

Rôle des tyrosine protéine kinases dans l'activation des lymphocytes T

L'enzyme p56^{lck} est une tyrosine kinase spécifique des lymphocytes T. Localisée à la face interne de la membrane plasmique à laquelle elle est probablement reliée par une molécule d'acide myristique, elle comporte plusieurs sites de phosphorylation sur des tyrosines et des sérines qui jouent des rôles d'activation ou d'inhibition de son activité enzymatique. L'enzyme activée par mutation d'un site inhibiteur devient oncogénique. La p56^{lck} semble physiquement liée à la molécule CD4 des lymphocytes T et son état de phosphorylation ainsi que son activité changent rapidement lors de l'activation lymphocytaire. Quoiqu'on n'en connaisse pas encore les substrats naturels, cette enzyme pourrait intervenir dans la transduction du signal d'activation des lymphocytes stimulés par interaction avec leur cible.

Rémi Fagard
Silvia Danielian

Les protéine kinases jouent un rôle fondamental dans les processus de régulation des cellules, en particulier dans les processus de prolifération cellulaires; ces enzymes sont à la fois rapidement activables et peuvent être finement modulées, le plus souvent par phosphorylation, fournissant à la cellule de précieux outils pour son adaptabilité. Dans l'activation des lymphocytes, processus par lequel une sous-population de lymphocytes prolifère après action d'un *stimulus* spécifique, plusieurs mécanismes régulateurs de la cellule sont sollicités; parmi ceux-ci les phosphorylations/déphosphorylations sont probablement des mécanismes clés. La transduction de signaux qui s'opère intéresse également une classe de protéines de découverte relativement récente: les oncogènes cellulaires à activité tyrosine protéine kinase. Pour une partie d'entre ces protéines, l'activité biologique est associée à l'existence d'un domaine extracellulaire récepteur d'un facteur de croissance, comme par exemple les récepteurs de l'EGF, de l'insuline, du facteur CSF-1 et du PDGF; pour ce

groupe de protéines, l'activité tyrosine kinase et l'activité biologique sont stimulées par la fixation du ligand spécifique [1]. D'autres tyrosine protéine kinases ne possèdent ni domaine transmembranaire ni domaine extracellulaire; elles ont une grande similitude de séquence avec les protéines du groupe précédent [2] et sont impliquées dans l'oncogénèse. Des résultats récents indiquent que les protéines de ce groupe sont impliquées dans la transduction des signaux d'activation du lymphocyte.

Activation des lymphocytes T et phosphorylation

Activation des lymphocytes T. Les lymphocytes T sont activés quand ils reconnaissent l'antigène associé au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de la cellule présentatrice [3]. Ce processus implique l'interaction du complexe TcR/CD3 du lymphocyte avec le CMH de la cellule présentatrice (*figure 1*). Il entraîne séquentiellement dans le lymphocyte de profonds changements; ceux-ci sont d'abord mem-

ADRESSE

R. Fagard : maître de conférences à l'université Paris V. S. Danielian : boursière ARC. Inserm U. 15, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

branaires (premières minutes, phase précoce) : augmentation du métabolisme des phospho-inositides avec production d'inositol 3 phosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG) ; rapidement des modifications cytoplasmiques surviennent : augmentation de la concentration du Ca⁺⁺ (due à la production d'IP₃) et du pH intracellulaires, phosphorylations de protéines, activation de la protéine kinase C (PKC) par le DAG ; les

modifications au niveau nucléaire sont observées après environ 30 minutes (augmentation de la transcription de *c-fos*). Les événements qui constituent la phase tardive sont : l'augmentation de l'expression de l'interleukine 2 (IL-2), du récepteur de l'IL-2, de *c-myc* et *c-myb* ; ils surviennent quelques heures après l'activation. La phase ultime de l'activation des lymphocytes est la prolifération cellulaire.

Les événements précoces de l'activation des lymphocytes peuvent être reproduits par addition d'anticorps monoclonaux solubles, anti-TcR (anticlonotypiques) et anti-CD3 notamment. Les anti-CD2 sont également activateurs et semblent utiliser les mêmes voies d'activation que CD3 [18]. Pour que les événements tardifs de l'activation (production d'IL-2) soient déclenchés, l'utilisation d'anticorps immobilisés (sur support plastique ou sur billes de sépharose) ou l'addition d'esters de phorbol (acide phorbol-myristique ou PMA) aux anticorps solubles est indispensable. Plusieurs arguments indiquent que les molécules accessoires CD4 et CD8 s'associent physiquement au TcR lors de la reconnaissance de l'antigène et potentialisent ainsi l'activation [5]. Les lymphocytes peuvent être activés par des lectines (concanavaleine A, phytohématagglutinine) associées au PMA ; le PMA, qui stimule l'activité des kinases de la famille PKC, peut à lui seul induire certaines étapes de l'activation, mais l'activation optimale *in vitro* — qui aboutit à l'expression de l'IL-2 et du récepteur de l'IL-2 — nécessite l'intervention simultanée de deux stimuli : élévation du Ca⁺⁺ et activation de la PKC.

