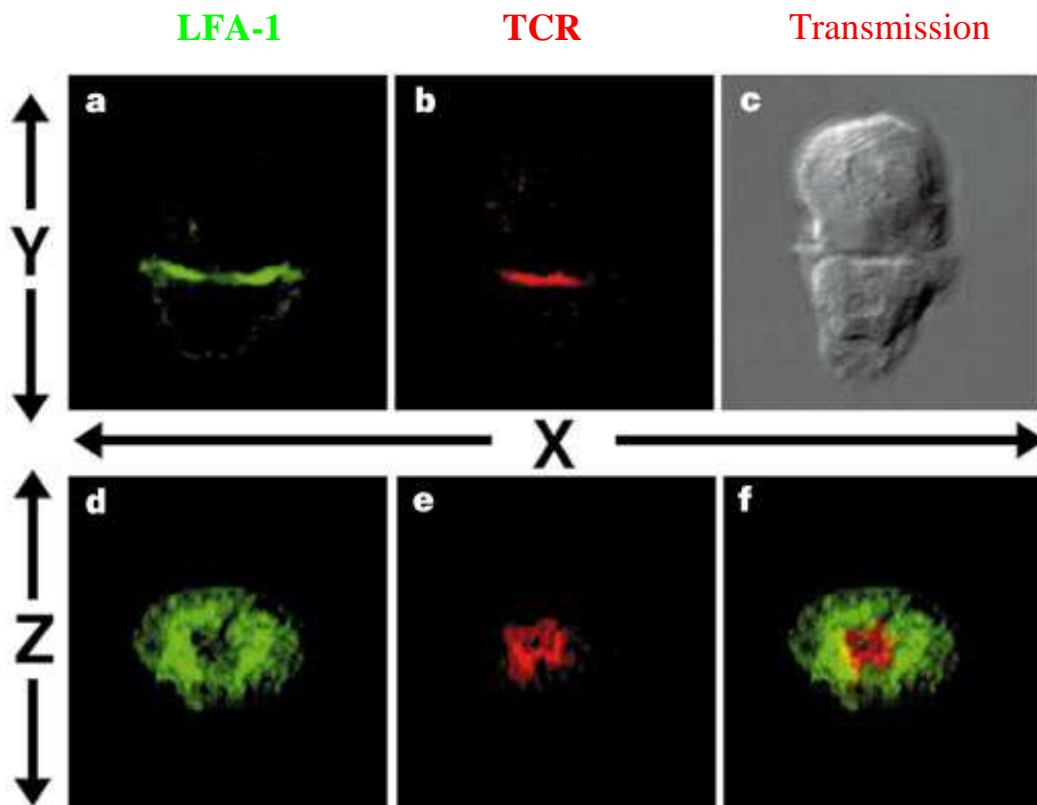


Figure 11 : visualisation de la synapse immunologique

Images de microscopie confocale montrant l'agrégation de récepteurs de surface du LT formant une synapse immunologique sur le site de contact avec une CPA (image c). Ces récepteurs forment un SMAC (SupraMolecular Activation Cluster, image f), organisé en structure centrale ou cSMAC où l'on retrouve les TCR (rouge, images b et e) et en un anneau périphérique ou pSMAC enrichi en molécules d'adhésion telle l'intégrine LFA-1 (a et d).

D'après Grakoui et al., 1999

4.2. La synapse immunologique

Il a fallu attendre 1998 pour que les progrès techniques en imagerie cellulaire permettent la visualisation directe d'une structure tridimensionnelle à l'interface entre un LT et une CPA (Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998). La structure identifiée consiste en une agrégation de molécules de surface, parmi lesquelles les TCR et des molécules d'adhésion comme LFA-1 (Figure 11) : cette structure possède une organisation spatiale précise : les TCR sont localisés dans la zone centrale de la zone de contact tandis que LFA-1 forme un anneau périphérique à la structure précédente. L'ensemble de la structure est nommé *Supra Molecular Activation Cluster* (SMAC), organisé en une zone centrale (cSMAC, enrichi en TCR) et une zone périphérique (pSMAC, enrichi en molécules d'adhésion). Cette morphologie de Synapse Immunologique (SI) sera désignée plus loin dans le texte comme SI monocentrique mature.

4.3. Pluralité des structures et plasticité des synapses immunologiques

L'enthousiasme suscité par la mise en évidence d'une structure de communication entre le LT et la CPA a rapidement conduit à la multiplication des travaux portant sur le sujet. Il a rapidement été rapporté diverses morphologies pour les SI selon la nature de la CPA, l'intensité de la stimulation antigénique et le type de LT mis en jeu. L'idée d'une synapse immunologique a ainsi laissé la place à celle de synapses immunologiques (Trautmann and Valitutti, 2003), la définition du terme étant élargie pour désigner « toute structure de communication entre cellules du système immunitaire » .

Une classification des SI fondée sur une base morphologique a ainsi émergé. Celle-ci ne doit pas être comprise comme un absolu mais comme une illustration de la diversité des structures observables. Quelques exemples sont ici présentés :

4.4. SI monocentrique mature

La structure qui fut la première identifiée est définie comme la SI monocentrique mature. On l'observe généralement lorsque les LT établissent un contact avec un LB transformé par le virus d'Epstein-Barr (EBV) qui joue le rôle de CPA et lorsque ce dernier présente une forte

concentration de peptide antigénique ; cette structure tout d'abord considérée comme le prototype de la synapse immunologique est maintenant envisagée par certains comme une structure artificielle peu représentative de ce qui est observé dans un contexte *in vivo*.

4.4.1. SI immature

Cette SI se caractérise par une absence d'enrichissement visible en TCR sur le site de contact. Seul un léger enrichissement en molécules d'adhésion est observable. Cette structure peut être mise en évidence dans divers contextes :

- Contact très récent entre un LT et une CPA présentant le peptide antigénique : la structure évolue alors en quelques minutes pour donner une SI monocentrique mature
- Contact entre un LT et une CPA ne présentant pas le peptide antigénique. La structure n'évolue pas et le contact est alors rapidement rompu.
- Contact entre un LTc activé et une cellule-cible : la mise à mort peut ainsi se produire en l'absence de structure visible ((Faroudi et al., 2003; Purbhoo et al., 2004; Wiedemann et al., 2006).

4.4.2. Synapse sécrétrice

Cette structure accompagne la fonction effectrice des LTc et des cellules NK, à savoir la polarisation, l'adhésion entre cellules et la sécrétion de facteurs hydrosolubles ; les mécanismes concourant à sa formation sont semblables à ceux mis en jeu dans le cas de la SI monocentrique mature ; toutefois, il est intéressant de noter la présence d'un domaine de sécrétion adjacent à la zone de signalisation centrale. L'appareil sécrétoire converge vers cette zone par le jeu du réseau des microtubules et permet l'exocytose des granules lytiques (*cf infra*) (Stinchcombe et al., 2001).

Une synapse de morphologie similaire est observable avec des LT_H et permet la sécrétion orientée d'interleukines (IL) 2 ou 4 lors de leur interaction avec des LB. Il a été envisagé que l'anneau formé par le SMAC distal « scellerait » la jonction pour éviter la fuite de molécules et permettre d'atteindre une forte concentration locale (Bossi et al., 2002).

4.4.3. Synapse multicentrique et partiellement organisée

Ce type de synapse est établi entre les thymocytes et les cellules épithéliales thymiques : un thymocyte établit simultanément plusieurs contacts avec les cellules environnantes. Ces synapses sont incomplètement ségréguées, montrant une accumulation de TCR et de LFA-1 sans différenciation en cSMAC ni pSMAC. Ces contacts permettent l'activation du TCR et la transduction du signal, comme en témoignent l'activation de ZAP-70, la phosphorylation de Tyr, l'influx de calcium et la production d'IFN γ (Bouso et al., 2002).

4.5. Fonctions des synapses immunologiques :

4.5.1. SI et sélection thymique

L'engagement du TCR au cours du développement thymique des futurs LT est crucial pour déterminer la survie ou la mort de ces cellules (*cf. supra*). Il a été observé que les thymocytes établissent des contacts multifocaux avec les cellules épithéliales thymiques (*cf. supra*). (Bouso et al., 2002; Hailman et al., 2002).

4.5.2. Production d'un signal durable pour l'activation de cellules :

La pleine activation d'un lymphocyte T nécessite le maintien d'une signalisation pendant plusieurs heures (Goldsmith and Weiss, 1988). La concentration de molécules de signalisation sur le site de la SI pourrait ainsi permettre le maintien de l'activité de transduction.

4.5.3. Modulation du signal transduit et dégradation des TCR :

L'introduction de la notion de synapse immunologique a suscité un énorme intérêt parmi la communauté scientifique. Il a été postulé que cette structure est nécessaire à l'engagement des TCR (Shaw and Dustin, 1997), ce qui a été infirmé par la suite (Delon et Germain, 2000). On a de même pensé que la formation de la SI était nécessaire à l'initiation de la transduction du signal suite à l'engagement des TCR : l'observation d'une forte activité de transduction précédant la formation d'une SI stable a périmé cette hypothèse (Lee et al., 2003).

Certains arguments montrent que, loin des premières hypothèses concernant la SI, cette structure et plus précisément le cSMAC constituerait le site d'endocytose et dégradation des TCR. Sur un lymphocyte T en l'absence de stimulation, les TCR effectuent des cycles d'endocytose/exocytose entre la membrane et des compartiments vésiculaires (Liu et al., 2000). Lors de l'activation du LT par une CPA présentant des peptides agonistes, on observe une très forte diminution de l'expression membranaire des TCR (Valitutti et al., 1995b). Ce phénomène est dû à l'endocytose massive des TCR qui ont été engagés et dont les ITAM ont été phosphorylés. Ces TCR sont ubiquitinylés (par l'ubiquitine ligase Cbl-b) et adressés aux lysosomes où ils sont finalement dégradés. Des observations en microscopie confocale ont révélé que l'intensité de signalisation est très fortement atténuée au niveau du c-SMAC (Lee et al., 2003) et que des marqueurs de dégradation s'y accumulent (Varma et al., 2006; Yokosuka et al., 2005) ; le c-SMAC pourrait ainsi constituer le lieu de dégradation des TCR et de modulation du signal d'activation.

4.5.4. Sécrétion polarisée de facteurs hydrosolubles

L'observation de la structure d'une synapse sécrétrice formée entre LTc et cellule-cible (Stinchcombe et al., 2001) a appuyé l'idée selon laquelle la synapse immunologique, en permettant l'apposition intime de deux cellules du système immunitaire, permet la transmission efficace de signaux entre les partenaires : le faible volume de la zone de sécrétion ainsi que la présence en périphérie de cette zone d'un « anneau » de molécules d'adhésion de grande taille permettrait de « sceller » la synapse afin d'assurer qu'une concentration optimale en médiateurs parvienne à la cellule-cible et que ce signal ne soit reçu que par cette dernière. La nature de ce signal est variable : signal de mort dans le cas des LTc, signal cytokinique pour les LT auxiliaires.

Des données plus récentes (Huse et al., 2006) complètent et appuient cette idée en montrant que les LT emploient deux voies de sécrétion distinctes selon la nature des médiateurs relargués : d'une part, la sécrétion de certaines cytokines (*e.g.* IL-2, IFN- γ) est polarisée au moyen de la SI, ce qui assure la transmission spécifique d'un signal tandis que d'autres (*e.g.* TNF, chimiokines) sont relarguées de façon non polarisée, ce qui permet un recrutement massif de cellules du système immunitaire.

