



HAL
open science

Caractérisation des processus d'ubiquitination régulant la protéine Themis durant le développement des lymphocytes T

Anne Garreau

► **To cite this version:**

Anne Garreau. Caractérisation des processus d'ubiquitination régulant la protéine Themis durant le développement des lymphocytes T. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30025 . tel-01772807

HAL Id: tel-01772807

<https://theses.hal.science/tel-01772807v1>

Submitted on 20 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Anne Garreau

le mardi 4 avril 2017

Titre :

Caractérisation des processus d'ubiquitination régulant la protéine Themis
durant le développement des lymphocytes T

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

U1043 Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr Renaud Lesourne

Dr Abdelhadi Saoudi

Jury :

Pr Joost van Meerwijk, président

Dr Claire Hivroz, rapporteur

Dr Philippe Kastner, rapporteur

Dr Nicolas Bidere, rapporteur

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord témoigner ma reconnaissance aux membres du Jury, le Dr Claire Hivroz, le Dr Nicolas Bidère, le Dr Philippe Kastner et le Pr Roland Liblau qui me font l'honneur de consacrer une partie de leur temps à l'évaluation de mon travail.

Je voudrais remercier mon directeur de thèse, le Dr Renaud Lesourne de m'avoir permis de travailler durant près de 5 années dans son équipe. Renaud, j'ai adoré travailler avec toi, je suis ta première thésarde et je pense sincèrement que tu as été un chef formidable. Tu as toujours porté beaucoup d'attention à mon projet même s'il a été difficile et qu'on a souvent pensé à abandonner, pour ça je t'en suis très reconnaissante. Tu as amélioré mon raisonnement scientifique, mon esprit critique et tu m'as de nombreuses fois complimenté pour mon travail ce qui a aussi amélioré ma confiance. Tu es un chef bienveillant en qui j'ai accordé toute ma confiance. J'ai pu ainsi parler librement avec toi de mon projet, de mes étourderies au laboratoire ou de mes angoisses un peu trop nombreuses. Je suis heureuse de commencer de nouveaux projets professionnels mais également très triste de quitter ton équipe où je me sentais si bien. J'aimerais ajouter pour définir ma thèse : « Ce n'est pas le chemin qui est difficile, c'est difficile qui est le chemin ».

Je remercie également profondément le Dr Abdelhadi Saoudi qui m'a soutenu dans ce travail. L'aide que tu as apporté au projet, tes conseils, tes encouragements, tes sourires ont été très précieux pour moi. J'ai également ressenti beaucoup de bienveillance à mon égard et en général envers notre équipe, ce qui est pour moi une belle qualité pour un chef.

Merci au Dr Anne Dejean pour ses conseils et son investissement durant nos réunions d'équipe. Tu m'as encouragé et tu m'as fais beaucoup rire durant ces années.

Je remercie également les équipes qui m'ont aidé à avancer dans mon projet grâce aux réunions du mercredi : les équipes du Pr Roland Liblau, du Dr Daniel Dunia et du Dr Nicolas Blanchard.

Merci aux membres de mon comité de thèse, les Dr Sylvie Guerder, Dr Denis Hudrisier et Dr Pierre Lutz pour leur aide et pour leur soutien. Je remercie mon parrain de thèse, le Dr Gilles Dietrich pour tous ses compliments.

J'en viens maintenant à mes collègues Nelly, Jérémy et Gaëtan. Gaëtan, merci pour toutes les fois où tu m'as aidé dans mes expériences, tu as toujours été très disponible, pédagogue et attentionné. Ta bonne humeur fait du bien et met de l'ambiance dans le labo. Reste comme tu es, positif et enjoué pour tout ce que tu entreprends. J'admire tes investissements professionnels et personnels, tu es quelqu'un qui en veut et c'est super. Jérémy, merci pour ta bonne humeur et ton aide à l'animalerie. Tu me fais beaucoup rire

avec tes phrases plus surprenantes les unes que les autres et j'ai beaucoup aimé nos tête-à-tête au mac do (je ne parlerai pas de la tentative de restaurant japonais...). Tu es quelqu'un de super, qu'il faut absolument connaître. Nelly, j'aurais aimé travailler plus longtemps avec toi. Tu es quelqu'un de génial avec qui je me sentais super bien. Ton arrivée a beaucoup changé l'équipe, tout le monde s'est beaucoup attaché à toi. Ca faisait du bien d'avoir une collègue féminine pour mater nos deux boute-en-train. Vous allez beaucoup me manquer tous les trois.

J'ai aussi une pensée pour mes tous premiers collègues, Audrey et Julien. Audrey, tu as été et tu resteras mon modèle de travail au laboratoire.

Je remercie aussi les collègues de ma deuxième équipe : Mehdi, Michael, Isabelle, Guillaume, Fanny, Caroline et Sahar. J'ai aimé travailler avec vous et je garde d'agréables souvenirs et anecdotes pour chacun d'entre vous.

J'ai également beaucoup aimé partager la petite pièce BET avec Emile et Frédérique. Vous êtes des filles super.

Je pense aussi aux « Oswald », Claude, Michèle, Nadège et Marie avec qui j'ai aimé partager mon quotidien.

Merci à Bénédicte Benech qui m'a soutenu administrativement durant mon inscription difficile en quatrième année de thèse. J'ai aimé les petites occasions qui m'ont permis de discuter avec vous et d'apprendre à vous connaître.

Je remercie également les personnels du magasin, du plateau de cytométrie et de l'animalerie pour leur travail et leurs aides.

Ces années au laboratoire n'auraient pas été pareil sans la présence de mes amis Cécile, Céline, Sophie, Maryse, Lucie, Maude, Jennifer, Pierre, Albano, Christina, Delphine, Aurélie, Marina, Joris, Jodi. Vous savez tous que je vous aime et que notre amitié n'est pas terminée.

Finalement, je remercie ma famille qui est toujours présente pour me soutenir et j'ai bien sûr une pensée très attentionnée pour Jérôme, ma moitié.

RESUME.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS.....	12
AVANT-PROPOS.....	16
INTRODUCTION.....	19
CHAPITRE 1 : LE DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T $\alpha\beta$	19
1 Maturation des lymphocytes T $\alpha\beta$	19
2 Réarrangement des récepteurs à l'antigène des lymphocytes T $\alpha\beta$	23
3 La sélection positive et négative des lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le cortex thymique.....	28
4 Le choix de lignage CD4 ⁺ SP versus CD8 ⁺ SP.....	32
5 La sélection négative des lymphocytes T $\alpha\beta$ dans la médulla thymique..	35
CHAPITRE 2 : LES VOIES DE SIGNALISATION DES TCR DURANT LE DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T $\alpha\beta$	38
1 Le complexe de signalisation TCR/CD3.....	38
2 La signalisation proximale des TCR.....	39
2.1 Les kinases Lck et Fyn.....	39
2.2 L'adaptateur transmembranaire LAT et son complexe multi-protéique.....	43
3 La signalisation distale des TCR.....	46
3.1 La voie calcique.....	46
3.2 La voie PKC θ /NF- κ B.....	46
3.3 La voie des MAPK/ERK, JNK et p38.....	47
3.4 La voie Akt/mTOR.....	48
4 Le rôle du trafic vésiculaire dans la régulation des voies de signalisation des TCR.....	49
CHAPITRE 3 : LES PROTEINES DE SIGNALISATION THEMIS.....	50
1 Fonction de Themis durant le développement des lymphocytes T.....	50
2 Structure de Themis.....	52
3 Les partenaires de Themis.....	55
4 Fonction moléculaire de Themis dans les voies de signalisation des TCR.....	57