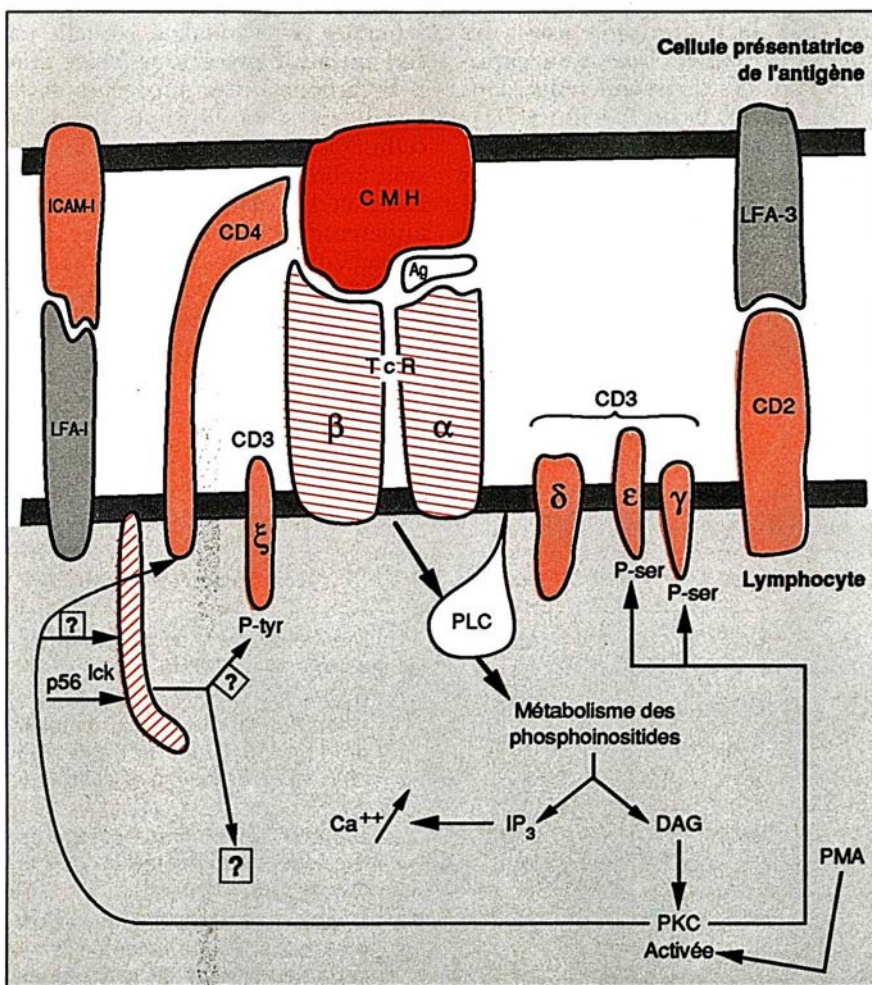


Figure 1. Les différents composants du complexe CD3/TcR (CD3 : chaînes δ, ε, γ et ζ ; TcR : chaînes α et β), leur relation avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), l'antigène et la cellule présentatrice de l'antigène. Sont indiqués également les antigènes de surface CD2 et LFA-1 qui interagissent respectivement avec LFA-3 et ICAM-1. Les interactions entre les différents métabolismes sont indiqués ainsi que les kinases et les différents événements de phosphorylation qui surviennent après activation des lymphocytes T par reconnaissance de l'antigène : stimulation de la phospholipase C (PLC) provoquant une augmentation des produits du métabolisme des phosphoinositides (IP₃ et DAG), activation de la protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle des sites sérine sur CD3, CD4 et probablement sur la p56^{lck} et activation de la p56^{lck} phosphorylant peut-être la chaîne ζ du CD3.

Rôle des phosphorylations dans l'activation des lymphocytes T. Les modifications de phosphorylation des protéines sont nombreuses et surviennent dès les premières minutes qui suivent l'application du stimulus activateur. Elles concernent des phosphorylations sur des résidus sérines des sous-unités γ et ε du complexe CD3 [6], la phosphorylation de CD4 et de CD8 [7] ; ces phosphorylations sont toutes obtenues par action du PMA, activateur de la PKC. D'autres kinases sont peut-être impliquées, comme par exemple le produit de *raf-1* (sérine-thréonine kinase, homologue cellulaire de *v-raf*, oncogène d'un virus de sarcome murin) dont l'activité kinase est modulée par phosphorylation sur des tyrosines [8]. D'autres phosphorylations sur des résidus tyrosine ont lieu : intéressant la chaîne ζ du complexe CD3 [9] et d'autres protéines non identifiées [6] (figure 1).