4.5.5. Prélude à une division asymétrique

La formation d'une synapse immunologique suppose une réorganisation de la polarité des LT ainsi que le recrutement massif de molécules de surface en un point précis de la cellule. Cette polarisation est contrôlée par des protéines à domaine PDZ (*Post-synaptic Density 95, Disc Large, Zonula Occludens*), telles Scribble ou Dlg (Ludford-Menting et al., 2005). Un rapport récent mentionne que des LT (Chang et al., 2007) isolés suite à la formation d'une synapse immunologique et initiant une prolifération subissent une division asymétrique, ce qui signifie que les deux cellules-filles ne reçoivent pas une quantité équivalente de matériel cellulaire, notamment de molécules associées à la signalisation (CD8, CD3) ou à l'adhésion (LFA-1). La cellule-fille proximale à la synapse immunologique reçoit plus de matériel et poursuit des cycles de division tandis que la cellule-fille distale à la SI ne prolifère pas, constituant un support potentiel pour la mémoire immunitaire (Chang et al., 2007). Ce modèle, s'il est confirmé, donnera à la synapse immunologique une fonction inédite .

Seconde partie : Etude des mécanismes
moléculaires concourant à la mobilité des
TCR en surface des lymphocytes T

1. Introduction

L'activation des lymphocytes T par des ligands antigéniques présentés en surface de cellules présentatrices d'antigènes est un événement central dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Une caractéristique originale de l'activation des lymphocytes T réside dans le fait qu'en dépit de la spécificité de la reconnaissance antigénique, qui est assurée par l'interaction entre récepteur à l'antigène (TCR) et complexe peptide-CMH, le devenir de l'interaction entre LT et CPA dépend de l'intégration de signaux provenant du TCR et de molécules accessoires engagées au niveau de l'interface cellulaire. Ainsi, il se forme au cours de l'interaction entre LT et CPA au niveau de l'interface cellulaire une zone spécialisée au sein de laquelle de nombreuses molécules de surface sont engagées simultanément, conduisant à l'activation de voies de signalisation variées et interconnectées. Cette interface cellulaire (nommée synapse immunologique) se caractérise par rassemblement à grande échelle et l'organisation de molécules de surface et de composants de signalisation intra-cellulaire (Friedl and Storim, 2004; Trautmann and Valitutti, 2003).

Bien que la structure de la synapse immunologique ait été étudiée en détails, les mécanismes moléculaires conduisant à la formation de la SI demeurent flous. En particulier la façon dont les TCR sont acheminés à la synapse immunologique pour y être engagés et activés par les complexes peptide-CMH est une question centrale et non résolue de la biologie des lymphocytes.

Initialement, on pensait que les TCR possédaient une mobilité latérale réduite. Cette notion était basée sur des observations issues de deux études. Dans un premier travail, Sloan-Lancaster et al. (Sloan-Lancaster et al., 1998) a montré que des protéines chimères chaîne ζ /CD25 marquées par la GFP et exprimées en surface de cellules HeLa possédaient une mobilité réduite, laquelle était mesurée par FRAP et FLIP.

La seconde étude, publiée par Grakoui et al. (Grakoui et al., 1999) a montré l'absence de rapide retour de fluorescence de complexes peptide/CMH, marqués à la fluorescéine, au sein de la synapse immunologique mature formée entre LT et complexes peptide/CMH intégrés dans des bicouches lipidiques planes.

Néanmoins, ces études ne se sont pas focalisées sur la mobilité des TCR durant le processus de reconnaissance antigénique. Tandis que la première a employé un récepteur chimérique qui ne reflète pas la structure physiologique multimérique du TCR. (Sloan-

Lancaster et al., 1998), la seconde a simplement montré que des TCR engagés dans une synapse immunologique mature demeurent immobiles (Grakoui et al., 1999).

Ces études s'avèrent par ailleurs difficilement réconciliables avec deux notions bien établies en matière d'activation des lymphocytes T: i) durant l'interaction dynamique et durable dans le temps avec une CPA, les TCR convergent sous forme de *microclusters* et s'accumulent dans la synapse immunologique et finissent par être dégradés (Lee et al., 2003), (Yokosuka et al., 2005); ii) lorsque des LT interagissent avec des CPA offrant une stimulation antigénique forte, environ 90% du nombre total de TCR sont internalisés (ce qui traduit leur engagement), ce qui implique que la majorité des TCR présents en surface devraient être mobiles. (Valitutti et al., 1995b).

Au cours de travaux précédents, le laboratoire du Dr Valitutti a employé une lignée de cellules Jurkat déficientes en chaîne β du TCR et transfectées avec une chaîne β fusionnée à la GFP pour mesurer la mobilité latérale du TCR par FRAP. Les résultats apportés par cette étude ont démontré une mobilité des TCR en surface des LT (Favier et al., 2001). A l'aide d'une approche différente M. Krummel et col ont démontré la mobilité des TCR en surface de LT murins, mobilité qui augmente durant le processus de reconnaissance antigénique (Moss et al., 2002).

Enfin, des travaux récents du laboratoire appuient la notion de mobilité des TCR en surface des LT. Il a été en effet montré que pour des LT auxiliaires $CD4^+$ (Depoil et al., 2005) ainsi que des LT cytotoxiques $CD8^+$ (LTc) (Wiedemann et al., 2006) stimulés par une dose optimale de peptide antigénique, un net enrichissement des TCR au niveau du site de contact LT/CPA est obtenu en 10-15 minutes.

Considérés dans leur ensemble, ces résultats vont dans le sens d'une mobilité des TCR en surface des LT, ce qui rend possible un recrutement rapide vers la SI.

2. Problématique et objectifs de travail :

Le but de mon M2R a été de caractériser la mobilité des TCR présents sur des lymphocytes T humains normaux afin de définir les mécanismes permettant l'acheminement des TCR à la SI. A cette fin, j'ai employé la technique de FRAP sur des LT au repos ou stimulés par des ionophores (drogues provoquant une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} notée $[Ca^{2+}]_i$) ou par leur peptide antigénique. Les techniques de FRAP renseignent sur les paramètres de diffusion d'une molécule en étudiant le retour de

fluorescence, dû à la diffusion de la molécule d'intérêt marquée par un fluorochrome dans une région qui a été photoblanchie (par l'exposition à un laser de forte intensité).

3. Matériels et méthodes

3.1. Isolement et culture cellulaires :

3.1.1. Purification de lymphocytes du sang périphérique humains :

Les lymphocytes T ont été isolés à partir du sang de donneurs sains (Centre de Transfusion Sanguine, CHU Purpan, Toulouse). Brièvement, les PBMC ont été purifiés à partir du sang par centrifugation sur un gradient de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Sweden). Les lymphocytes T CD4⁺ ont été purifiés à l'aide du kit RosetteSep Kit (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). La pureté des cellules purifiées a été évaluée par FACS (Facsan, Becton Dickinson) à l'aide d'Ac monoclonaux anti-CD4 marqués par du FITC (clone RPA-T4, BD Pharmingen). La fraction CD4⁺ possédait une pureté d'environ 90%. Avant la réalisation d'expériences, la fraction CD4⁺ était cultivée dans du milieu RPMI complet (Gibco, Paisley, Scotland) complétement avec 5% de sérum humain. Au cours d'expériences parallèles, des lymphocytes T issus de sang de cordon (CBTL) ont été purifiés à partir du sang de cordons ombilicaux (CHU Purpan, Toulouse) comme décrit plus haut.

3.1.2. Expansion de LT :

Dans certains cas, les CBTL ont été cultivés et multipliés durant 14 jours dans du RPMI 1640 complétement à l'aide de 5% sérum humain et d'IL-2 (150 IU/mL) : la multiplication des cellules a été obtenue à l'aide du kit Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander (DynaLbiotech, Oslo, Norway). Le rapport billes : cellules était de 1:1.

3.1.3. Clone T et CPA

Au cours d'expériences additionnelles, un clone humain de lymphocytes T CD4⁺, nommé 6396p5.1.2, et spécifique pour le peptide fusion du virus de la rougeole F254-268 (GDLLGILESRGIKAR) a été employé. Des lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein-Barr et exprimant les allèles de CMH II adéquats (lignée LG-2) ont été employées

comme CPA. Les clones de lymphocytes T ainsi que les CPA ont été isolées et maintenues en culture comme décrit.

3.2. *Fluorescence Recovery After Photobleaching* :

3.2.1. Génération d'un fluorochrome :

3.2.1.1. Choix de la sonde reconnaissant le TCR :

Le choix de la sonde à employer pour la FRAP est un paramètre crucial de l'étude : La sonde doit être monovalente, ceci afin de ne pas provoquer l'activation des LT par pontage (*crosslinking*) des TCR : ceci interdit l'usage d'anticorps ou de tétramères de CMH. Le fragment Fab d'un anticorps ni bloquant (tel l'OKT3) ni activateur semble un choix raisonnable.

3.2.1.2. Choix du fluorochrome couplé au Fab :

Le fluorochrome couplé au Fab doit réunir plusieurs qualités : il doit être suffisamment puissant pour permettre la visualisation du faible nombre (environ 30 000) de TCR présents sur un LT, doit être suffisamment photolabile pour permettre le blanchiment d'une zone marquée mais pas trop pour que le photoblanchiment de base (dû à l'illumination de faible intensité du champ qui permet l'obtention d'images) ne fausse le suivi dans le temps de l'intensité du marquage. La Cyanine 5 (Cy5) est pour ces raisons un fluorochrome de choix.

3.2.1.3. Protocole de fabrication de la sonde :

Des anticorps monoclonaux dirigés contre la sous-unité ϵ du CD3 (TR66, IgG1) ont été digérés à l'aide du kit IgG1 Fab and F(ab)'2 kit (Pierce biotechnology TM, Rockford) selon les instructions du fabricant. Les Fragments Fab (5 mg/mL in 0.1 M Sodium carbonate, pH= 9.3) ont été marqués à l'aide du Cy5 Monoreactive dye pack (Amersham Bioscience TM, Piscataway). Les fragments marqués ont été séparés du Cy5 non conjugué par chromatographie sur gel à l'aide de colonnes Nap-10 Columns (Amersham Bioscience). Cette étape a été suivie d'une dialyse pendant 12 h dans du PBS 1× à l'aide du kit 10 kDa Lyser Dialysis cassettes (Pierce biotechnology).

3.2.2. Apprêtement des LT :

Les lymphocytes T CD4⁺ purifiés à partir du sang (*cf. supra*) ont été lavés et resuspendus dans du RPMI complété par 5% de SVF et 10 mM Hepes. Les cellules ont ensuite été chargées avec 2 µM de Fluo4 AM (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) durant 30 minutes à 37°C. Après un lavage supplémentaire, les cellules ont été marquées avec 30 µg/mL du Fab anti-CD3 couplé au Cy5 dans du RPMI, 1% FCS à 4°C durant 30 min. Les cellules ont subi deux derniers lavages et ont été conservées dans de la glace jusqu'à leur utilisation au cours des expériences de FRAP.

3.2.3. FRAP :

La FRAP a été réalisée dans du milieu maintenu à 37°C, 5% CO₂ à l'aide d'un microscope confocal (LSM 510 ; Carl Zeiss, Jena, Germany) avec l'objectif × 63 et les lasers de 488 nm et 633 nm. Lors de chaque expérience, une région rectangulaire (de dimension 2 µm × 1.4 µm) était définie à l'équateur du lymphocyte T. Cette région était irradiée durant 3 s par les lasers de 633 nm et 488 nm avec 100% d'intensité. L'ouverture du *pinhole* était ajustée pour obtenir des sections optiques de 2 µm d'épaisseur. Avant et après le blanchiment, l'ensemble du champ était visualisé en irradiant les cellules à l'aide des lasers 488 nm (4% d'intensité) et 633 nm (17% d'intensité). Des images étaient obtenues toutes les secondes.