4.1 Etudes initiales de la fonction moléculaire de Themis.....	57
4.2 Etudes sur le rôle négatif de Themis dans les voies des TCR.....	57
4.3 Etudes sur le rôle positif de Themis dans les voies des TCR.....	61
CHAPITRE 4 : LES MECANISMES D'UBIQUITINATION DANS LES VOIES DE SIGNALISATION DES CELLULES IMMUNITAIRES.....	62
1 Le processus d'ubiquitination.....	62
1.1 Fonction de l'ubiquitination.....	63
1.2 Spécificité de l'ubiquitination.....	65
2 Mécanismes de régulation de l'ubiquitination.....	70
2.1 L'enzyme d'activation E1.....	70
2.2 L'enzyme de conjugaison E2.....	70
2.3 Les ligases E3.....	73
2.3.1 Spécificité et fonction des HECT	73
2.3.2 Spécificité et fonction de RING.....	75
2.3.3 Fonction des U-Box.....	76
2.4 Les déubiquitinasés ou déubiquitines ligases (DUB)	77
2.4.1 Spécificité des DUB	77
2.4.2 Fonction des DUB.....	79
OBJECTIF DE LA THESE.....	81
RESULTATS.....	82
Article 1 : Grb2-mediated recruitment of USP9X to LAT enhances Themis stability following thymic selection	82
Article 2 : Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocytes development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability.....	120
DISCUSSION.....	138
PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	153
BIBLIOGRAPHIE.....	156
ANNEXES.....	171

RESUME

Themis est une protéine de signalisation des récepteurs des lymphocytes T (TCR) essentielle pour le développement de ces cellules dans le thymus. L'étude de souris Themis^{-/-} montre que Themis est important pour la sélection positive des cellules T, un processus favorisant la survie et la maturation de cellules exprimant des TCR possédant une faible affinité pour les antigènes du soi liés aux complexes majeurs d'histocompatibilités. Themis contient deux domaines CABIT (cysteine-based globular domains) dont la structure et la fonction sont inconnues. La fonction moléculaire de Themis a été controversée mais de récentes études suggèrent qu'il est un régulateur positif des voies de signalisation des TCR, réduisant ainsi le seuil de sélection positive.

L'expression de Themis varie suivant le stade de développement des cellules T. Nous avons montré dans une étude préliminaire que Themis est ubiquitiné dans les thymocytes. Cette modification post-traductionnelle joue un rôle important dans la dégradation des protéines par le protéasome. Les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'ubiquitination de Themis et les conséquences fonctionnelles de cette modification sur le développement des cellules T sont inconnus.

L'objectif de ma thèse était de caractériser les mécanismes moléculaires qui régulent l'ubiquitination de Themis et de déterminer si ces processus affectent la fonction de Themis durant le développement des lymphocytes T.

Nous avons comparé les niveaux d'expression des protéines et des ARNm codant Themis dans les différents stades de développement des cellules T. Alors que l'expression des ARNm codant pour Themis diminue dans les stades précoces de la sélection positive, son expression protéique est parallèlement augmentée, suggérant une stabilisation de Themis par des modifications post-traductionnelles durant cette étape. De plus, l'incubation de thymocytes avec un inhibiteur de déubiquitinasés entraîne une forte diminution de l'expression de Themis, suggérant que ces enzymes stabilisent l'expression de Themis durant le développement des lymphocytes T. Nous avons montré que Themis interagit avec deux déubiquitinasés, USP9X et USP19. Comme USP9X est décrit comme un régulateur positif de

la signalisation des TCR dans les thymocytes, nous avons utilisé des souris dont le gène codant USP9X est excisé spécifiquement dans les cellules T pour étudier le rôle de cette enzyme sur la fonction de Themis. Nous avons montré qu'USP9X entraîne la déubiquitination de Themis durant l'engagement des TCR. De plus, l'expression protéique de Themis contrairement à l'expression des ARNm codant Themis, est diminuée dans les cellules DP de souris USP9X^{-/-}, ce qui est exacerbée dans les cellules SP sélectionnées positivement. Ce résultat suggère qu'USP9X déubiquitine Themis pour stabiliser son expression durant la stimulation des TCR.

Nous avons par la suite recherché les mécanismes par lesquels USP9X régule l'expression de Themis durant l'engagement des TCR. Nous avons déterminé qu'USP9X interagit directement avec le domaine CABIT N-terminal de Themis et indirectement avec Grb2, un adaptateur important pour le recrutement de Themis à l'adaptateur transmembranaire LAT. De plus, le recrutement d'USP9X à LAT est diminué dans les thymocytes de souris Grb2^{+/-}, supportant l'hypothèse selon laquelle Grb2 facilite l'activation d'USP9X pour stabiliser Themis durant l'engagement des TCR. En accord avec ce modèle, nous avons montré que l'expression de Themis est diminuée et son ubiquitination augmentée dans des souris Grb2^{+/-}. Nous proposons qu'USP9X est activé durant l'engagement des TCR grâce à son recrutement dans les complexes proximaux des TCR par l'intermédiaire de Grb2 et Themis, entraînant la stabilisation de l'expression de Themis. Nous pensons que ce mécanisme est important pour maintenir l'expression de Themis durant la sélection positive afin de favoriser l'induction d'un signal des TCR soutenu, requis pour l'efficacité de ce processus.

ABSTRACT

The protein Themis is a new actor of the T cell receptor (TCR) signaling essential for the development of T cells in the thymus. The generation of Themis^{-/-} mice revealed that Themis is required for the positive selection of T cells, a process that promotes the survival and maturation of T cells expressing TCR with relatively low affinity for self-peptides bound to the major histocompatibility complex. Themis contains two previously uncharacterized cysteine-based globular domains (named "CABIT") of unknown structure and function. The molecular function of Themis has been controversial but recent findings suggest that it acts as positive regulator of TCR signaling that reduces the threshold for positive selection.

Themis is a T-cell lineage protein but its expression level is highly variable depending on the stages of T cell development. We demonstrated in an initial research that Themis is covalently associated to ubiquitin chains in thymocytes, a type of post-translational modification that plays important role in the targeting of proteins to proteasome degradation. The molecular mechanism that controls Themis ubiquitination and its functional consequences on T cell development are unknown.

The aim of my PhD project was to characterize the molecular process that regulates the ubiquitination of Themis and to investigate how these post-translational modifications affect Themis function during T cell development.

We compared Themis protein and mRNA expression levels at different stages of T cell development. While Themis mRNA expression is progressively decreased after positive selection, we showed that Themis protein expression is enhanced at the early stages of positive selection following TCR recognition of endogenous ligands, suggesting that Themis is stabilized by post-translational modifications during positive selection. In agreement with these results, the incubation of thymocytes with the deubiquitinase inhibitor PR619 results in a strong decrease of Themis expression, demonstrating that deubiquitinases stabilize Themis expression during T cell development. We showed that Themis interacts with two ubiquitin-specific proteases, USP9X and USP19. Since USP9X has been described as a regulator of TCR signaling in thymocytes, we used T cell-specific USP9X knockout mice to

study the effect of this protease on Themis signaling function. We demonstrated that USP9X allows the deubiquitination of Themis following TCR engagement. Moreover, protein levels but not mRNA levels of Themis are decreased in DP cells of USP9X^{-/-} mice which is exacerbated in SP positively selected cells. These results suggest that USP9X deubiquitinates Themis to stabilize its expression during TCR engagement.