RÉFÉRENCES

1. Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1988 ; 57 : 443-78.
2. Hunter T. A thousand and one protein kinases. *Cell* 1987 ; 50 : 823-9.
3. Weiss A, Imboden J, Hardy K, Manger B, Terhorst C, Stobo J. The role of the T₃/antigen receptor in T-cell activation. *Ann Rev Immunol* 1986 ; 4 : 593-620.
4. Alcover A, Ramarli D, Richardson NE, Chang HC, Reinherz EL. Functional and molecular aspects of human T lymphocyte activation via T₃-T_i and T₁₁ pathways. *Immunol Rev* 1987 ; 95 : 5-36.
5. Emrich F. Cross linking of CD4 and CD8 with the T-cell receptor complex : quaternary complex formation and T-cell repertoire selection. *Immunol Today* 1988 ; 9 : 296-300.
6. Patel MD, Samelson LE, Klausner RD. Multiple kinases and signal transduction. Phosphorylation of the T cell antigen receptor complex. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 5831-8.
7. Blue ML, Haller DA, Craig KA, Levine H, Schlossman SF. Phosphorylation of CD4 and CD8 following T-cell triggering. *J Immunol* 1987 ; 139 : 3949-54.
8. Morrison D, Kaplan D, Rapp U, Roberts T. Signal transduction from membrane to cytoplasm : growth factors and membrane bound oncogene products increase Raf-1 phosphorylation and associated protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 8855-9.
9. Samelson LE, Patel MD, Weissman AM, Harford JB, Klausner RD. Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 1986 ; 46 : 1083-90.
10. Hunter T, Cooper JA. Viral oncogenes and tyrosine phosphorylation. In : Boyer PD, Krebs EG, eds. *The Enzymes*. San Diego : Academic Press Inc, 1986 : 192-246.
11. Perlmutter R, Marth J, Ziegler S, et al. Specialized protein tyrosine kinase proto-oncogenes in hematopoietic cells. *BBA Rev Cancer* 1988 ; 948 : 245-62.
12. Gacon G, Piau JP, Blaineau C, Fagard R, Genetet N, Fischer S. Tyrosine phosphorylation in human T lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1983 ; 117 : 843-50.
13. Marth J, Peet R, Krebs E, Perlmutter R. A lymphocyte specific protein tyrosine kinase gene is rearranged and overexpressed in the murine T cell lymphoma LSTRA. *Cell* 1985 ; 43 : 393-404.
14. Voronova A, Sefton B. Expression of a new tyrosine protein kinase is stimulated by retrovirus promoter insertion. *Nature* 1986 ; 319 : 682-5.

Phosphorylations sur des résidus tyrosine, rôle de la p56^{lck}

La p56^{lck}, découverte dans un lymphome murin (LSTRA) où elle est fortement surexprimée, appartient à une sous-famille de tyrosine protéine kinases dépourvues de domaine transmembranaire qui comprend : Lck, Lyn, Fyn, Hck, Src, Fgr et Yes (Tableau I). Les trois dernières sont des protéine kinases portées par des rétrovirus transformants [10], alors que les autres ont été identifiées soit grâce à leur pouvoir transformant après transfection, soit par leur analogie avec des kinases existantes. Elles sont exprimées dans des tissus différents, dans certains cas de façon spécifique [11] ; ainsi *hck* est exprimé dans les granulocytes, *src*, bien qu'ubiquitaire, est fortement surexprimé dans les neurones et les plaquettes, et *lck* est exprimée dans les lymphocytes T et B [11]. Ces protéines ont toutes un poids moléculaire voisin de

56-59 kDa et ont une analogie de séquence de plus de 70 % dans leur partie C-terminale. La séquence N-terminale est spécifique de chacune d'entre elles. La grande conservation entre la souris et l'homme de la séquence des régions aminotermiales d'une kinase donnée suggère qu'elles jouent un rôle spécifique pour la fonction de la molécule. Un domaine d'homologie avec une phospholipase C dans la partie centrale de la molécule est commun à toutes ces kinases sans qu'elles possèdent pour autant cette activité enzymatique. Toutes ces protéines sont associées à la membrane par la séquence N-terminale à laquelle est fixé un acide myristique (acide gras à 14 carbones). Les oncogènes de la famille *src* sont exprimés dans des cellules qui ont un potentiel de division faible, comme *src* dans les neurones et les plaquettes ; ceci est en apparence contradiction avec leur capacité transformante. Ces protéines, à localisation membranaire et possédant une impor-

Tableau I
LES ONCOGÈNES CELLULAIRES DE LA FAMILLE *src* : CARACTÉRISTIQUES ET LOCALISATION TISSULAIRE PRÉFÉRENTIELLE

Gène	Protéine	Expression tissulaire
<i>fgr</i>	p55 ^{fgr}	Monocytes du sang périphérique, certaines lignées B
<i>fyn</i>	p59 ^{fyn}	Élevée dans le cerveau et le thymus. Présente dans les cellules de l'endothélium de la veine ombilicale et la lignée cellulaire IM-9
<i>hck</i>	p59 ^{hck}	Cellules myéloïdes, certaines lignées B ; augmentée lors de la différenciation
<i>lck</i>	p56 ^{lck}	Lymphocytes T, faiblement exprimée dans les B ; détectée dans certaines lignées de carcinomes du côlon et de cancer du poumon
<i>lyn</i>	non identifiée	Très élevée dans le placenta et le foie, détectée dans le poumon et le rein
<i>src</i>	p60 ^{src}	Ubiquitaire. Très élevée dans le système nerveux en cours de développement et les plaquettes sanguines
<i>yes</i>	p59 ^{yes}	Élevée dans le placenta et le cerveau

tante analogie de séquence avec la partie cytoplasmique des récepteurs de facteurs de croissance, sont des candidats idéaux pour jouer un rôle dans la transduction de signaux.