3.2.4. Analyse des expériences de FRAP :

L'analyse des images, effectuée par Omer Dushek, a été réalisée à l'aide du logiciel Matlab. Les séquences d'images issues du microscope confocal ont été importées au format TIFF ; l'intensité de fluorescence à l'intérieur de la région blanchie a été intégrée pour chaque image.

Les mouvements de translation des cellules au cours de l'acquisition des images pouvaient potentiellement modifier nos résultats. Ces mouvements ont été corrigés comme suit. Tout d'abord, pour chaque image obtenue, une série d'opérations a été effectuée (seuil, fermeture, ouverture...) sur l'image de la sonde calcique afin d'obtenir un masque de la silhouette cellulaire. Le centre de masse de la cellule a ensuite été calculé par le logiciel. Enfin, la zone suivie a subi une translation dépendant des mouvements du centre de masse. Il est important de noter que les cellules ne bougent que de quelques pixels tout au plus au cours d'une

d'expérience et que la fluorescence de la sonde calcique, même lorsqu'elle est faible, permet une correction des mouvements des cellules.

3.2.5. Traitement par des drogues :

Au cours de certaines expériences, les cellules ont été traitées avec de l'ionomycine (0.5 µg/mL) ou de la thapsigargine (1 µM) au moment de l'enregistrement des séquences. Au cours d'autres expériences, des cellules ont été traitées avec de la cytochalasine D (10 µM) ou de la latrunculine B (50 nM) juste avant le début des expériences.

Au cours d'expériences additionnelles, des clones de lymphocytes T marquées avec le Fab anti-CD3 couplé au Cy5 ont été mises en présence de CPA présentant ou non le peptide spécifique auquel répondent les clones. Leur interaction a été enregistrée par microscopie confocale et une région du LT a été blanchie.

3.3. Immunofluorescence :

Les CPA ont été chargées durant 2 h à 37°C avec 10 µM du peptide antigénique comme précédemment décrit. Durant les 10 dernières minutes, les cellules étaient chargées avec 0.5 µM de CMTMR-Orange (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands).

La conjugaison des LT avec les CPA a été réalisée durant les temps indiqués comme décrit. Les cellules ont été fixées (PFA 3%), perméabilisées avec de la saponine (0,1%) puis marquées avec de la phalloïdine couplée à de l'Alexa 488 (Invitrogen) afin de détecter la F-actine, des anticorps monoclonaux anti-phosphotyrosine (PTyr) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ainsi que des anticorps monoclonaux anti-CD3ζ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ; une seconde étape de marquage a été réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux de chèvre anti-souris dirigés contre les isotypes des anticorps primaires employés et couplés à de l'Alexa 633 ou de l'Alexa 546 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands).

Les échantillons ont été montés sur lames et examinés à l'aide d'un microscope confocal (Carl Zeiss LSM 510 confocal microscope, Carl Zeiss, Jena, Germany) comme décrit précédemment.

3.4. Quantification de la F-actine par marquage avec phalloïdine et cytométrie en flux :

Une méthode décrite par Downey et al (Downey et al., 1989) a été employée avec quelques modifications. En bref, des PBL ont été fixés avec une solution de PFA à 3%, perméabilisées avec 0.1 % de saponine et marquées par 160 nM de phalloïdine couplée à de l'Alexa 488. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson). Une sélection (*gating*) a été réalisée pour exclure sur des critères de taille et de granulosité les débris et les agrégats cellulaires.

Certains échantillons de PBL ont été traités avant fixation par 2.5 µg / mL d'ionomycine, 1 µM de thapsigargine, ou par de la latrunculine B (50 à 500 nM) durant 15 min à 37°C.

4. Résultats :

4.1. Une nouvelle approche pour étudier la mobilité des TCR par FRAP :

L'équipe de recherche du Dr Valitutti a établi des collaborations durables avec des mathématiciens afin d'analyser et de modéliser les données obtenues concernant l'activation des lymphocytes T. Une part non négligeable de mon M2R a consisté à interagir avec des mathématiciens pour mettre au point de nouvelles et plus puissantes méthodes pour étudier la dynamique moléculaire des lymphocytes T par FRAP.

Au cours de notre étude, les paramètres de diffusion des TCR/CD3 ont été mesurés sur des LT formant des conjugués LT/CPA au moyen d'un nouveau modèle mathématique mis au point par Omer Dushek et Daniel Coombs (du Département de Mathématiques , University of British Columbia, Canada) .

Les méthodes "classiques" de FRAP passent par le blanchiment complet et profond d'une grande portion de la cellule afin d'éviter un retour de fluorescence issu de zone hors du plan focal. En effet, la plupart des modèles mathématiques employés pour modéliser les données de FRAP ne prennent en compte que la mobilité des molécules fluorescentes situées dans le plan focal. Deux paramètres principaux sont ainsi calculés : le coefficient de diffusion (D , généralement exprimé en $\mu\text{m}^2/\text{s}$), qui quantifie la diffusion latérale et la fraction mobile (M_f , exprimé comme un pourcentage ou un ratio) qui indique quelle fraction de molécules est douée de mobilité (Figure 12, panneaux A et B). Ces approches présentent néanmoins des limitations d'ordre technique, interdisant leur application à l'étude de la dynamique des TCR

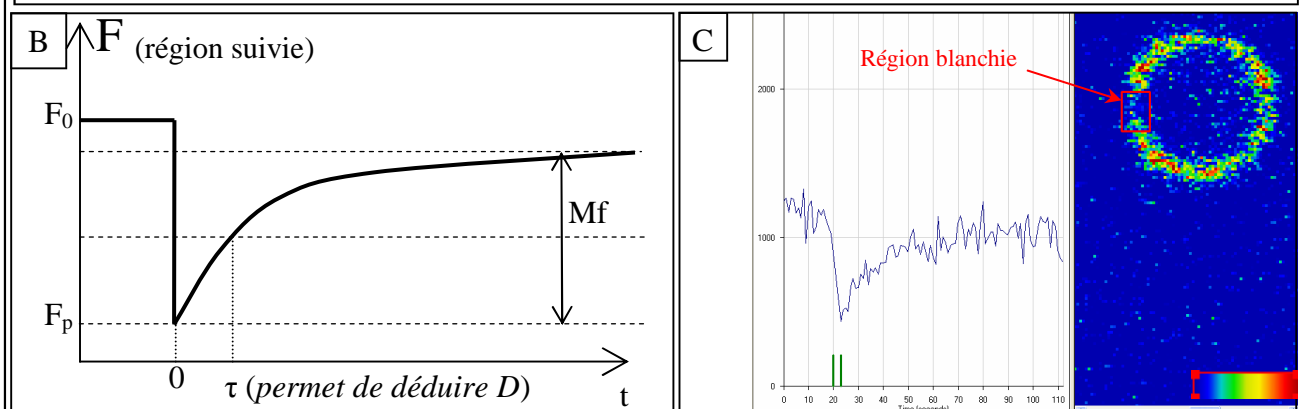
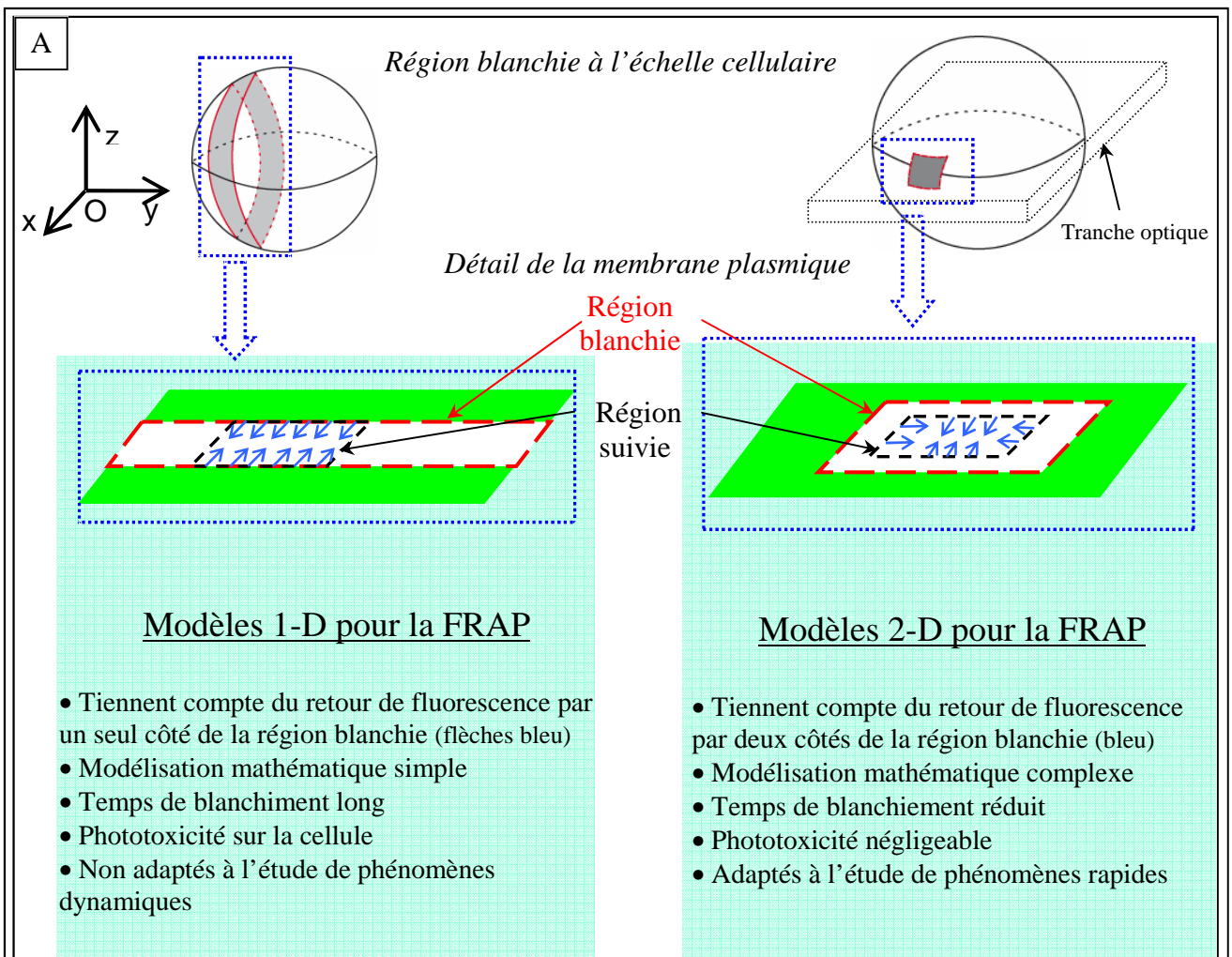


Figure 12 : Principe des techniques de FRAP .

La technique de *Fluorescence Recovery After Photo-bleaching* (FRAP) permet l'étude de la dynamique d'une molécule dans une cellule vivante : la molécule d'intérêt, marquée par un fluorochrome (vert dans l'exemple), est illuminée par un laser de haute intensité, ce qui crée localement une région blanchie (lignée en pointillés rouge) : la mobilité latérale des molécules permet un retour de fluorescence dans cette région. En considérant une zone située dans la région blanchie (région suivie, ligne pointillés noir), il est possible de suivre dans le temps le retour de la fluorescence. Les paramètres caractérisant la courbes fournissent des informations relatives à la mobilité de la molécule d'intérêt.

A– Comparaison des méthodes « conventionnelles » de FRAP en 1-Dimension et de la méthode 2-Dimensions.

B– Courbe théorique d'une expérience de FRAP : la forme de la courbe fournit des informations sur la proportion de molécules douées de mobilité (Fraction mobile M_f) et sur la vitesse à laquelle ces molécules mobiles diffusent (coefficient de diffusion D), qui est déduite du temps de demi-retour de fluorescence (τ).