We next investigated the mechanism by which USP9X controls Themis stability following TCR engagement. We found that USP9X binds directly to the N-terminal CABIT domain of Themis and indirectly interacts with Grb2, an adaptor protein essential for the recruitment of Themis to the transmembrane adaptor LAT. Accordingly, the recruitment of USP9X to LAT is impaired in Grb2^{+/-} thymocytes, supporting the hypothesis that Grb2 might facilitate the activation of USP9X and the subsequent deubiquitination of Themis that occurs following TCR engagement. In support of this hypothesis, we showed that Grb2^{+/-} thymocytes exhibit increased level of ubiquitinated Themis and reduced Themis expression levels. We conclude from these experiments that USP9X is activated during TCR engagement following its recruitment to proximal signaling complexes through Grb2 and Themis, leading to the deubiquitination and stabilization of Themis expression. We believe that this mechanism is important to sustain Themis expression during positive selection and to promote durable TCR signals required for the efficiency of this process.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Engagement vers le lignage lymphocytaire T.....	21
Figure 2 : Différenciation thymique du lignage lymphocytaire T.....	22
Figure 3 : Réarrangement V(D)J des chaînes β et α des TCR.....	26
Figure 4 : Expression des TCR $\alpha\beta$ au cours du développement des lymphocytes T.....	27
Figure 5 : Sélection positive des lymphocytes T $\alpha\beta$	31
Figure 6 : Choix de lignage CD4 ⁺ SP ou CD8 ⁺ SP.....	34
Figure 7 : Les différentes étapes de sélections thymiques au cours du développement des cellules T.....	37
Figure 8 : Activité et régulation des kinases Lck et Fyn durant l'engagement des TCR.....	42
Figure 9 : Les complexes de signalisation recrutés par l'adaptateur transmembranaire LAT.....	45
Figure 10 : Structure des protéines Themis murines.....	54
Figure 11 : Partenaires principaux de Themis dans les thymocytes.....	56
Figure 12 : Modèle de régulation de la phosphatase SHP-1 par les protéines Themis.....	60
Figure 13 : Représentation schématique de la mono-ubiquitination, multimono-ubiquitination et poly-ubiquitination.....	67
Figure 14 : Représentation schématique des différents types de chaînes d'ubiquitines.....	68
Figure 15 : Spécificité de l'ubiquitination.....	69
Figure 16 : Cascade de liaison de l'ubiquitine.....	72
Figure 17 : Modèle de régulation des protéines Themis par les déubiquitines enzymes USP9X.....	151
Figure 18 : Modèle de régulation du facteur d'échange Vav1 par les protéines Themis.....	152

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAP : adhesion and degranulation adaptor protein
AIRE : Autoimmune regulator gene
Akt : protein kinase B
APS1 : autoimmune polyglandular syndrome type 1
ATP : adénosine triphosphate
Bcl-2 : B-cell lymphoma
Bcl-10 : B-cell lymphoma 10
BTB : bric-a-brac, tramtrack, broad complex
CABIT : cysteine containing all beta in Themis
c-Cbl : casitas B-lineage lymphoma
CCR2 : C-C chemokine receptor type 2
CD : cluster of differentiation
Cdc42 : cell division control protein 42 homolog
CDR : complimentarity determining regions
CMH : complexes majeurs d'histocompatibilités
CRAC : Ca²⁺-Release-Activated-Ca²⁺
cTEC : cellule épithéliale thymique corticale
DAG : diacylglycerol
DAMP : damage-associated molecular pattern
DC : cellule dendritique
DN : double négative
DOK1 : docking Protein 1
DP : double positif
DUB : déubiquitinase
l'EGF : epidermal growth factor
ERDJ3 : ER DnaJ homologues 3
ERK : extracellular signal-regulated protein kinases
FANCI : Fanconi-group protein
FEZF2 : FEZ family zinc finger protein 2
Gads : GRB2 related adaptor protein downstream of Shc

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GAREM : Grb2-associated regulator of Erk/MAPK1
GATA-3 : GATA binding protein 3
GRAIL : gene related to anergy in lymphocytes
Grap : GRB2 related adaptor protein
Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2
HD : helper deficient
HECT : homologous to the E6-AP carboxy terminus
HERC : HECT domain and RCC domain
HSC : cellules souches hématopoïétiques
IKK : IκB kinase
IL : interleukine
IP₃ : inositol 1,4,5-trisphosphate
ITAM : Immunoreceptor tyrosines-based activation motifs
Itch : E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog
ITK : IL-2 inducible T cell kinase
JAMM : JAB1/MPN/Mov37 metalloproteases
JNK : c-Jun N-terminal kinases
LAT : linker for activation of T cells
Lck : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
MALT : formations lymphoïdes associées aux muqueuses
MAPK : mitogen-activated protein kinases
MCPIP : monocyte chemotactic protein-induced protein
MDM2 : mouse double minute 2 homolog
MIB1 : Mind Bomb 1
MJD : Machado-Joseph disease protein domain protéases
mTEC : cellule épithéliale thymique médullaire
mTOR : mammalian target of rapamycin
Nedd4 : neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4
NEMO : NF-κB essential modulator
NHEJ : nonhomologous end-joining
NFAT : nuclear factor of activated T cells

NF- κ B : nuclear factor-kappa B

NK : natural killer

NKT : natural killer T

NLS : nuclear localization signal

OTU : ovarian tumour proteases

Otud7b : OTU domain-containing protein 7b

PAG : phosphoprotein associated with glycolipid-enriched membrane domains

PAMP : pathogen-associated molecular pattern

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

PH : pleckstrin homology

PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PIP3 : phosphoinositides

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PKC θ : protein kinase C

PLC : progéniteur lymphoïde commun

PLC- γ 1 : phospholipase C gamma

PMC : progéniteur myéloïde commun

PRC1 : polycomb repressive complex 1

PRR : pattern recognition receptor

PRR : prolin-rich region

PTPN22 : protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22

Rac1 : ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RAG1 : recombination activating protein