Spécificité d'expression de la p56^{lck}. Dans les tissus normaux, la p56^{lck} est

exprimée uniquement dans les cellules de la lignée lymphoïde [12-14] : dans les lymphocytes T [15, 16], à un très faible niveau dans les lymphocytes B, dans la rate et dans le thymus [13, 17], son expression augmente graduellement au cours de la

maturation lymphocytaire [17]. Dans les lymphomes, la p56^{lck} est exprimée à des niveaux très variables ; dans plusieurs lignées dérivées de lymphomes humains (Ke37, Molt4, Jurkat) et murins (LSTRA), elle est surexprimée, parfois de façon considérable [13, 17] (*Tableau II*).

C'est l'augmentation de son expression dans certains lymphomes, son expression spécifique dans les lymphocytes de la lignée T, associée à sa localisation sous-membranaire, qui ont fait rechercher un rôle de la p56^{lck} dans l'activation des lymphocytes.

Structure et sites de phosphorylation de la p56^{lck}. Plusieurs sites de phosphorylation existent sur la p56^{lck} (*figure 2*).

- La tyrosine 394 [18], dont le niveau de phosphorylation dans les cellules est très faible mais est considérablement augmenté dans des fibroblastes transfectés avec *lck* muté sur la tyrosine 505 (voir ci-après), seule forme de *lck* qui soit transformante. Cette tyrosine correspond à la tyrosine 416 de la p60^{c-src} (produit de l'oncogène *c-src*, *Tableau I*), le remplacement de cette tyrosine 416 par une phénylalanine n'affecte pratiquement pas le pouvoir transformant ni l'activité kinase de la p60^{v-src} [19], mais peut agir sur d'autres propriétés de la p60^{c-src} dans son environnement normal, par exemple à proximité des jonctions intercellulaires (*gap junctions*) [20]. Par ailleurs, la tyrosine 394 est le site majeur de phosphorylation de la p56^{lck} *in vitro*, par autophosphorylation [18].

- La tyrosine 505 est un site majeur de phosphorylation *in vivo* dont la phosphorylation joue un rôle régulateur négatif à la fois de l'activité kinase et du pouvoir transformant [21, 22], comme son homologue de la p60^{c-src}, la tyrosine 527.

- Plusieurs autres sites de phosphorylation sur des tyrosines et des sérines sont situés en N-terminal de la protéine, leur fonction n'est pas élucidée. **La p56^{lck} est une protéine transformante.** Son appartenance à la famille *src* place *lck* parmi les oncogènes ; ce gène est réarrangé dans deux lymphomes murins (LSTRA, Thy 19) [13]. Chez l'homme, *lck* est situé sur le chromosome 1 à un site de fréquentes délétions et translocations (p32-35) observées dans des

Cellules ou tissus	Nombre de copies de mRNA/cellule
Cellules T	3,6
Cellules T activées (après 6 heures)	0,5
Cellules B	2,0
Thymus humain	19,8
Rate humaine	1,5
Lignées issues de lymphomes humains	
Jurkat	38,2
Ke 37	7,2
HSB-2	40,8
CEM	28,2
Lignées issues de lymphomes murins	
LSTRA	408,0
YAC-1	58,0