C– Expérience typique de FRAP effectuée sur les TCR : la fluorescence des TCR est ici visualisée à l'aide d'une échelle en fausses couleurs.

pour des lymphocytes T stimulés par leur antigène. Le blanchiment d'une grande portion cellulaire nécessite du temps, ce qui n'est pas compatible avec l'étude de cellules mobiles telles des lymphocytes T en interaction avec des CPA, dans la mesure où les cellules peuvent en bougeant déplacer la région à blanchir. En outre, un blanchiment massif peut provoquer une phototoxicité sur les cellules étudiées.

Le modèle développé par nos collaborateurs prend en compte le retour de fluorescence dû aux molécules hors du plan focal et permet ainsi de ne blanchir qu'une petite portion des cellules étudiées. Une telle approche permet la réalisation de FRAP sur des structures dynamiques telles que l'interface entre un LT et une CPA (Figure 12, panneau C).

J'ai employé cette méthode toute le long de mon M2R pour étudier la mobilité des TCR en surface des LT humains.

4.2. La mobilité des TCR est semblable chez des LT naïfs et activés

Nous avons dans un premier temps étudié les paramètres caractérisant la mobilité des TCR sur des LT à différents stades d'activation, ceci en l'absence de stimuli. Nous avons comparé la mobilité latérale des TCR de trois populations de LT CD4⁺: des LT naïfs isolés à partir de sang de cordon ombilical (CBTL) ; une lignée cellulaire obtenue après culture *in vitro* pendant deux semaines de LT naïfs en présence de billes magnétiques recouvertes d'anticorps monoclonaux anti-CD28 et anti-CD28 (*activated* CBTL); des LT fraîchement isolés du sang périphérique de donneurs adultes sains (PBL).

Pour mener à bien cette étude, nous avons utilisé un Fab anti-CD3 précédemment produit dans le laboratoire marquée avec du Cy5 qui a permis de marquer les complexes CD3/TCR sur des LT auxiliaires et toxiques vivants au cours d'études précédentes. A noter que cette première partie de l'étude a pour la plus grande partie été réalisée par un ancien étudiant en thèse dans le laboratoire, David Depoil, qui m'a permis de reprendre la suite de ses travaux lorsqu'il est parti à la fin de sa thèse.

Des cellules appartenant aux trois catégories sus-mentionnées ont ainsi été marquées avec le Fab anti-CD3 couplé au Cy5 et soumis à de la FRAP selon le nouveau protocole (Fig. 1 C).

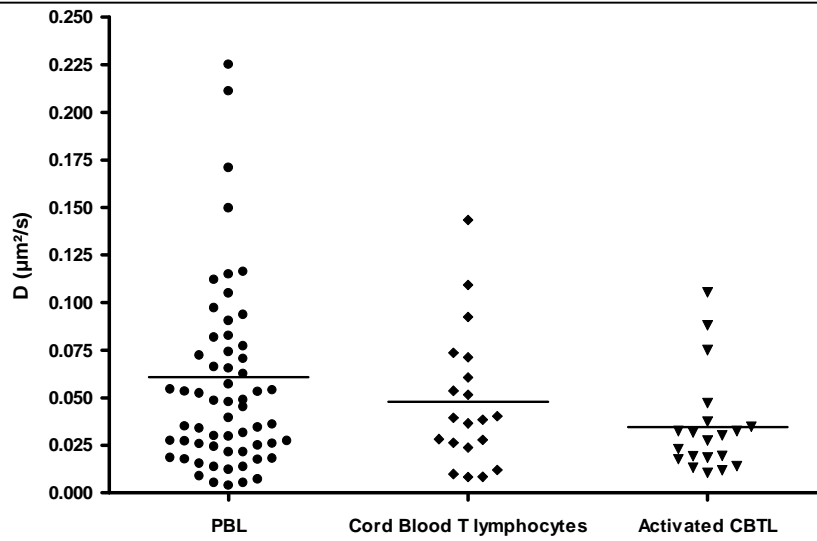


Figure 13 : la mobilité des TCR est indépendante du stade d'activation des LT.

Des LT du sang périphérique (PBL), des LT issus de sang de cordon ombilical soit fraîchement isolés (CBTL) soit activés lors d'une culture *in vitro* (*activated* CBTL) ont subi des expériences de FRAP. Le D correspondant à chaque expérience (une cellule par expérience, un point correspond à une cellule) a été calculé pour chaque population cellulaire. Ces données proviennent de 2 (pour les CBTL) et 4 (pour les PBL) expériences indépendantes

Les résultats de cette analyse sont présentés sur la Figure 13, sur laquelle on peut voir que le coefficient de diffusion est similaire entre les LT naïfs et activés.

Le coefficient de diffusion des TCR (D , exprimé sous la forme de moyenne \pm SEM) était de $0.0478 \pm 0.0079 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les CBTL, $0.0345 \pm 0.0058 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les CBTL activés et de $0.0608 \pm 0.0083 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les PBL. La fraction mobile (M_f) de TCR s'est avérée très forte dans les trois populations cellulaires (~ 0.9), confirmant la notion de mobilité des TCR en surface des LT.

Ces résultats montrent que les paramètres basiques caractérisant la dynamique des TCR en surface des LT ne diffèrent pas de façon significative selon le stade d'activation des LT, ce qui indique que des différences de mobilité des TCR ne peuvent en aucun cas être responsables d'une plus grande sensibilité de LT activés suite à une stimulation antigénique.

4.3. L'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ affecte la mobilité des TCR au moyen d'un mécanisme faisant intervenir le cytosquelette d'actine :

Nous avons par la suite voulu savoir si la transduction du signal des LT pouvait affecter la mobilité des TCR. Pour ce faire, des LT ont été chargés avec la sonde calcique FLUO-4 (dont l'intensité de lumière émise augmente en présence d'ions Ca^{2+}) puis marquées avec le Fab anti-CD3 couplé au Cy5. Ceci nous a permis de détecter la transduction du signal tout en étudiant la dynamique des TCR.

Dans une première approche nous avons stimulé des LT avec de l'ionomycine (un ionophore calcique) pour mimer de l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ qui suit l'engagement des TCR.

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provoque une forte réduction de la diffusion latérale des TCR des PBL comme l'atteste la réduction de D (Figure 14 A). De façon notable, un pré-traitement des LT avec $10 \mu\text{M}$ de cytochalasine D (une drogue qui inhibe la dynamique du cytosquelette d'actine) a abrogé l'effet de l'ionomycine sur la mobilité latérale des TCR (Figure 14 B). Les valeurs de D étaient : $0.0608 \pm 0.008 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les PBL non stimulés, $0.0168 \pm 0.002 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les PBL stimulés avec l'ionomycine, $0.0682 \pm 0.014 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les PBL traités avec seulement de la cytochalasine D et $0.0424 \pm 0.004 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les PBL traités concomitamment avec de l'ionomycine et de la cytochalasine D.

Des résultats similaires ont été obtenus en employant 50 nM de latrunculine B au lieu de la cytochalasine afin d'empoisonner le cytosquelette d'actine (données non présentées).

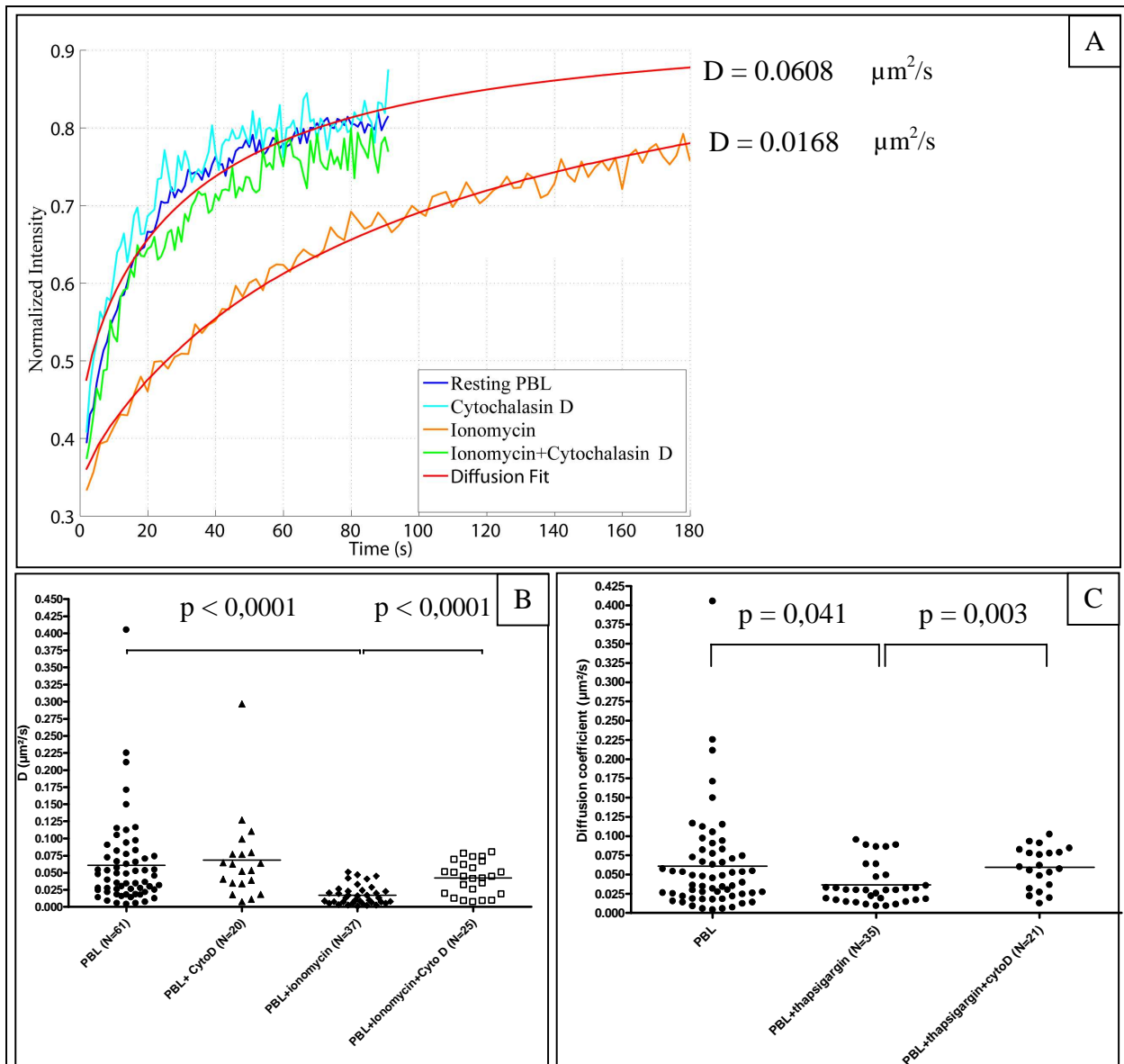


Figure 14: La mobilité des TCR est affectée par l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

A- Des PBL traités ou non par les drogues indiquées ont été soumis à la FRAP. Les lignes de couleur indiquent la valeur moyenne de la courbe de retour de fluorescence dans chaque cas. La courbe rouge sombre indique l'ajustement des données par l'équation modèle. Les valeurs de D pour les PBL non traités et traités par l'ionomycine sont indiquées.

Les données directement obtenues à partir des mesures sont indiquées en **B**.

B- et **C-** Les valeurs de D de cellules individuelles soit non traitées, soit traitées par de la cytochalasine D, de l'ionomycine ou par les deux drogues (**B-**) ou traitées par de la thapsigargine ou de la thapsigargine + cytochalasine D (**C-**) sont représentées. Le caractère significatif des différences observées entre les différents groupes a été évalué par un test non apparié de Student réalisé avec le logiciel GraphPad Prism. Les données sont issues de quatre expériences indépendantes.