RBR : RING-in-between-RING

RhoA : ras homolog gene family, member A

RING : really interesting new gene

RSS : recombination signal sequences

RUNX3 : Runt-related transcription factor 3

SHP1 : protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6

SH2 : Src homology domain 2

SH3 : SRC Homology 3 Domain

SLAP : Src-like adaptor protein

SLP-76 : SH2 domain containing Leucocytes Phosphoprotein of 76Kd

SMURFS : smad ubiquitin regulatory factors

SOCS-1 : suppressor of cytokine signaling protein 1

Sos1 : guanine nucleotide exchange factor

SP : simple positif

S1P : sphingosines 1 phosphate

TAB1 : TGF-beta activated kinase

TAK1 : transforming growth factor beta-activated kinase 1

TCR : T cell receptor

TdT : terminal deoxynucleotidyl Transferase

TGF- β : transforming growth factor- β

Themis : thymocyte expressed molecule involved in selection

Th-POK : T-helper-inducing POZ/Krüppel-like factor

TRAF6 : TNF receptor-associated factor 6

TRB3 : Tribbles homolog 3

TSA : tissue specific antigens

TSC2 : tuberous sclerosis complex 2

TOX : thymocyte selection associated high mobility group box

UBA6 : ubiquitin-like modifier activating enzyme 6

UBC : ubiquitin-conjugating enzyme 2

UBE1 : ubiquitin-activating enzyme 1

UBE1L2 : ubiquitin-activating E1-Like protein 2

UBDs : ubiquitin binding domain

UBIP : ubiquitous immunopoietic polypeptide

UCH : ubiquitin carboxy-terminal hydrolase

UPS : ubiquitin proteasome system

USP : ubiquitin specific proteases

Vav1 : Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1

Zap-70 : zeta-chain-associated protein kinase 70

AVANT-PROPOS

Le système immunitaire est défini par l'ensemble des constituants biologiques qui interagissent de façon hiérarchisée afin de défendre l'organisme contre les micro-organismes pathogènes. Le système immunitaire préserve également l'intégrité de notre organisme en éliminant les constituants tissulaires et cellulaires altérés et les cellules cancéreuses.

Le système immunitaire est doté d'un mécanisme de reconnaissance biologique très spécifique et peut répondre de façon différente aux constituants non altérés de l'organisme (*le soi*) qui doivent être préservés, aux constituants altérés de l'organisme (*le soi modifié*) et aux agents pathogènes (*le non soi*) qui doivent être éliminés. Pour cela, deux stratégies de défenses ont été mises en place au cours de l'évolution des espèces : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'organisme. Il met en jeu des acteurs moléculaires, cellulaires et tissulaires qui vont agir au niveau local et systémique. Sa réponse est immédiate, elle ne met pas en jeu des processus de mémoire immunologique et elle présente une faible spécificité pour les pathogènes. Les réponses immunitaires innées sont déclenchées par des récepteurs tels que les PRR (Pattern Recognition Receptor) capables de reconnaître des molécules communes à certains groupes de pathogènes : les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) ou des molécules exprimées par les cellules altérées du soi : les DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern). L'engagement de ces récepteurs déclenche des réponses inflammatoires telles que la phagocytose, la dégranulation de médiateurs physiologiques ou l'activité cytotoxique qui contribuent à l'élimination des pathogènes.

Dans certaines conditions, ce système immunitaire ne suffit pas à éliminer complètement les agents pathogènes. Des cellules du système immunitaire inné, les cellules présentatrices d'antigènes, peuvent activer un second système de défense très spécifique du pathogène persistant en activant des cellules effectrices appartenant au système immunitaire adaptatif. Cette seconde réponse, plus lente nécessite l'expansion clonale des cellules effectrices

spécifiques des antigènes du pathogène. Ces cellules, majoritairement des lymphocytes T et des lymphocytes B expriment à leur surface des récepteurs d'antigènes hautement spécifiques et sont capables suite à une réinfection par le même pathogène de développer une réponse mémoire immunitaire plus rapide.

Les lymphocytes T se développent dans le thymus puis migrent à la périphérie où ils vont circuler dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions lymphatiques et les MALT (formations lymphoïdes associées aux muqueuses) où ils sont susceptibles de rencontrer l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. L'engagement de récepteurs d'antigènes exprimés à la surface des cellules, les TCR (T cell receptor) aux molécules du CMH (complexes majeurs d'histocompatibilités) associées à des peptides antigéniques peut selon l'affinité des TCR, entraîner l'activation de ces cellules et le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative.

Pour faire face au large spectre de pathogènes, les TCR sont produits aléatoirement par recombinaison génétique au cours du développement des lymphocytes T. Cependant, ce mécanisme aléatoire conduit souvent au développement de clones lymphocytaires exprimant des TCR non fonctionnels (incapables de reconnaître le soi) ou auto-spécifiques (reconnaissant trop fortement le soi). Des mécanismes de sélection sont mis en jeu dans le thymus pour sélectionner les lymphocytes T exprimant des TCR fonctionnels (sélection positive) et pour éliminer les lymphocytes T auto-spécifiques (sélection négative).

Mon travail de thèse porte sur une protéine de signalisation des TCR, Themis (thymocyte expressed molecule involved in selection), qui est essentielle au processus de sélection positive et négative dans le thymus. L'objectif de ce travail a consisté à étudier les mécanismes régulant l'ubiquitination et l'expression de cette protéine. L'introduction de ma thèse va dans un premier temps présenter les différentes étapes du développement des lymphocytes T. Dans un deuxième temps, il sera abordé le rôle des différentes voies de signalisation des TCR dans le développement des cellules T. Dans une troisième partie, il sera détaillé les connaissances actuelles concernant la protéine Themis. Un dernier chapitre présentera le rôle de l'ubiquitination dans la régulation des voies de signalisation des TCR. Ces chapitres seront suivis par les résultats de mes travaux de thèse qui ont consisté à

identifier le rôle de l'ubiquitination de Themis dans la régulation de l'expression de cette protéine au cours du développement des lymphocytes T. Il sera également présenté dans cette partie un deuxième article auquel j'ai participé qui a proposé que Themis agisse comme un régulateur positif des voies de signalisation des TCR.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LE DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T $\alpha\beta$

Durant les années 70, de nombreuses recherches ont porté sur la compréhension de la régulation du développement des lymphocytes T. Ces recherches visaient à caractériser les mécanismes permettant le développement préférentiel de lymphocytes T « utiles » pour l'organisme (restreints aux CMH du soi) et non pathogènes (non auto-spécifiques). C'est dans les années 80 qu'ont été proposés deux concepts de sélection qui ont lieu durant le développement des lymphocytes T : la sélection positive qui entraîne la survie des lymphocytes T « utiles » (von Boehmer et al., 1989) et la sélection négative qui provoque l'anergie ou la délétion des cellules auto-spécifiques (Kisielow et al., 1988). Les différents stades de développement et les mécanismes de sélection positive et négative des lymphocytes T seront détaillés dans le chapitre 1 de l'introduction.

1 Maturation des lymphocytes T $\alpha\beta$

L'ontogénèse des lymphocytes T chez l'adulte débute dans la moelle osseuse où sont nichées les cellules CSH (cellules souches hématopoïétiques), cellules multipotentes proliférant au contact du stroma médullaire. Ces cellules à l'origine de toutes les cellules sanguines vont peu à peu perdre leur potentiel et se différencier dans la moelle osseuse lors d'un processus appelé hématopoïèse. Les CSH se différencient soit en PMC (progéniteurs myéloïdes communs) soit en PLC (progéniteurs lymphoïdes communs). Les progéniteurs PLC-1 résident dans la moelle osseuse puis se différencient en progéniteurs PLC-2 qui résident dans un premier temps dans la moelle osseuse puis migrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire (Figure 1). Les cellules PLC-2 multipotentes peuvent générer quatre lignages lymphoïdes distincts : les lymphocytes T (GOOD et al., 1962), les lymphocytes B (Wu et al., 1991), les cellules NK (Natural Killer) (Lanier et al., 1992) et les DC (cellules dendritiques) (Ardavin et al., 1993). Il a été démontré que l'engagement de cellules PLC-2 vers le lignage lymphocytaire T est un événement intrathymique qui nécessite la liaison des récepteurs Notch-1 au ligand Delta-1 L exprimé par le stroma thymique (von

Boehmer et al., 2003). En effet, la délétion de Notch-1 spécifiquement dans les progéniteurs lymphoïdes précoces de la moelle osseuse entraîne la perte des progéniteurs thymiques engagés dans le lignage lymphocytaire T alors que ceux engagés dans le lignage lymphocytaire B sont présents (Wilson et al., 2001).