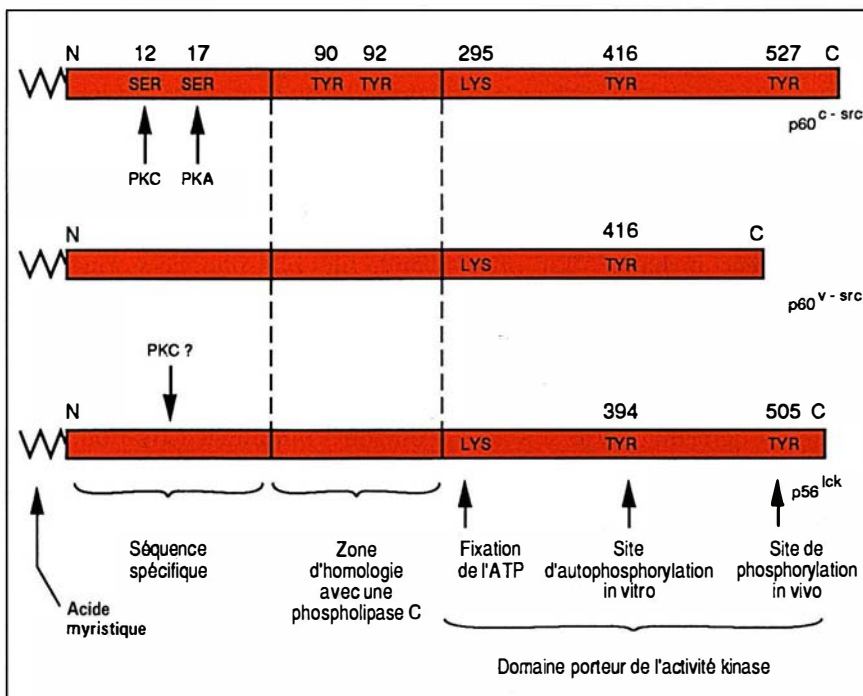


Figure 2. **La p56^{lck}, comparaison avec la p60^{c-src} et la p60^{v-src}, principaux sites de phosphorylation et caractéristiques de séquence.** PKA = protéine kinase stimulée par l'AMPC.

RÉFÉRENCES

15. Fischer S, Fagard R, Gacon G, Genetet N, Piau J, Blaineau C. Stimulation of tyrosine phosphorylation in lectin-treated human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984 ; 124 : 682-9.
16. Voronova A, Buss J, Patschinsky T, Hunter T, Sefton B. Characterization of the protein apparently responsible for the elevated tyrosine kinase activity in LSTRA cells. *Mol Cell Biol* 1984 ; 4 : 2705-13.
17. Perlmutter R, Marth J, Lewis D, Peet R, Ziegler S, Wilson C. Structure and expression of *lck* transcripts in human lymphoid cells. *J Cell Biochem* 1988 ; 38 : 117-26.
18. Casnellie J, Harrison M, Hellstrom K, Krebs E. A lymphoma cell line expressing elevated levels of tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1983 ; 258 : 10738-42.
19. Snyder MA, Bishop JM, Colby WW, Levinson AD. Phosphorylation of tyrosine 416 is not required for the transforming properties and kinase activity of pp60^{v-src}. *Cell* 1983 ; 32 : 831-40.
20. Azarnia R, Reddy S, Kmiecik T, Shalloway D, Loewenstein W. The cellular *src* gene product regulates junctional cell to cell communication. *Science* 1988 ; 239 : 398-401.
21. Amrein K, Sefton B. Mutation of a site of tyrosine phosphorylation in the lymphocyte specific tyrosine protein kinase, p56^{lck}, reveals its oncogenic potential in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 4247-51.
22. Marth J, Cooper J, King C, et al. Neoplastic transformation induced by an activated lymphocyte specific protein tyrosine kinase p56^{lck}. *Mol Cell Biol* 1988 ; 8 : 540-50.
23. Marth J, Distèche C, Pravtcheva D, Ruddle F, Krebs E, Perlmutter R. Localization of a lymphocyte-specific protein tyrosine kinase gene (*lck*) at a site of frequent chromosomal abnormalities in human lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 7400-4.
24. Casnellie J. Sites of *in vivo* phosphorylation of the T cell tyrosine protein kinase in LSTRA cells and their alteration by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 9859-64.
25. Marth J, Lewis D, Wilson C, Gearn M, Krebs E, Perlmutter R. Regulation of p56^{lck} during T-cell activation : functional implications for the *src*-like protein tyrosine kinases. *Embo J* 1987 ; 6 : 2727-34.
- tumeurs lymphoïdes [16]. Toutefois, l'ADNc de la p56^{lck} n'est pas transformant dans les cellules 3T3, mais il le devient si la tyrosine 505 est remplacée par une phénylalanine [21, 22]. Dans ce cas, la p56^{lck} des cellules transfectées est phosphorylée sur la tyrosine 394 et l'utilisation d'anticorps antiphosphotyrosine a permis de montrer une élévation globale des protéines phosphorylées sur des résidus tyrosine [21]. Ceci indique entre autre que, comme la tyrosine 527 de la p60^{c-src}, la tyrosine 505 de la p56^{lck} exerce une régulation négative sur la kinase et masque son potentiel oncogénique, qui est démasqué lorsque cette tyrosine est remplacée par une phénylalanine.
- Modifications de la p56^{lck} lors de la stimulation des lymphocytes T.** En absence de toute stimulation, dans les lymphocytes normaux, la p56^{lck} est phosphorylée majoritairement sur son résidu tyrosine 505 et faiblement sur la tyrosine 394, ainsi que sur des sites sérine non identifiés [22, 24]. L'activation des lymphocytes par des lectines augmente la phosphorylation de la p56^{lck} [15] et diminue l'expression de son ARN messager [25]. La stimulation des lymphocytes T par des anticorps anti-TcR, anti-CD3 ou anti-CD2 provoque des modifications de phosphorylation de la p56^{lck} accompagnées d'une augmentation du poids moléculaire apparent de 56 kDa à 65 kDa [26-28] ; cela s'accompagne de la phosphorylation d'un ou plusieurs résidus sérine en position N-terminale de la protéine. Le résidu tyrosine 394 est pratiquement inchangé. La phosphorylation de la tyrosine 505 de la p56^{lck} est, selon les auteurs, soit inchangée [26] soit augmentée [28]. Ces modifications de phosphorylation de la p56^{lck} ne s'accompagnent pas d'une augmentation de son activité kinase mesurée sur un substrat exogène [26] mais plutôt d'une diminution [28]. Par ailleurs, le PMA appliqué à des concentrations faibles provoque les mêmes changements de phosphorylation [24, 26-28] et d'activité [26, 28]. L'observation que les inhibiteurs de la PKC n'empêchent pas complètement l'action du PMA sur la migration de la p56^{lck} suggère que d'autres kinases que la PKC pourraient être impliquées [27]. Les ionophores du calcium induisent également la phosphorylation sur des sites sérine [26] mais non le changement de migration vers les formes de haut poids moléculaire ; cela peut résulter de l'existence de plusieurs sites de phosphorylation sur des sérines ayant des rôles régulateurs différents. Ces modifications, qui surviennent dans l'espace de quelques minutes après application des activateurs, semblent, selon certains auteurs, nécessiter une activation « complète », c'est-à-dire aboutissant à la production d'IL-2 [26, 27]. Des anticorps qui ne permettent d'aboutir qu'aux événements précoces, sans production d'IL-2, sont cependant capables d'induire les changements de migration de la p56^{lck} [28]. L'ensemble des données expérimentales indique que l'activité kinase et l'activité transformante de la p56^{lck} sont en relation avec une baisse de phosphorylation de la tyrosine 505 et, probablement ou peut-être, une augmentation de phosphorylation de la tyrosine 394. Comment un signal activateur peut-il donc être transmis par la p56^{lck} sans qu'il y ait augmentation de son activité et donc augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 394 ou baisse de la phosphorylation de la tyrosine 505 ? En réalité, deux paramètres doivent être pris en considération : on ne connaît que l'état de phosphorylation global de la p56^{lck} : or les molécules de p56^{lck} forment certainement une population hétérogène (détectable déjà sur des gels unidimensionnels) par ses sites de phosphorylation ; une faible proportion de molécules phosphorylées principalement sur la tyrosine 394 pourrait suffire pour faire passer le signal activateur. Le deuxième paramètre est le temps : l'état de phosphorylation de la p56^{lck} a été étudié après quelques minutes d'activation ; il est possible que pendant un laps de temps très court (quelques secondes) la tyrosine 394 soit hyperphosphorylée puis que rapidement des mécanismes régulateurs la ramène à son niveau de départ. Ces hypothèses soulèvent le problème de la nature même du signal activateur dont la p56^{lck} pourrait être le relais. Cette kinase étant intracellulaire et dépourvue de domaine extracellulaire, comment peut-elle