Afin de mieux caractériser le rôle de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ dans l'interférence avec la mobilité des TCR, nous avons traité des PBL avec 1 μ M de thapsigargine, une drogue qui provoque une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ par un mécanisme distinct de celui de l'ionomycine (la thapsigargine inhibe la pompe à Ca^{2+} du Réticulum Endoplasmique). Des résultats préliminaires indiquent que dans ce cas-là aussi l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ est corrélée à une réduction dépendante du cytosquelette d'actine de la valeur D des TCR (Figure 14 C).

Il est à noter que les traitements présentés ci-dessus, bien que produisant une réduction des valeurs de D, n'ont pas affecté la Mf des TCR (qui demeurait proche de 0,9 pour les différents échantillons). Ces résultats indiquent que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ affecte la mobilité des TCR sans diminuer le pourcentage de molécules mobiles.

Considérés dans leur ensemble, ces résultats indiquent que l'activation de la voie de signalisation calcique entraîne une réduction de la mobilité des TCR au-travers d'un mécanisme faisant intervenir le cytosquelette d'actine.

4.4. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induit une augmentation de la polymérisation du cytosquelette d'actine :

Les résultats ci-dessus indiquent qu'à la suite de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, le cytosquelette d'actine devient une contrainte pour la mobilité des TCR. Afin de mieux définir le lien entre l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ et la fonction du cytosquelette d'actine, nous avons quantifié la F-actine (actine polymérisée) dans des LT par une analyse en FACS. Les PBL ont ainsi été traités ou non avec 2,5 μ g/mL d'ionomycine, 1 μ M de thapsigargine ou des concentrations croissantes de latrunculine (une drogue qui provoque une dépolymérisation du cytosquelette d'actine) pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées à l'aide de phalloïdine couplée à de l'Alexa 488 pour marquer spécifiquement la F-actine.

Comme le montre la Figure 15, le traitement par de la latrunculine a entraîné de façon dose-dépendante une diminution de la quantité de F-actine chez les LT, appuyant l'idée que cette analyse en FACS est adaptée à la quantification de la F-actine dans nos cellules.

De façon intéressante, le traitement des LT par de l'ionomycine ou de la thapsigargine a provoqué une augmentation de la concentration de F-actine (Figure 15, courbes rouge et vert).

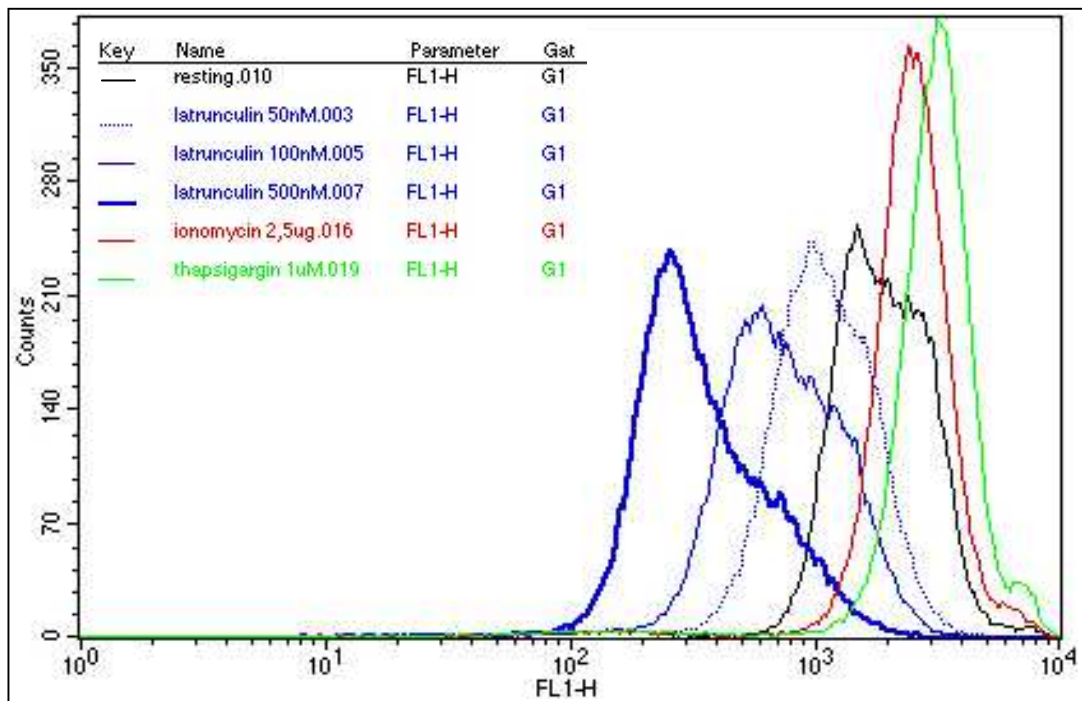


Figure 15 : L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ induit la polymérisation de l'actine dans les PBL.

Les PBL ont été traités durant 15 min avec les drogues indiquées. Le contenu en F-actine a été mesuré par FACS. Les résultats sont issus d'une expérience représentative de trois.

Il faut cependant noter que la concentration d'ionomycine pour laquelle une claire augmentation de la quantité de F-actine a été observée était de 2.5 µg/mL alors qu'une réduction de la mobilité des TCR était significative pour une concentration de 0.5 µg/mL (une concentration d'ionomycine généralement employée pour activer les LT, cf. Fig. 3). Les raisons de ces différences demeurent pour le moment floues. Il est possible que les effets sur la mobilité des TCR précèdent (en terme de sensibilité aux concentrations d'ionomycine employées) une polymérisation massive de F-actine ; d'autre part, une différence dans la sensibilité des méthodes employées (FRAP *versus* FACS) pourrait rendre compte de ces variations. De plus, l'aspect bimodal des courbes montrant les PBL non traités peut refléter l'existence de plusieurs populations différant par la quantité de F-actine, par exemple suite à l'activation d'intégrines telle LFA-1.

Ces résultats montrent que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ résulte en une augmentation de la quantité de F-actine dans les LT : ils suggèrent que l'augmentation de la polymérisation du cytosquelette d'actine pourrait être responsable des effets observés sur la mobilité des TCR suite à une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$.

4.5. La stimulation antigénique affecte la dynamique des TCR sur des LT vivants

Pris dans leur ensemble, les résultats précédents indiquent qu'en l'absence de stimulation, les TCR présentent une mobilité non négligeable en surface de lymphocytes T humains vivants. De plus, ils indiquent que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ réduit fortement la mobilité des TCR au moyen d'un mécanisme faisant intervenir le cytosquelette d'actine .

Cette augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ constituant une voie de signalisation centrale dans la cascade de transduction du signal associée à l'engagement du TCR, nous avons cherché à savoir si l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'engagement du TCR affectait la mobilité des TCR de LT en interaction avec une CPA présentant leur peptide antigénique.

Il est important de noter que cette approche est délicate techniquement parlant et qu'elle nécessite du temps. De plus, l'analyse des résultats obtenus est complexe. En effet, il est difficile de procéder au blanchissement de l'aire de contact dynamique entre un LT et sa CPA ; il est en plus indispensable de pouvoir suivre les cellules durant la durée nécessaire au retour de fluorescence du fait de leur mobilité. Pour ces raisons, les résultats obtenus à ce jour ne sont que préliminaires.

Ainsi, des LB transformés par le Virus d'Epstein-Barr non marqués et chargés ou non avec le peptide antigénique ont été déposés dans des chambres d'observation recouvertes de Poly-D-Lysine. La densité de CPA a été ajustée au cours d'expériences préparatoires pour obtenir un nombre de cellules approprié aux expériences : la visualisation de conjugués LT/CPA a ainsi été optimisée.

Des LT chargés avec du FLUO-4 AM et marqués avec le Fab anti-CD3 couplé au Cy5 ont été déposées sur les CPA. L'enregistrement était lancé lorsqu'un LT se trouvait à proximité d'une CPA. Une image était prise à chaque seconde ; l'enregistrement durait jusqu'à 200 s.

Pour des raisons techniques il était très difficile de blanchir le site de contact entre un LT et une CPA non chargée avec le peptide antigénique. Les LT s'avèrent être très mobiles dans ces conditions, bougeant à la surface des CPA à une vitesse d'environ 9 $\mu\text{m}/\text{min}$, et se détachant très rapidement des CPA.

Pour ces raisons j'ai décidé de reporter à plus tard les expériences impliquant des CPA non chargées avec le peptide antigénique et me suis dans un premier appliqué à étudier des LT interagissant avec des CPA chargées avec une concentration optimale de peptide antigénique.

Il a été en effet clairement établi que dans ces conditions les LT reçoivent un "*stop signal*" qui les maintient immobiles pendant un long moment durant lequel ils sont le siège d'une signalisation soutenue dans le temps. A titre de témoin négatif, j'ai mesuré la mobilité des TCR de LT spécifiques d'antigènes en l'absence de CPA.

Les résultats préliminaires que j'ai obtenus sont présentés dans la figure 16. Ces résultats montrent que dans des conditions de repos, la mobilité des TCR en surface de clones de LT humains est similaire à celle mesurée dans pour des LT humains naïfs, pour des PBL ou pour une lignée polyclonale de LT (comparer figure 16 et figure 13). De façon intéressante, pour des LT en interaction avec des CPA chargées avec le peptide antigénique et donc subissant une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ prolongée, la valeur D du TCR était réduite, ce qui indique que de même que pour d'autres populations de LT, l'activation de la voie calcique chez des LT stimulés par leur antigène conduit à une réduction de la mobilité des TCR en surface des cellules. Nous avons aussi observé dans ces conditions une fraction mobile (Mf) réduite (Figure 16).

Les expériences se poursuivent et je remercie Omer Dushek qui a mis au point en collaboration avec nous un programme permettant de suivre les cellules mobiles durant l'analyse des séquences enregistrées. Ceci devrait faciliter l'avancement de nos recherches.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que la mobilité des TCR est réduite lorsque des LT humains sont stimulés par leur antigène, ce qui soulève la question de savoir comment les TCR peuvent se diriger vers le site de contact LT/CPA afin de former la synapse immunologique.

4.6. Les TCR sont acheminés vers la Synapse Immunologique par le cytosquelette d'actine

Pour répondre à cette question, nous avons envisagé la possibilité selon laquelle la « liaison » du TCR au cytosquelette d'actine suite à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ aurait deux effets : d'une part elle diminuerait la diffusion latérale des TCR par répulsion stérique ; d'autre part elle permettrait au cytosquelette d'actine, en se polarisant vers la synapse immunologique, de favoriser le recrutement des TCR vers la zone de signalisation.

La meilleure approche pour étudier ce phénomène consistait à mettre au point une expérience durant laquelle le recrutement du cytosquelette d'actine vers un pôle de la cellule pourrait être induit indépendamment de l'engagement des TCR. Ceci nous permettrait de vérifier si l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ permet au cytosquelette d'actine d'acheminer les TCR vers la SI.

Au cours d'expériences préparatoires nous avons étudié l'enrichissement de la F-actine au niveau de la SI dans le cas de LT stimulés par leur antigène. Les résultats obtenus indiquent, en accord avec de précédentes études, que le cytosquelette d'actine s'accumule au niveau de la synapse immunologique durant les premières minutes suivant la formation d'un conjugué entre LT et CPA (données non présentées).

Afin de créer une condition permettant la polarisation du cytosquelette d'actine en l'absence d'engagement des TCR, nous avons formé des conjugués entre LT et CPA non chargés avec le peptide antigénique (ceci afin d'engager les molécules d'adhésion) : les cellules ont été traitées avec un milieu tampon contenant 10 mM de manganèse, ceci afin d'activer les intégrines (de Bruyn et al., 2002; Dransfield et al., 1992; Porter et al., 2002) et David Depoil, communication personnelle).