L'analyse de l'expression des corécepteurs CD4 et CD8 (cluster of differentiation) permet de différencier quatre populations majeures du thymus : les DN $CD4^-CD8^-$ (doubles négatives), les DP $CD4^+CD8^+$ (doubles positives) et les SP $CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$ (simples positives). Les cellules DN représentent 2 à 5% du nombre total des thymocytes et elles suivent quatre stades de développement différents (Godfrey et al., 1993). Dans un premier temps, les progéniteurs PLC-2 se différencient au contact des cTEC (cellules épithéliales thymiques corticales) en cellules DN1 $CD44^+CD25^-$ qui représentent la population la plus immature. Cette population, se divise peu et reste capable de se différencier en lymphocytes B, en cellules NK ou en DC. Suite à la signalisation du récepteur Notch-1, les DN1 se différencient en DN2, $CD44^+CD25^+$, capables de se différencier ensuite soit en DN3, $CD44^-CD25^+$, soit en DC. Les DN2 ont perdu leur potentiel à se diviser en lymphocytes B et NK. Les DN3 se différencient en DN4 $CD44^-CD25^-$ et possèdent comme les DN2 la capacité à se différencier en lymphocytes $T\gamma\delta$, une population de lymphocytes T non conventionnelle (Jensen et al., 2008). Par la suite, les cellules DN4 commencent à exprimer les corécepteurs CD4 et CD8 pour se différencier en cellules DP et ainsi représenter environ 80% du nombre total de thymocytes. Ces cellules migrent ensuite dans la médulla thymique et s'engagent irréversiblement soit dans le lignage SP $CD4^+CD8^-$ ou SP $CD4^-CD8^+$ qui représentent environ 12% et 3% respectivement du nombre total de thymocytes. Les cellules DP peuvent également se différencier en cellules NKT (natural killer T), des cellules possédant des marqueurs de lymphocytes T et de cellules NK (Kronenberg and Engel, 2007). Les cellules SP matures expriment ensuite les récepteurs à la S1P (sphingosine 1 phosphate) et migrent à la périphérie en suivant le gradient de ce médiateur lipidique (Takahama, 2006) (Figure 2).

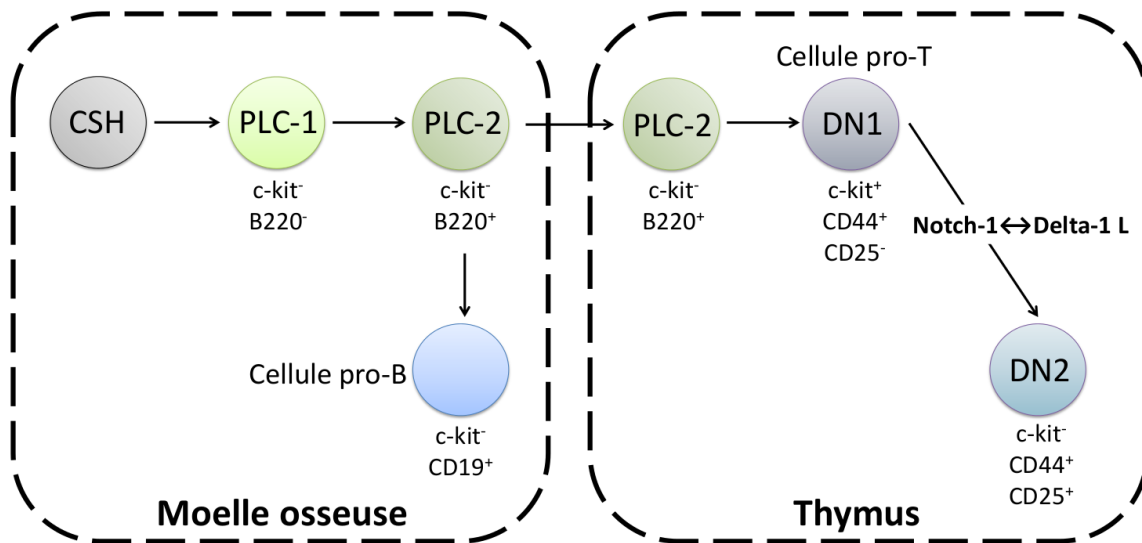


Figure 1 : Engagement vers le lignage lymphocytaire T.

Durant l'hématopoïèse, les cellules CSH (cellules souches hématopoïétiques) se différencient dans la moelle osseuse en PLC-1 (progéniteurs lymphoïdes communs) puis PLC-2 qui migrent ensuite dans le thymus. Suite à la reconnaissance des récepteurs Notch-1 aux ligands thymiques Delta-1 L, les cellules s'engagent vers le lignage lymphocytaire T et poursuivent leur différenciation. *Adapté de « Thymique selection revisited: how essential is it? », von Boehmer et al., Immunological Reviews, 2003.*

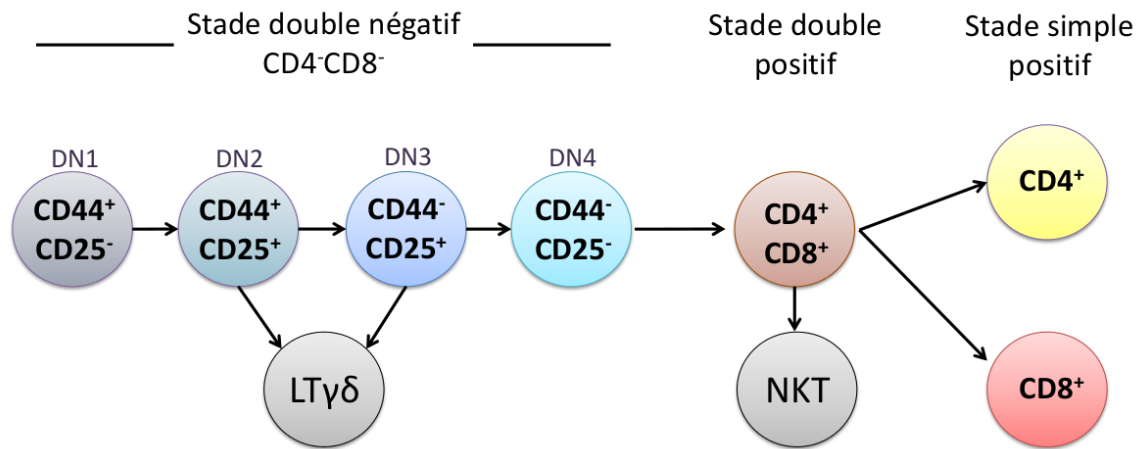


Figure 2 : Différenciation thymique du lignage lymphocytaire T.

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ se différencient en quatre populations majeures : les cellules DN CD4⁻CD8⁻ (doubles négatives), les cellules DP CD4⁺CD8⁺ (doubles positives) et les cellules SP (simples positives) CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ proviennent de la différenciation des DN2 ou DN3 et les cellules NKT (natural killer T) de la différenciation des DP. Adapté de « *Thymic stromal cell subsets for T cell development* », Nitta et al., *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016.