être impliquée dans la transmission de signaux venant de l'extérieur de la cellule ?

L'association d'une partie des molécules de p56^{lck} avec le déterminant CD4 pourrait permettre de répondre en partie à ces questions.

Association de la p56^{lck} avec le déterminant membranaire CD4

L'immunoprécipitation du déterminant CD4 avec certains anticorps anti-CD4 conduit à la co-immunoprécipitation de la p56^{lck} [29, 30]. La co-immunoprécipitation est détectable également avec des anticorps anti-p56^{lck} [30]. Une partie importante des molécules de p56^{lck} n'est cependant pas associée à CD4. Une association de même type a également été décrite avec CD8 [30]. Cette association entre une molécule possédant un domaine extracellulaire et un domaine transmembranaire, d'une part, et une tyrosine protéine kinase dont la localisation est sous-membranaire, d'autre part, pourrait apporter une clarification sur le rôle possible de la p56^{lck} et des tyrosine protéine kinases de cette catégorie. Mais certains points restent à éclaircir : on ne sait pas, par exemple, pourquoi seulement certains anticorps anti-CD4 ou anti-CD8 peuvent co-immunoprécipiter la p56^{lck}. Le problème est d'autant plus confus que certains anticorps dirigés contre d'autres déterminants que la p56^{lck}, CD4 ou CD8 peuvent aussi précipiter « passivement » la p56^{lck} ; ceci pourrait être dû à la propriété de l'enzyme de former des agrégats ou à sa liaison au cytosquelette [31].