Dans certains cas les LT ont été traités avec de l'ionomycine pour provoquer une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ et potentiellement lier les TCR au cytosquelette d'actine. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées avec de la phalloïdine, des anticorps anti-chaîne ζ (en vue de détecter l'enrichissement des complexes TCR/CD3- ζ au site de contact

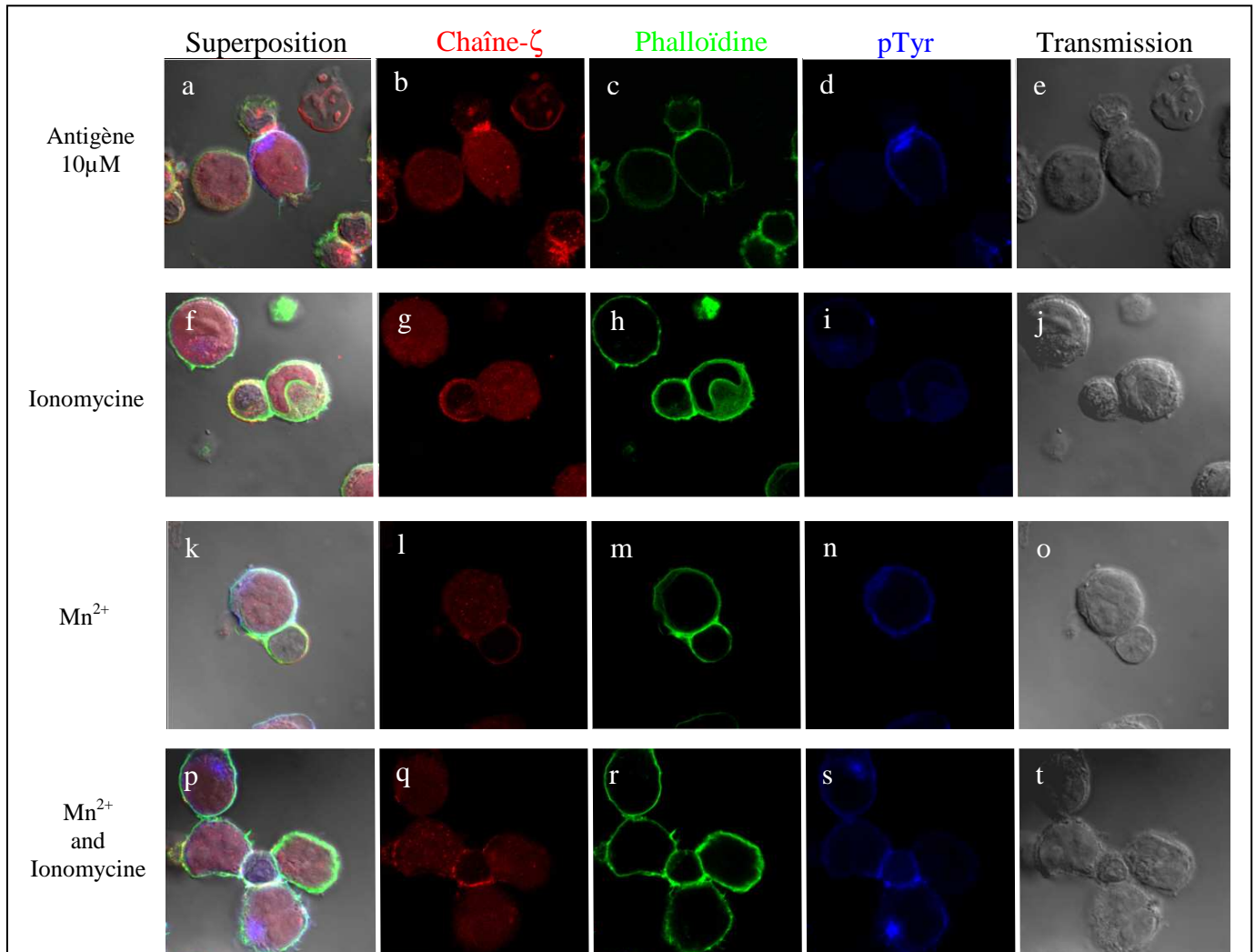


Figure 17 : les TCR peuvent suivre la F-actine vers la SI de façon indépendante de l'antigène.

Des LT (clone 6396p5.1.2) ont été conjuguées avec des CPA soit non chargées (f-t) ou chargées avec 10 μ M de peptide (a-e). Les cellules ont été marquées avec de la phalloïdine (vert), un anticorps anti-chaîne ζ (rouge) et anti-pTyr (bleu).

Les conjugués LT/CPA conjuguées soit non traitées (a-e) ou traitées avec de l'ionomycine (f-j), Mn²⁺ (k-o) ou avec du Mn²⁺ avec de ionomycine (p-t).

Les données sont tirées d'une expérience représentative de deux.

entre cellules) et des anticorps anti-Ptyr pour détecter une activité de transduction des signaux.

Nos résultats, pour l'instant encore préliminaires, indiquent que dans le cas de LT en interaction durant 30 minutes avec des CPA non chargées avec le peptide antigénique et en présence de 10 mM de tampon Mn^{2+} seulement, alors que le cytosquelette d'actine se polarise vers la SI, les complexes TCR/CD3- ζ demeurent dispersés sur toute la surface des LT (Figure 17 k-o). Au contraire, lorsque les cellules en interaction sont traitées avec de l'ionomycine, on observe, en parallèle de l'enrichissement en F-actine, un enrichissement des TCR sur le site de la SI. (Figure 17 p-t).

Au cours d'expériences de contrôle nous avons observé un enrichissement en F-actine au niveau de la SI pour des LT après 30 minutes d'interaction avec des CPA chargées avec le peptide antigénique (Fig. 6 a-e). Un net enrichissement de F-actine a été observé plus précocement lors de l'interaction (données non présentées).

Il paraît indispensable de souligner le caractère préliminaire de tels résultats qui dérivent d'expériences pour lesquelles nous recherchons les conditions optimales afin d'étudier le rôle de la F-actine dans la mobilité des TCR. Ces résultats doivent être reproduits et quantifiés à l'aide d'une méthode non subjective.

Si confirmés, ces résultats indiqueraient que suite à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, les TCR suivent passivement le cytosquelette d'actine et que la « liaison » de TCR non engagés au cytosquelette est un mécanisme majeur permettant d'assurer leur acheminement à la synapse immunologique.

5. Discussion

L'activation des LT par leur antigène spécifique, qui est un événement central dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative, a été étudiée précisément au cours des dernières années. Les paramètres physico-chimiques caractérisant la liaison du TCR au complexe peptide-CMH (Krogsgaard and Davis, 2005), les cascades de signalisation activées par l'engagement des TCR (Trautmann and Valitutti, 2003) et les réponses biologiques mises en place par des LT en fonction des divers stimuli reçus (Faroudi et al., 2003) ont été définis dans le détail. Néanmoins, une définition claire des mécanismes moléculaires mis en jeu au niveau du site de contact LT/ CPA et responsables de l'assemblage des cascades de signalisation fait encore défaut. En particulier, il reste à définir par quels moyens les TCR,

pièces centrales dans la reconnaissance de l'antigène, circulent en surface des LT et sont recrutés vers la SI afin d'interagir avec les complexes peptide-CMH présentés par la CPA.

Nos expériences fournissent une première piste pour répondre à cette problématique stimulante. Nos montrons que les TCR sont constitutivement mobiles à la surface des LT. Ces résultats, conjointement avec des observations déjà effectuées dans le laboratoire (Favier et al., 2001) et des résultats publiés par d'autres groupes (Moss et al., 2002; Varma et al., 2006), appuient définitivement la notion d'un TCR qui, à l'image d'autres récepteurs, possède une mobilité latérale. Cette propriété est dans le principe suffisante pour permettre à un TCR de parcourir en totalité la surface du LT en environ 30 minutes et pour que 50% de la totalité des TCR présents en surface de la cellule s'accumule au niveau de la SI dans les 5 à 10 minutes suivant le début de l'interaction avec les CPA (Omer Dushek, communication personnelle).

La mobilité latérale des TCR demeure similaire chez des populations de LT à différents stades d'activation, ce qui indique que ce paramètre n'est pas à l'origine d'une plus grande sensibilité des LT activés aux stimulations antigéniques (Figure 13).

Une importante mobilité latérale et une rapide circulation des TCR de la surface cellulaire semblent nécessaires dans des conditions de repos à une rapide détection des stimuli antigéniques. Au contraire, cette même mobilité pourrait nuire à une interaction fructueuse avec une CPA présentant le peptide antigénique d'intérêt. En effet, dans le cas où les TCR seraient délivrés très rapidement à la SI, ils seraient engagés et subséquentement dégradés rapidement, menant à une extinction prématurée du signal transduit. Dans ces conditions, les LT ne pourraient être le siège de la signalisation soutenue requise pour leur activation.

Nos résultats offrent une solution possible à ce qui apparaît comme un paradoxe en montrant que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ diminue la mobilité latérale des TCR (Figure 14). Ce phénomène pourrait constituer le « *pace maker* » de l'engagement en série des TCR et de la signalisation soutenue des LT lors de leur interaction avec les CPA.

Nos résultats montrent aussi que cette réduction de mobilité latérale des TCR nécessite, pour être effective, un cytosquelette d'actine fonctionnel. Ceci suggère qu'à la suite de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, les TCR se lient au cytosquelette d'actine ou à des protéines de liaison à l'actine. D'un autre côté, l'augmentation de la quantité de F-actine due à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ pourrait augmenter la viscosité de la membrane plasmique de LT, affectant ainsi la mobilité des TCR et potentiellement d'autres molécules. À ce jour, nos résultats ne permettent pas de favoriser l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Néanmoins, il est important de souligner que nos résultats sont compatibles avec le modèle des « *fence and pickets* » (Kusumi et al., 2005). Ce modèle postule que la mobilité

des molécules membranaires, qu'elles soient transmembranaires ou simplement ancrées dans la bicouche phospholipidique, dépend du niveau de polymérisation de l'actine (le « *fence* ») et de l'ancrage de certaines protéines à la F-actine (les « *pickets* »). À la lumière de nos résultats, les TCR pourrait tout aussi bien être un « *picket* », directement ou indirectement ancré à la F-actine ou une molécule dont la diffusion serait limitée par les « *fences and pickets* ». Les travaux indiquant une liaison des TCR à a F-actine suite à la stimulation pèsent en faveur d'un TCR vu comme un « *picket* » (Caplan and Baniyash, 1996; Rozdzial et al., 1995).

Nos observations montrent que les TCR sont potentiellement liés ou restreints par la F-actine, ce qui soulève la question de comment les TCR peuvent se diriger vers la SI. Pour tenter d'y répondre, nous avons envisagés la possibilité que les TCR pouvaient suivre la F-actine vers la SI à la manière de “poissons pris dans un filet”.

Il est en effet bien établi que l'on observe un enrichissement de F-actine sur le site de la SI. En outre, des travaux de Wulfig et coll. ont montré que le réseau cortical de F-actine se polarise au site de contact entre LT et CPA (Tskvitaria-Fuller et al., 2003). Nos résultats, quoique préliminaires, sont compatibles avec ces observations. Nous montrons en effet que la F-actine est rapidement enrichie sur le site de la SI de façon antigène-dépendante (Figure 17). Nous montrons également que dans des conditions pour lesquelles les intégrines sont activées par du Mn^{2+} (Dransfield et al., 1992), la F-actine est également enrichie au site de contact entre LT et CPA non chargée avec le peptide antigénique. Enfin, nos résultats préliminaires montrent aussi que les TCR semblent suivre la F-actine vers la SI formée entre LT et CPA non chargée avec le peptide antigénique à la manière de « poissons pris dans un filet ».