2 Réarrangement des récepteurs à l'antigène des lymphocytes T $\alpha\beta$

Les lymphocytes T expriment à leur surface un récepteur clonotypique spécifique : le TCR (T cell receptor) impliqué dans la reconnaissance des complexes CMH/antigènes et l'activation des cellules T. Le réarrangement des TCR est un processus semi-aléatoire qui se déroule durant le développement des lymphocytes T. Il comprend différents mécanismes susceptibles de produire un répertoire d'environ 5.2×10^{15} TCR potentiels. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ expriment des TCR qui sont composés de deux chaînes transmembranaires polypeptidiques glycosylées α et β . Chaque chaîne est composée d'un domaine extracellulaire N-terminal contenant une région variable (V) suivi d'une région constante (C) et d'une région charnière (J). Les chaînes α et β sont composées également d'un domaine transmembranaire hydrophobe de 5 à 12 acides aminés chargés positivement ainsi qu'un court domaine cytoplasmique. L'association des deux chaînes α et β se fait par l'intermédiaire d'un pont disulfure. Chaque région variable (V α et V β) contient trois régions hypervariables appelées CDR (complementarity determining regions). Les régions CDR1 et CDR2 se lient préférentiellement au CMH et la région CDR3 se lie au peptide antigénique (Garcia et al., 1996; Nikolich-Zugich et al., 2004)

Les lymphocytes T expriment dans un premier temps la chaîne β des TCR grâce à la recombinaison V(D)J des gènes du TCR β . En effet, le locus du TCR β qui est situé sur le chromosome 7 chez l'Homme contient en 5' 52 segments de gène V (Variable) qui sont suivis d'un segment de gène D (Diversity), suivis de 6 ou 7 segments de gène J (Joining) et enfin de la région C (Constant) codant pour les domaines constants. Durant le stade DN2 et DN3, les cellules vont réarranger aléatoirement un segment de gène D β avec un segment de gène J β . Ce réarrangement se fait notamment grâce à l'expression des nucléases RAG1 (recombination activating protein) (Mombaerts et al., 1992) et RAG2 (Shinkai et al., 1992) qui vont cliver l'ADN au niveau de la séquence signalale RSS (recombination signal sequence) adjacente à chaque segment. Les deux segments vont ensuite être liés entre eux par la machinerie de réparation de l'ADN NHEJ (nonhomologous end-joining) (Grawunder and Harfst, 2001; Schatz and Ji, 2011). Durant le stade DN3, un segment V β est réarrangé avec le segment D β J β précédemment formé puis un segment C β est finalement réarrangé

entraînant ainsi la génération d'un gène VDJC codant pour une chaîne β (Outters et al., 2015). Cette association aléatoire de 4 segments de gène entraîne une forte diversité du répertoire des TCR au sein des lymphocytes T en cours de développement. Dans le but d'augmenter cette diversité, des nucléotides sont additionnés aléatoirement dans la jonction entre les segments par la TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) ou délétés par une exonuclease (Nikolich-Zugich et al., 2004) (Figure 3).

Il est important de noter que durant le stade DN2 et DN3, les lymphocytes T sont également capables de réarranger les gènes codant pour les chaînes γ et δ des TCR. De plus, il a été démontré que le réarrangement des TCR $\gamma\delta$ n'est pas dépendant de la signalisation du récepteur Notch-1 contrairement au réarrangement des TCR $\alpha\beta$. En effet, dans des expériences de chimères hématopoïétiques, l'injection dans une souris irradiée de moelle osseuse de souris Notch-1 knock-out (Notch-1^{-/-}) entraîne majoritairement le développement de lymphocytes T $\gamma\delta$ (Washburn et al., 1997).

Si le réarrangement du TCR β est productif, le gène réarrangé VDJC est transcrit puis traduit afin d'exprimer à la surface des lymphocytes T le pré-TCR, composé de la chaîne β récemment formée et d'une chaîne pré-T α . L'expression d'un pré-TCR fonctionnel active des voies de signalisation qui vont entraîner la diminution de l'activité des nucléases RAG1 et RAG2 et provoquer ainsi l'exclusion allélique du TCR β qui inhibe la formation d'autres chaînes β . Durant ce processus qui est appelé sélection β , les voies de signalisation du pré-TCR stimulent également la survie des lymphocytes, leur prolifération et leur différenciation en DN4 puis en DP. Le réarrangement des segments V α et J α et par conséquent l'expression de la chaîne α commence au stade DP TCR β^{low} où l'activité des nucléases RAG augmente à nouveau. Le locus du TCR α est situé sur le chromosome 14 chez l'Homme et il contient 80 segments de gène V suivis de 61 segments de gène J et d'un segment C. La chaîne α du TCR se réarrange comme pour la chaîne β excepté qu'il n'existe pas de segment D α . Après le réarrangement de la chaîne α du TCR, les cellules DP expriment à leur surface de faibles quantités de TCR $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta^{\text{low}}$) (Figure 4).

Il est intéressant de noter que les segments de gènes du TCR α sont réarrangés simultanément sur les deux allèles et de nombreux lymphocytes expriment dans leur

cytoplasme deux chaînes α différentes au stade DP TCR $\alpha\beta^{\text{low}}$ (immature). Cependant, au stade DP TCR $\alpha\beta^{\text{hi}}$ (mature) une seule chaîne α mature est exprimée à la surface cellulaire suggérant ainsi l'existence de mécanismes d'exclusion allélique entre ces deux stades de différenciation. En 1998, S. Munir Alam and Nicholas R. J. Gascoigne proposent le modèle de « chain competition » où les deux chaînes α entrent en compétition pour s'associer avec la chaîne β . Suivant leur modèle, ils ont pu estimer que 50 à 60% des cellules DP matures expriment deux chaînes α dans leur cytoplasme mais uniquement une seule chaîne α à la surface cellulaire. Il a quand même été observé chez la souris que 2 à 4% des lymphocytes T périphériques expriment deux chaînes α à leur surface, ce qui ne favoriserait pas le développement de maladies auto-immunes (Alam and Gascoigne, 1998).

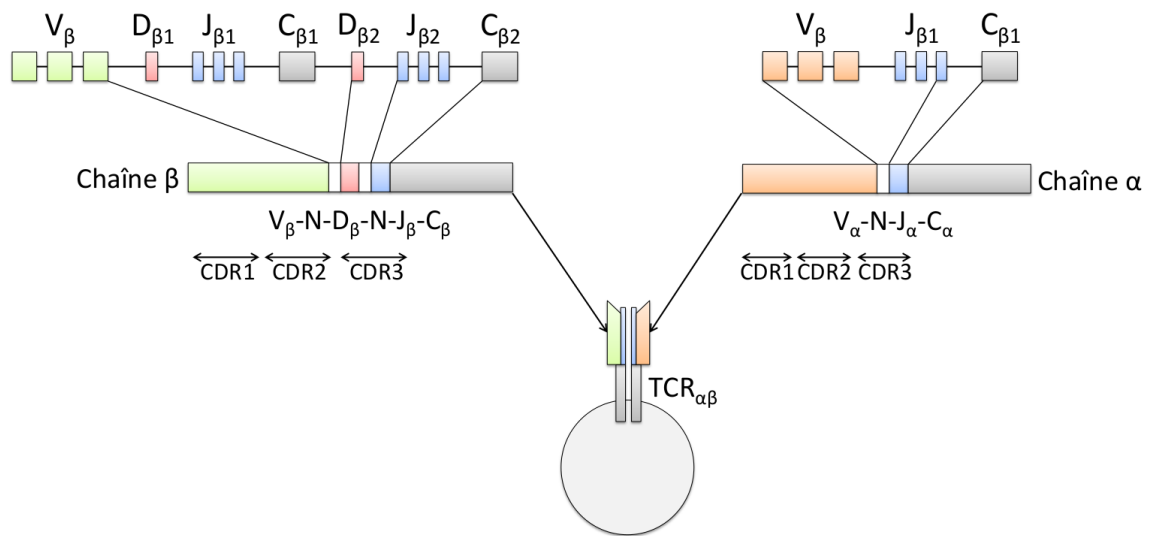


Figure 3 : Réarrangement V(D)J des chaînes β et α des TCR.