Le complexe p56^{lck}/CD4 semble pouvoir transduire un signal spécifique activateur. Le rôle de CD4 et CD8 dans l'activation des lymphocytes T n'est pas clairement compris : des anticorps monoclonaux anti-CD4 augmentent les réponses induites *via* le complexe CD3/TcR, à condition d'être immobilisés sur un même support que des anticorps anti-CD3 [19] ; en revanche, avec de l'anti-CD4 soluble, il est possible d'obtenir une inhibition de la réponse des cellules T stimulés par l'antigène ou des mitogènes [33]. Cela suggère que la proximité physique entre CD4 et le complexe du

récepteur pour l'antigène (CD3/TcR) crée une potentialisation de l'activation lymphocytaire [34]. Quelques secondes après l'interaction d'anticorps anti-CD4 avec des lymphocytes, l'activité kinase de la p56^{lck} est augmentée [32]. Cette observation est conforme à l'idée que la p56^{lck} est impliquée dans la signalisation transmembranaire par l'intermédiaire d'une augmentation transitoire de son activité tyrosine protéine kinase ; par ailleurs, elle soulève un certain nombre de questions et d'hypothèses : pourquoi, là encore, seulement un certain type d'anticorps anti-CD4 peut-il induire cette réponse ? Si la p56^{lck} a un rôle physiologique de kinase, quels sont ses substrats ?

Substrats de la p56^{lck}, phosphatases, kinases, et nature du signal d'activation

Quels sont les substrats de la p56^{lck} ? Nous avons vu plus haut que lorsque la p56^{lck} dont la tyrosine 505 a été remplacée par une phénylalanine est exprimée dans des cellules 3T3, de nombreuses phosphoprotéines à phosphotyrosine sont détectées, alors qu'elles sont indétectables dans des cellules transfectées avec la p56^{lck} « sauvage », non transformante [21, 22]. Par ailleurs, quand la p56^{lck} est hyperphosphorylée dans les cellules traitées par des lectines, d'autres phosphoprotéines à phosphotyrosine deviennent également détectables. Le fait que ces phosphoprotéines n'apparaissent que quand la p56^{lck} est activée est le seul élément qui permet de penser que ce sont des substrats de cette kinase. La chaîne ζ du complexe CD3 qui est phosphorylée sur une tyrosine après activation des lymphocytes pourrait être un substrat de la p56^{lck} : sa phosphorylation sur un résidu tyrosine est en effet augmentée après activation de la p56^{lck} par des anticorps anti-CD4 [32], mais il s'agit d'un argument « d'association » et rien ne dit qu'il y ait vraiment relation de cause à effet entre l'activation de la p56^{lck} et la phosphorylation de la chaîne ζ . Dans les thymocytes murins soumis à l'action de mitogènes, la phosphorylation des lipocortines est augmentée ; une phosphoprotéine de 36 kDa

(ce qui correspond au poids moléculaire de certaines lipocortines) détectée avec des anticorps antiphosphotyrosine apparaît très rapidement après l'activation des lymphocytes [6]. Les lipocortines sont, avec d'autres protéines, étroitement associées au cytosquelette (taline, vinculine) et phosphorylées sur des résidus phosphotyrosine par la p60^{v-src}. Or, au cours de l'activation des lymphocytes, la membrane et le cytosquelette sont le siège de réarrangements et de réorientations associés à des phosphorylations qui pourraient peut-être mettre en jeu la p56^{lck}, elle-même associée au cytosquelette.

Rôle des phosphatases. Si l'activation des lymphocytes T fait intervenir des phosphorylations, des mécanismes de régulation doivent pouvoir limiter ou reverser ces phosphorylations ; en effet, comme nous l'avons vu plus haut, l'expression de la p56^{lck} est inhibée dans les quelques heures qui suivent la stimulation [25], mais ce mécanisme de régulation tardif n'évite certainement pas une régulation précoce des phosphorylations.

Une phosphatase spécifique des phosphotyrosines isolée du placenta puis séquencée a montré, après analyse comparative avec des banques de données, une similitude de séquence élevée avec la portion cytoplasmique du déterminant lymphocytaire CD45 [35]. Les anticorps anti-CD45 abolissent l'augmentation de calcium intracellulaire induite par les anticorps anti-CD3 et inhibent la prolifération des lymphocytes. Ces effets impliquent la proximité de CD45 avec le TcR, CD2, CD3 ou d'autres molécules intervenant dans la transduction du signal d'activation et peuvent s'expliquer par la stimulation de l'activité de phosphotyrosine phosphatase, et donc la déphosphorylation des phosphotyrosines nécessaires à l'activation. En revanche, le couplage covalent entre des anti-CD45 et des anti-CD4 amplifie considérablement l'augmentation du Ca²⁺ cytoplasmique provoquée par ces derniers. Ce résultat peut s'expliquer à la lumière de l'association entre CD4 et p56^{lck} : la phosphatase CD45, activée et positionnée à proximité du complexe CD4 - p56^{lck} par les anticorps couplés déphosphorylerait une tyrosine en