Il est aussi intéressant de spéculer que la liaison ou le « trappage » des TCR à un réseau de F-actine permet l'édification d'un échafaudage favorisant l'assemblage des éléments permettant la signalisation en aval du TCR. L'idée de TCR hautement mobiles est difficilement réconciliable avec la nécessité d'assembler des complexes supra-moléculaires comportant des molécules adaptatrices et des composants de signalisation présents sur le site de SI. L'observation que les TCR pris dans le réseau de F-actine possèdent une mobilité latérale moindre est compatible avec la formation de tels complexes.

Cette hypothèse rejoint les travaux récemment présentés par M. Dustin et coll. montrant la nécessité d'un cytosquelette d'actine intègre pour permettre la signalisation par les *microclusters* de TCR (Varma et al., 2006; Yokosuka et al., 2005)

Au cours de travaux précédents du laboratoire, il a été montré que les SI sont des structures dynamiques et adaptables capables de se désassembler pour se reformer lorsqu'un LT interagit simultanément avec plusieurs CPA. Il a été en particulier montré que des TCR de

localisation extra-synaptique pouvaient supplanter des TCR déjà accumulés au sein d'une SI et diriger leur repolarisation vers une nouvelle SI (Depoil et al., 2005). Les mécanismes moléculaires à l'origine d'un tel phénomène demeurent flous. Nos résultats, montrant que les TCR sont liés ou trappés par la F-actine, suggèrent que le cytosquelette d'actine pourrait constituer la force motrice dirigeant les TCR vers une nouvelle SI.

En conclusion, nos résultats, quoique préliminaires et partiels, nous permettent d'envisager le processus de la formation d'une SI selon un angle original. Ils impliquent que les TCR voient leur mobilité latérale diminuer suite à leur activation par un stimulus antigénique. Ceci pourrait être indispensable à un positionnement correct ainsi qu'un engagement régulé des TCR, ce qui permettrait une régulation fine de la durée de signalisation.

Conclusion générale :

L'année qui vient de s'écouler m'a donné l'occasion de m'immerger pleinement dans le monde de la recherche et de me consacrer à un projet qui m'avait été confié. J'ai pu ainsi apprécier les joies et les difficultés qu'éprouvent ceux qui consacrent leur vie à faire progresser la science. Cette année fut riche d'enseignements et de rencontres. Je suis heureux d'avoir pu m'investir dans un projet multidisciplinaire qui par sa thématique éloignée du monde vétérinaire constituait pour moi un défi à relever. J'ai trouvé particulièrement savoureux de pouvoir m'imprégner de la thématique en lisant les travaux publiés sur le sujet pour rendre possible une vision critique des expériences menées et mieux imaginer quelles expériences pourraient être menées. Cette démarche « active », quoique exigeante en temps et en efforts, est extrêmement stimulante. Le projet est actuellement poursuivi par les membres de l'équipe du Pr. Salvatore Valitutti et donnera éventuellement lieu à une publication.

Cette période de M2R m'a donné envie de poursuivre mes prospections dans le monde de la recherche. J'ai eu l'opportunité de me consacrer à un projet traitant de la grippe aviaire, thématique plaisante pour moi dans la mesure où elle consiste en l'étude d'une zoonose pour laquelle tous les mécanismes physiopathologiques ne sont pas compris, en particulier l'absence de signes cliniques chez le canard, espèce réservoir par excellence. Ce sujet me permet en outre de travailler sur la physiologie et l'immunité des oiseaux, animaux que j'adore depuis bien des années. Je ne peux prévoir quels seront les résultats de ces recherches, mais je suis heureux de pouvoir y participer.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mr SOUBIES, Sébastien, Mathieu

a été admis(e) sur concours en : 2002

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 18 Octobre 2007

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

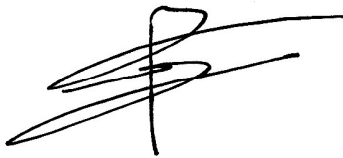
Je soussignée, Séverine BOULLIER, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

Mr SOUBIES, Sébastien, Mathieu

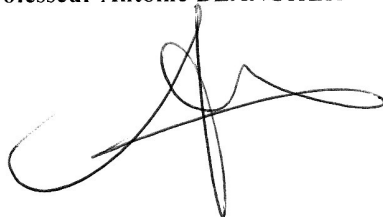
intitulée :

« Etude des mécanismes moléculaires concourant à la mobilité des TCR en surface des lymphocytes T »

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



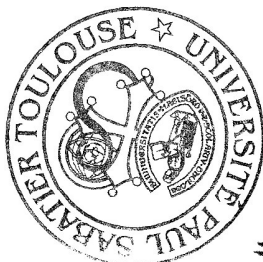
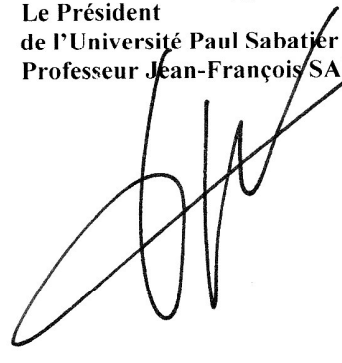
**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Antoine BLANCHER**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu le : 20 DEC. 2007
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



Références bibliographiques :

- Alarcon, B., Berkhout, B., Breitmeyer, J., and Terhorst, C. (1988).
Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3-gamma.delta.epsilon core and single T cell receptor alpha or beta chains.
J Biol Chem **263**, 2953-61.
- Alarcon, B., Swamy, M., van Santen, H. M., and Schamel, W. W. (2006).
T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity.
EMBO Rep **7**, 490-5.
- Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W. W. (1976).
Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics.
Biophys J **16**, 1055-69.
- Bentley, G. A., and Mariuzza, R. A. (1996).
The structure of the T cell antigen receptor.
Annu Rev Immunol **14**, 563-90.
- Bluestone, J. A., Jameson, S., Miller, S., and Dick, R., 2nd (1992).
Peptide-induced conformational changes in class I heavy chains alter major histocompatibility complex recognition.
J Exp Med **176**, 1757-61.
- Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G. M. (2002).
The secretory synapse: the secrets of a serial killer.
Immunol Rev **189**, 152-60.
- Bouso, P., Bhakta, N. R., Lewis, R. S., and Robey, E. (2002).
Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy.
Science **296**, 1876-80.
- Caplan, S., and Baniyash, M. (1996).
Normal T cells express two T cell antigen receptor populations, one of which is linked to the cytoskeleton via zeta chain and displays a unique activation-dependent phosphorylation pattern.
J Biol Chem **271**, 20705-12.
- Chang, J. T., Palanivel, V. R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A. M., Banerjee, A., Longworth, S. A., Vinup, K. E., Mrass, P., Oliaro, J., Killeen, N., Orange, J. S., Russell, S. M., Weninger, W., and Reiner, S. L. (2007).
Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses.
Science **315**, 1687-91.
- Davis, S. J., and van der Merwe, P. A. (2006).
The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond.
Nat Immunol **7**, 803-9.
- de Bruyn, K. M., Rangarajan, S., Reedquist, K. A., Figdor, C. G., and Bos, J. L. (2002).
The small GTPase Rap1 is required for Mn(2+)- and antibody-induced LFA-1- and VLA-4-mediated cell adhesion.
J Biol Chem **277**, 29468-76.
- De Magistris, M. T., Alexander, J., Coggeshall, M., Altman, A., Gaeta, F. C., Grey, H. M., and Sette, A. (1992).
Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor.
Cell **68**, 625-34.
- Depoil, D., Zaru, R., Guiraud, M., Chauveau, A., Harriague, J., Bismuth, G., Utny, C., Muller, S., and Valitutti, S. (2005).

- Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization.
Immunity **22**, 185-94.
- Downey, G. P., Chan, C. K., and Grinstein, S. (1989).
Actin assembly in electropermeabilized neutrophils: role of G-proteins.
Biochem Biophys Res Commun **164**, 700-5.
- Dransfield, I., Cabanas, C., Craig, A., and Hogg, N. (1992).
Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1.
J Cell Biol **116**, 219-26.
- Edidin, M., Kuo, S. C., and Sheetz, M. P. (1991).
Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers.
Science **254**, 1379-82.
- Edidin, M., Zuniga, M. C., and Sheetz, M. P. (1994).
Truncation mutants define and locate cytoplasmic barriers to lateral mobility of membrane glycoproteins.
Proc Natl Acad Sci U S A **91**, 3378-82.
- 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**, 1308-10.
- Faroudi, M., Utzny, C., Salio, M., Cerundolo, V., Guiraud, M., Muller, S., and Valitutti, S. (2003).
Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold.
Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 14145-50.
- Favier, B., Burroughs, N. J., Wedderburn, L., and Valitutti, S. (2001).
TCR dynamics on the surface of living T cells.
Int Immunol **13**, 1525-32.
- Friedl, P., and Storim, J. (2004).
Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse.
Trends Cell Biol **14**, 557-67.
- Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K., and Kusumi, A. (2002).
Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane.
J Cell Biol **157**, 1071-81.
- Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996).
Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2.
Nature **384**, 134-41.
- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., and Wilson, I. A. (1996).
An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex.
Science **274**, 209-19.
- Gil, D., Schamel, W. W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F., and Alarcon, B. (2002).
Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation.
Cell **109**, 901-12.
- Goldsmith, M. A., and Weiss, A. (1988).
Early signal transduction by the antigen receptor without commitment to T cell activation.
Science **240**, 1029-31.
- Grabham, P. W., Foley, M., Umeojiako, A., and Goldberg, D. J. (2000).
Nerve growth factor stimulates coupling of beta1 integrin to distinct transport mechanisms in the filopodia of growth cones.
J Cell Sci **113** (Pt 17), 3003-12.

- 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.
- Hailman, E., Burack, W. R., Shaw, A. S., Dustin, M. L., and Allen, P. M. (2002).
Immature CD4(+)CD8(+) thymocytes form a multifocal immunological synapse with sustained tyrosine phosphorylation.
Immunity **16**, 839-48.
- Huppa, J. B., and Ploegh, H. L. (1997).
In vitro translation and assembly of a complete T cell receptor-CD3 complex.
J Exp Med **186**, 393-403.
- Huse, M., Lillemeier, B. F., Kuhns, M. S., Chen, D. S., and Davis, M. M. (2006).
T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion.
Nat Immunol **7**, 247-55.
- Irvine, D. J., Purbhoo, M. A., Krogsgaard, M., and Davis, M. M. (2002).
Direct observation of ligand recognition by T cells.
Nature **419**, 845-9.
- Isakov, N., and Altman, A. (2002).
Protein kinase C(theta) in T cell activation.
Annu Rev Immunol **20**, 761-94.
- Jacobelli, J., Chmura, S. A., Buxton, D. B., Davis, M. M., and Krummel, M. F. (2004).
A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation.
Nat Immunol **5**, 531-8.
- Jacobson, K., Ishihara, A., and Inman, R. (1987).
Lateral diffusion of proteins in membranes.
Annu Rev Physiol **49**, 163-75.
- Jorgensen, J. L., Esser, U., Fazekas de St Groth, B., Reay, P. A., and Davis, M. M. (1992).
Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics.
Nature **355**, 224-30.
- Kalergis, A. M., Boucheron, N., Doucey, M. A., Palmieri, E., Goyarts, E. C., Vegh, Z., Luescher, I. F., and Nathenson, S. G. (2001).
Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex.
Nat Immunol **2**, 229-34.
- Kenworthy, A. K., Nichols, B. J., Remmert, C. L., Hendrix, G. M., Kumar, M., Zimmerberg, J., and Lippincott-Schwartz, J. (2004).
Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface.
J Cell Biol **165**, 735-46.
- Krogsgaard, M., and Davis, M. M. (2005).
How T cells 'see' antigen.
Nat Immunol **6**, 239-45.
- Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R. S., Kondo, J., and Fujiwara, T. (2005).
Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules.
Annu Rev Biophys Biomol Struct **34**, 351-78.
- Kusumi, A., Sako, Y., and Yamamoto, M. (1993).

- Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells.
Biophys J **65**, 2021-40.
- Lee, K. H., Dinner, A. R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T. N., Burack, W. R., Wu, H., Wang, J., Kanagawa, O., Markiewicz, M., Allen, P. M., Dustin, M. L., Chakraborty, A. K., and Shaw, A. S. (2003).
The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation.
Science **302**, 1218-22.
- Lenne, P. F., Wawrezynieck, L., Conchonaud, F., Wurtz, O., Boned, A., Guo, X. J., Rigneault, H., He, H. T., and Marguet, D. (2006).
Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork.
Embo J **25**, 3245-56.
- Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D. L., and Vignali, D. A. (2000).
On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation.
Immunity **13**, 665-75.
- Ludford-Menting, M. J., Oliaro, J., Sacirbegovic, F., Cheah, E. T., Pedersen, N., Thomas, S. J., Pasam, A., Iazzolino, R., Dow, L. E., Waterhouse, N. J., Murphy, A., Ellis, S., Smyth, M. J., Kershaw, M. H., Darcy, P. K., Humbert, P. O., and Russell, S. M. (2005).
A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation.
Immunity **22**, 737-48.
- Matsui, K., Boniface, J. J., Reay, P. A., Schild, H., Fazekas de St Groth, B., and Davis, M. M. (1991).
Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors.
Science **254**, 1788-91.
- McKeithan, T. W. (1995).
Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction.
Proc Natl Acad Sci U S A **92**, 5042-6.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998).
Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells.
Nature **395**, 82-6.
- Moss, W. C., Irvine, D. J., Davis, M. M., and Krummel, M. F. (2002).
Quantifying signaling-induced reorientation of T cell receptors during immunological synapse formation.
Proc Natl Acad Sci U S A **99**, 15024-9.
- Murase, K., Fujiwara, T., Umemura, Y., Suzuki, K., Iino, R., Yamashita, H., Saito, M., Murakoshi, H., Ritchie, K., and Kusumi, A. (2004).
Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques.
Biophys J **86**, 4075-93.
- Negulescu, P. A., Krasieva, T. B., Khan, A., Kerschbaum, H. H., and Cahalan, M. D. (1996).
Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen.
Immunity **4**, 421-30.
- Nelson, S., Horvat, R. D., Malvey, J., Roess, D. A., Barisas, B. G., and Clay, C. M. (1999).
Characterization of an intrinsically fluorescent gonadotropin-releasing hormone receptor and effects of ligand binding on receptor lateral diffusion.
Endocrinology **140**, 950-7.

- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K., and Messaoudi, I. (2004).
The many important facets of T-cell repertoire diversity.
Nat Rev Immunol **4**, 123-32.
- Norcross, M. A. (1984).
A synaptic basis for T-lymphocyte activation.
Ann Immunol (Paris) **135D**, 113-34.
- Peters, R., and Cherry, R. J. (1982).
Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: experimental test of the Saffman-Delbruck equations.
Proc Natl Acad Sci U S A **79**, 4317-21.
- Porter, J. C., Bracke, M., Smith, A., Davies, D., and Hogg, N. (2002).
Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion.
J Immunol **168**, 6330-5.
- Purbhoo, M. A., Irvine, D. J., Huppa, J. B., and Davis, M. M. (2004).
T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse.
Nat Immunol **5**, 524-30.
- Roess, D. A., Horvat, R. D., Munnely, H., and Barisas, B. G. (2000).
Luteinizing hormone receptors are self-associated in the plasma membrane.
Endocrinology **141**, 4518-23.
- Rozdzial, M. M., Malissen, B., and Finkel, T. H. (1995).
Tyrosine-phosphorylated T cell receptor zeta chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes.
Immunity **3**, 623-33.
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., and Wilson, I. A. (2006).
How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors.
Annu Rev Immunol **24**, 419-66.
- Saffman, P. G., and Delbruck, M. (1975).
Brownian motion in biological membranes.
Proc Natl Acad Sci U S A **72**, 3111-3.
- Sako, Y., and Kusumi, A. (1994).
Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis.
J Cell Biol **125**, 1251-64.
- Samelson, L. E., Harford, J. B., and Klausner, R. D. (1985).
Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex.
Cell **43**, 223-31.
- Sant'Angelo, D. B., Waterbury, G., Preston-Hurlburt, P., Yoon, S. T., Medzhitov, R., Hong, S. C., and Janeway, C. A., Jr. (1996).
The specificity and orientation of a TCR to its peptide-MHC class II ligands.
Immunity **4**, 367-76.
- Schamel, W. W., Arechaga, I., Risueno, R. M., van Santen, H. M., Cabezas, P., Risco, C., Valpuesta, J. M., and Alarcon, B. (2005).
Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response.
J Exp Med **202**, 493-503.
- Schamel, W. W., Risueno, R. M., Minguet, S., Ortiz, A. R., and Alarcon, B. (2006).
A conformation- and avidity-based proofreading mechanism for the TCR-CD3 complex.
Trends Immunol **27**, 176-82.
- Schumacher, T. N. (2002).

- T-cell-receptor gene therapy.
Nat Rev Immunol **2**, 512-9.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., and Ohashi, P. S. (1999).
Selection of the T cell repertoire.
Annu Rev Immunol **17**, 829-74.
- Shaw, A. S., and Dustin, M. L. (1997).
Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation.
Immunity **6**, 361-9.
- Sheetz, M. P., Schindler, M., and Koppel, D. E. (1980).
Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes.
Nature **285**, 510-1.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997).
Functional rafts in cell membranes.
Nature **387**, 569-72.
- Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972).
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science **175**, 720-31.
- Sloan-Lancaster, J., Presley, J., Ellenberg, J., Yamazaki, T., Lippincott-Schwartz, J., and Samelson, L. E. (1998).
ZAP-70 association with T cell receptor zeta (TCRzeta): fluorescence imaging of dynamic changes upon cellular stimulation.
J Cell Biol **143**, 613-24.
- Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G. M. (2001).
The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges.
Immunity **15**, 751-61.
- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T. J., and Eisen, H. N. (1996).
Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response.
Immunity **4**, 565-71.
- Tank, D. W., Wu, E. S., and Webb, W. W. (1982).
Enhanced molecular diffusibility in muscle membrane blebs: release of lateral constraints.
J Cell Biol **92**, 207-12.
- 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**, 837-40.
- Tomishige, M., Sako, Y., and Kusumi, A. (1998).
Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton.
J Cell Biol **142**, 989-1000.
- Trautmann, A., and Valitutti, S. (2003).
The diversity of immunological synapses.
Curr Opin Immunol **15**, 249-54.
- Tskvitaria-Fuller, I., Rozelle, A. L., Yin, H. L., and Wulfing, C. (2003).
Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization.
J Immunol **171**, 2287-95.
- Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., and Lanzavecchia, A. (1995a).
Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton.
J Exp Med **181**, 577-84.

- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995b).
Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes.
Nature **375**, 148-51.
- Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M. L. (2006).
T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in
the central supramolecular activation cluster.
Immunity **25**, 117-27.
- Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M., and Valitutti, S. (2006).
Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling
of lytic and stimulatory synapses.
Proc Natl Acad Sci U S A **103**, 10985-90.
- Wulfing, C., and Davis, M. M. (1998).
A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation.
Science **282**, 2266-9.
- Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A.,
Tokunaga, M., Dustin, M. L., and Saito, T. (2005).
Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by
recruitment of Zap70 and SLP-76.
Nat Immunol **6**, 1253-62.
- Zhang, H., Berg, J. S., Li, Z., Wang, Y., Lang, P., Sousa, A. D., Bhaskar, A., Cheney, R. E.,
and Stromblad, S. (2004).
Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton.
Nat Cell Biol **6**, 523-31.
- Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1993).
Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular
Ca²⁺ stores.
Proc Natl Acad Sci U S A **90**, 6295-9.

TITRE : Etude des mécanismes moléculaires concourant à la mobilité des TCR en surface des lymphocytes T

RESUME :

L'activation des lymphocytes T par leur antigène spécifique s'accompagne de la formation d'une structure de signalisation spécialisée (nommée synapse immunologique) caractérisée par le rassemblement à grande échelle et l'organisation de molécules de surface et de composants de signalisation intra-cellulaire. Bien que la structure de la synapse immunologique ait été étudiée en détails, les mécanismes moléculaires responsables de la mobilité des TCR demeurent mal compris. En particulier la façon dont les TCR sont acheminés à la synapse immunologique pour y être engagés et activés par les complexes peptide-CMH demeure une question centrale et non résolue de la biologie des lymphocytes.

Afin de mieux comprendre comment les TCR parviennent à la synapse immunologique durant le processus d'activation, nous avons mesuré (par microscopie confocale et un protocole de FRAP récemment développé) la mobilité latérale des TCR en surface de lymphocytes T humains vivants.

Nos résultats montrent que : i) l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ réduit de façon marquée la mobilité des TCR par un mécanisme dépendant du cytosquelette d'actine ; ii) la stimulation antigénique inhibe la dynamique des TCR durant la formation de conjugués CPA / lymphocytes T ; iii) le cytosquelette d'actine permet d'acheminer les TCR vers la synapse immunologique (et ce même en l'absence de l'antigène) si sa polymérisation localisée est induite.

Pris dans leur ensemble, nos résultats montrent que suite à l'activation par l'antigène, les TCR voient leur mobilité réduite, ceci en raison d'une liaison à ou d'un trappage par le cytosquelette d'actine. Ils impliquent que le cytosquelette d'actine pourrait à la fois constituer un régulateur ainsi qu'une force motrice de l'acheminement et de l'engagement des TCR au sein de la synapse immunologique.

MOTS-CLES : Lymphocyte T, Récepteur à l'antigène, FRAP, Mobilité membranaire

ENGLISH TITLE : On the molecular mechanisms underlying TCR mobility on the surface of T lymphocytes

ABSTRACT :

The activation of T lymphocytes by specific antigen is accompanied by the formation of a specialized signalling area (named the immunological synapse, IS) characterized by the large scale clustering and segregation of surface molecules and intra-cellular signalling components. Although the structure of the IS has been thoroughly investigated, the molecular mechanisms underlying IS assembly are still elusive. In particular, how TCR are delivered to the IS to be engaged and triggered by peptide-MHC complexes is a central unresolved question of T lymphocyte biology.

To better understand how TCR are supplied to the IS during the activation process, we measured (using confocal microscopy and newly developed photo-bleaching recovery techniques) the lateral mobility of TCR on the surface of human living T lymphocytes.

Our results show that: i) $[Ca^{2+}]_i$ increase markedly reduces TCR mobility via an actin cytoskeleton-dependent mechanism; ii) antigenic stimulation inhibits TCR dynamics in T cell/APC conjugates; iii) actin cytoskeleton can drag TCR towards the IS (even in the absence of the antigen) if its localized polymerization is induced.

Taken together our results show that following activation, TCR do not accelerate but actually slow down, being either bound to or trapped by F-actin. They imply that actin cytoskeleton could be at the same time a "pace-maker" regulating the rate of TCR triggering and a "driving force" moving TCR towards the IS.

KEYWORDS : T Lymphocyte, Antigen Receptor, FRAP, membrane mobility