Les TCR_{αβ} fonctionnels sont générés suite à la recombinaison des segments V (Variable), J (Joining) et D (Diversity) avec la région C (Constant) pour la chaîne β et grâce à la recombinaison des segments V-J-C pour la chaîne α. La diversité des TCR est augmentée suite à l'addition ou la délétion de nucléotides (N) à la jonction entre les segments. *Adapté de « The many important facets of T-cell repertoire diversity », Nikolich-Zugich et al., Nature reviews Immunology, 2004.*

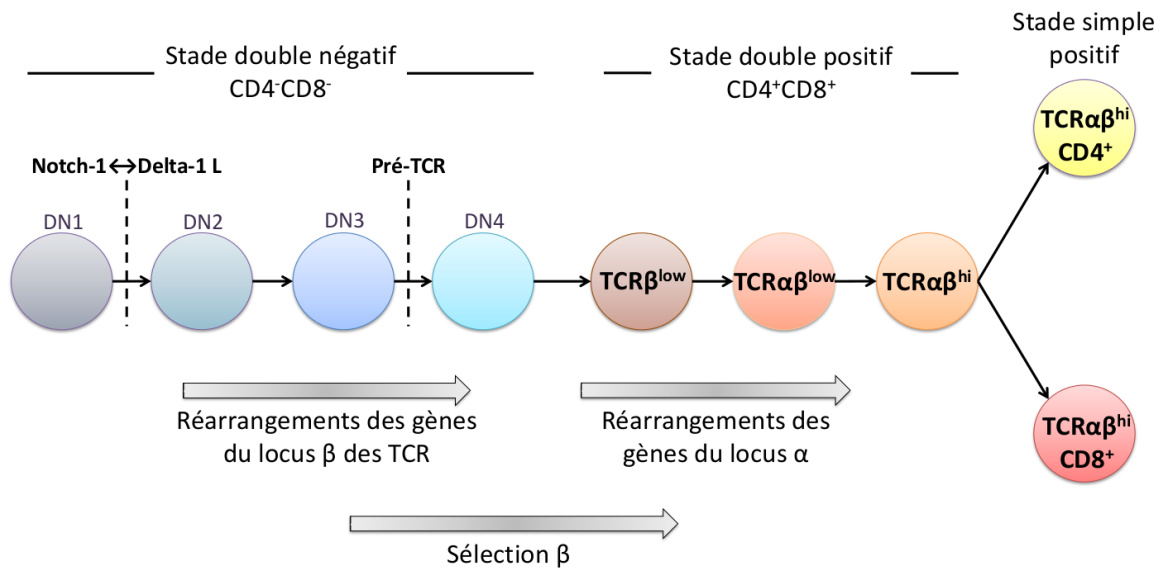


Figure 4 : Expression des TCRαβ au cours du développement des lymphocytes T.

Les segments de gène du TCRβ sont réarrangés aux stades DN2 et DN3. Puis les lymphocytes T qui expriment un pré-TCR fonctionnel survivent au cours de la sélection β. Ils réarrangent par la suite les segments de gène du TCRα au stade DP TCRβ^{low} pour exprimer abondamment le TCRαβ à la fin du stade DP. *Adapté de « Selection of the T cell repertoire », Sebzda et al., Annual Review of Immunology, 1999.*

3 La sélection positive et négative des lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le cortex thymique

Dans le but d'établir un répertoire de lymphocytes T immunocompétents capables de reconnaître un large spectre d'antigènes, les lymphocytes immatures génèrent un immense répertoire de TCR suite à la recombinaison V(D)J. Cependant, dans ce répertoire produit aléatoirement, une majorité des cellules expriment des TCR « inefficaces » ayant une affinité trop faible pour les molécules du complexe CMH/peptide du soi. D'autres cellules au contraire expriment des TCR ayant une affinité trop forte pour ces complexes et sont susceptibles de déclencher des pathologies auto-immunes. Ces cellules sont éliminées au cours de processus de sélection qui se déroulent dans le cortex et dans la médulla thymique.

La sélection positive des thymocytes se déroule dans le cortex thymique. Elle entraîne la survie et la différenciation des lymphocytes T exprimant des TCR capables de reconnaître avec une affinité suffisante les complexes CMH associés à des peptides du soi. Ce modèle a été proposé suite à des expériences de chimères hématopoïétiques qui ont notamment démontré que des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques pour les CMH H-2^b et H-2^d lysent préférentiellement des cellules présentant des antigènes liés à des CMH H-2^b lorsqu'ils sont développés dans un environnement H-2^b (Bevan, 1977). Cette expérience démontre que l'environnement cellulaire restreint la reconnaissance des lymphocytes T aux CMH du soi.

Les cellules DP ont une capacité de survie atténuée par rapport aux autres populations de thymocytes. Elles ont une activité métabolique réduite, elles n'expriment plus de récepteurs à l'IL-7 (interleukine-7), une cytokine favorisant la survie des cellules, elles expriment SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling protein 1), un suppresseur de signaux provenant de cytokines telles que l'IL-7 (Yu et al., 2003) et elles n'expriment pas le facteur de survie Bcl-2 (B-cell lymphoma) (Linette et al., 1994). En absence des signaux de survie déclenchés lors de la sélection positive, ces cellules meurent par un processus qualifié de mort par négligence.

Les cellules qui sélectionnent positivement les lymphocytes T sont les cTEC (cellules épithéliales thymiques corticales). En effet, l'injection intrathymique de TEC exprimant des CMH H-2^b était capable de sélectionner positivement des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques restreints au CMH H-2^b alors que l'environnement cellulaire exprime une autre classe de

CMH (Vukmanović et al., 1992). De plus, dans des souris $RelB^{-/-}$ où il n'existe pas de mTEC (cellules épithéliales thymiques médullaires) et de DC, les cTEC sont suffisantes pour induire la sélection positive des DP (DeKoning et al., 1997). Les cTEC expriment à leur surface cellulaire des CMH du soi présentant des antigènes encore mal identifiés. Ces antigènes stabilisent les CMH à la surface cellulaire et participent également à sélectionner positivement les lymphocytes T. Il a été démontré que ce sont des peptides qui sélectionnent des lymphocytes possédant des TCR qui s'engagent au complexe CMH/peptide avec une faible affinité (Hogquist et al., 1994). Il a également été montré *in vitro* qu'un seul ligand synthétique est capable d'entraîner la sélection positive d'une population polyclonale de lymphocytes T $CD8^{+}$ (Ashton-Rickardt et al., 1993).