RÉFÉRENCES

26. Veillette A, Horak I, Horak E, Bookman M, Bolen J. Alterations of the lymphocyte-specific protein tyrosine kinase p56^{lck} during T-cell activation. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 4353-61.
27. Marth J, Lewis D, Cooke M, et al. Lymphocyte activation provokes modification of a lymphocyte-specific protein tyrosine kinase p56^{lck}. *J Immunol* 1989; 142: 2430-7.
28. Danielian S, Fagard R, Alcover A, Acuto O, Fischer S. TcR-CD3 and CD2 activation pathways induce modification of a lymphocyte-specific protein tyrosine kinase p56^{lck} in the human T-cell derived line Jurkat. *Eur J Immunol* 1989 (soumis pour publication).
29. Rudd C, Trevillyan J, Dasgupta J, Wong L, Schlossman S. The CD4 receptor is completed in detergent lysates to a protein tyrosine kinase (pp 58) from human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5190-4.
30. Veillette A, Bookman M, Horak E, Bolen J. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine protein kinase p56^{lck}. *Cell* 1988; 55: 301-8.
31. Louie R, King C, Macauley A, et al. p56^{lck} protein-tyrosine kinase is cytoskeletal and does not bind to polyomavirus middle T antigen. *J Virol* 1988; 62: 4673-9.
32. Veillette A, Bookman M, Horak E, Samelson L, Bolen J. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine protein kinase p56^{lck}. *Nature* 1989; 338: 257-9.
33. Bank I, Chess L. Perturbation of the T4 molecule transmits a negative signal to T cells. *J Exp Med* 1985; 162: 1294-303.
34. Ledbetter J, June C, Rabinovitch P, Grossmann A, Tsu T, Imboden J. Signal transduction through CD4 receptors: stimulatory versus inhibitory activity is regulated by CD4 proximity to the CD3/TcR. *Eur J Immunol* 1988; 18: 525-32.
35. Charbonneau H, Tonks NK, Walsh KA, Fischer EH. A protein tyrosine phosphatase from human placenta is homologous to internal domains of leukocyte common antigen CD45. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1988; 85: 7182-6.

un site inhibiteur de p56^{lck}, par exemple la tyrosine 505.

D'autres phosphoprotéine kinases sont-elles impliquées dans l'élaboration du signal d'activation? Plusieurs sites de phosphorylation situés en N-terminal de la p56^{lck} ont été décrits; ils sont probablement la cible de kinases différentes dont aucune n'a été identifiée pour l'instant; la kinase responsable de la phosphorylation de la tyrosine 505 n'est elle-même pas connue. Le produit du gène *fyn* (Tableau I) est présent dans les lymphocytes et pourrait participer à la transduction des signaux par une modulation spécifique de la p56^{lck}. On ne connaît pas non plus la kinase responsable de la phosphorylation des résidus sérine de la p56^{lck}, fortement augmentée après activation des lymphocytes. De plus il faut signaler que dans les immunoprécipités de p56^{lck}, plusieurs auteurs observent une bande non identifiée migrant à 68 kDa; cette coprécipitation n'est peut-être pas plus fortuite que celle de CD4 et CD8 avec la p56^{lck}.

En conclusion, le mécanisme par lequel le lymphocyte intègre et exécute le signal d'activation provoqué par l'interaction avec la cellule cible est encore loin d'être élucidé. La participation de tyrosine protéine kinases comme la p56^{lck} semble certaine; des arguments expérimentaux indiquent que les signaux semblent transiter par les molécules CD4 et CD8 et aboutir à la phosphorylation de la sous-unité ζ du complexe CD3. Des sérine kinases, dont la protéine kinase C, semblent jouer un rôle de modulateur des tyrosine protéine kinases. C'est une interaction étroite et finement orchestrée qui assure la précision et la fidélité du message transmis par ces protéines à travers la membrane puis conduit au noyau cellulaire; c'est par une meilleure connaissance des protéines impliquées et de leurs interactions que nous pourrions comprendre les mécanismes de transduction du signal et ses anomalies ■

Summary

Role of tyrosine protein kinases in T lymphocyte activation

There is increasing evidence showing the importance of the mechanisms of phosphorylation/dephosphorylation in the process of lymphocyte activation. Among the protein kinases involved, a recently discovered class of kinases, the tyrosine protein kinases appear to have a key role in the transduction of signals. p56^{lck} is a member of a family of cellular oncogenes with tyrosine protein kinase activity. These kinases are related to growth factor receptors, they have no extracellular domain but are associated to the plasma membrane of the cell. p56^{lck} is specifically expressed in T lymphocytes; its structure and phosphorylation sites are very similar to those of p60^{c-src}, it can be transforming in 3T3 cells. Several phosphorylation events occur upon activation of lymphocytes; they involve several types of protein kinases. Phosphorylations on tyrosine residues occur particularly on the ζ chain of CD3, phosphorylations on serine residues occur on several components including the γ and ϵ chains of CD3, CD4 and CD8. Specific modifications take place on the p56^{lck} molecule upon activation of lymphocytes indicating that this kinase plays a role in this process. The association of p56^{lck} with the lymphocytes determinants CD4 and CD8 raises the possibility that a signal can be transmitted by these determinants. Apart from p56^{lck} other protein kinases like protein kinase C and Raf-1, appear to be involved in the mechanisms of signal transduction. Recent data indicate that tyrosine phosphatases might also play a role in this process.

TIRÉS A PART

R. Fagard.

m/s n° 8 vol. 5, octobre 89