Les peptides antigéniques sélectionnant positivement les lymphocytes T dans le cortex thymique sont différents des antigènes du non soi qui activent les cellules à la périphérie. La mise en jeu du thymoprotéasome et de la cathepsine L spécifiquement exprimés par les cTEC entraîne la production de peptides uniques que l'on ne retrouve dans aucun autre type cellulaire. Le thymoprotéasome possède une activité chymotrypsine like qui est altérée par rapport aux autres protéasomes, produisant ainsi des peptides hydrophobes uniques présentés par les CMH de classe I. La cathepsine L est une cystéine protéase localisée dans les endosomes tardifs des cTEC qui va générer des peptides uniques présentés par les CMH de classe II. Il a été démontré que dans les souris $\beta 5t^{-/-}$ (sous unité du thymoprotéasome) et dans les souris cathepsine $L^{-/-}$, la sélection positive est diminuée (Murata et al., 2008; Nakagawa et al., 1998).

La survie ou la mort d'un lymphocyte T durant la sélection positive dépend de l'affinité des TCR d'une cellule pour le complexe CMH/peptide. Comme décrit précédemment, les lymphocytes T ayant une affinité « suffisante » pour le complexe CMH/peptide seront sélectionnés positivement, ils recevront des signaux de survie par les voies de signalisation des TCR et poursuivront leur différenciation. Les lymphocytes T exprimant des TCR ayant une affinité « insuffisante » pour les complexes CMH/peptide, ne reçoivent pas de signaux de survie et meurent par négligence. Les lymphocytes T dont les TCR s'engagent au complexe CMH/peptide avec une trop forte affinité (longue demi-vie et faible taux de dissociation)

mourront par apoptose. Ce processus appelé sélection négative entraîne l'élimination de ces lymphocytes T potentiellement auto-spécifiques (Takada and Takahama, 2015) (Figure 5).

Il est possible de discriminer les cellules DP non engagées dans la sélection positive aux cellules DP sélectionnées positivement grâce à l'augmentation de l'expression des marqueurs CD5 et CD69 qui se produit suite à l'engagement des TCR avec les ligands de faibles affinités (Groves et al., 1995). La sélection positive entraîne également une augmentation de l'expression des TCR ($\text{TCR}\alpha\beta^{\text{hi}}$). A la fin de cette sélection, près de 90% des cellules DP seront éliminées. Il a été calculé qu'il est possible de sélectionner plus de 1×10^{13} TCR différents. Cependant, il a été détecté expérimentalement 2×10^6 TCR différents chez la souris et 2×10^7 chez l'Homme (Nikolich-Zugich et al., 2004).

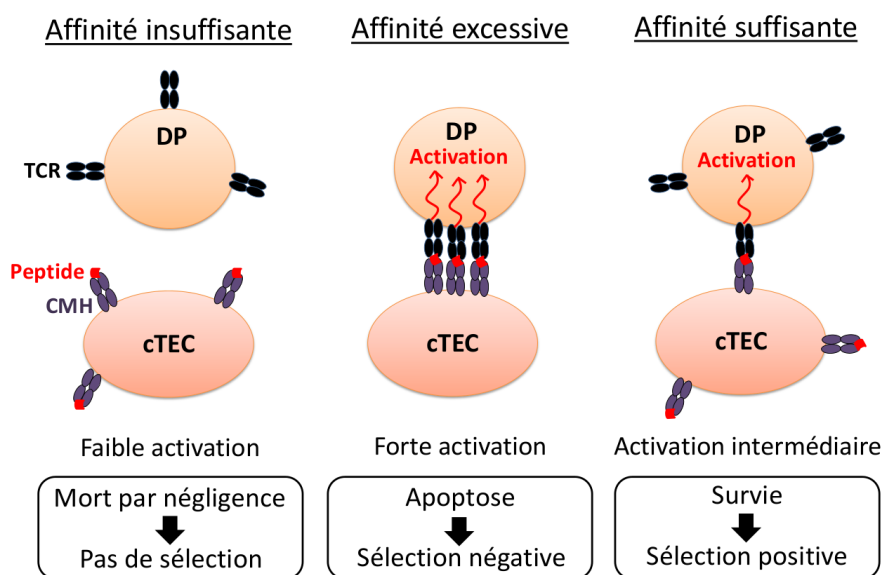


Figure 5 : Sélection positive des lymphocytes Tαβ.

Les lymphocytes T CD4⁺CD8⁺ (DP) possédant une affinité « suffisante » pour le complexe CMH/peptide présenté par les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) seront sélectionnés positivement. Les lymphocytes T possédant une affinité « insuffisante » ou excessive pour le complexe CMH/peptide mourront par négligence ou par apoptose respectivement. *Adapté de « Positive-Selection-Inducing-Self-Peptides Displayed by Cortical Thymic Epithelial Cells », Takada et al., Advances in Immunology, 2015.*

4 Le choix de lignage CD4⁺ SP versus CD8⁺ SP

Le choix de lignage est étroitement lié à la sélection positive car il dépend de l'engagement des TCR des lymphocytes T. Ce sont deux événements séquentiels et non simultanés. Durant ces 30 dernières années, plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer les mécanismes qui entraînent la différenciation des thymocytes DP en CD4⁺ SP ou CD8⁺ SP. Nous aborderons ici uniquement le modèle le plus généralement accepté, « The kinetic signaling model », qui implique les signaux déclenchés par les TCR et des récepteurs aux cytokines et l'induction des facteurs de transcription spécifiques des lignages CD4⁺ SP et CD8⁺ SP.

Les cellules DP se différencient irréversiblement soit vers le lignage CD4⁺ SP soit vers le lignage CD8⁺ SP. Il est démontré que les domaines extracellulaires des corécepteurs CD4 s'associent aux CMH de classe II alors que les corécepteurs CD8 s'associent aux CMH de classe I. Ces deux corécepteurs sont nécessaires à la transmission efficace des signaux déclenchés par les TCR. Les cellules CD4⁺CD8⁺ DP exprimant des TCR restreints aux CMH de classe II se différencient en CD4⁺ SP et celles exprimant des TCR restreints aux CMH de classe I se différencient en CD8⁺ SP. Durant la sélection positive des cellules DP, la transcription du gène codant pour CD8, mais pas celle du gène codant pour CD4, est interrompue, entraînant la formation d'une population CD4⁺CD8^{intermédiaire}. Durant cette étape, les lymphocytes expriment séquentiellement les facteurs de transcription TOX (thymocyte selection associated high mobility group box), GATA-3 (GATA binding protein 3) puis Th-POK (T-helper-inducing POZ/Krüppel-like factor) qui régulent positivement l'expression du gène codant pour CD4. Les lymphocytes T se différencient en CD4⁺ SP ou CD8⁺ SP selon l'effet produit sur la signalisation des TCR suite à la diminution de l'expression des corécepteurs CD8. L'engagement de TCR restreints aux molécules du CMH de classe II entraîne un signal persistant car les corécepteurs, dont l'expression est maintenue, continuent à promouvoir la signalisation déclenchée par les TCR. Ce signal persistant entraîne l'expression accrue du facteur de transcription Th-POK et la différenciation des thymocytes en CD4⁺ SP (Wang et al., 2008). L'induction de ce facteur de transcription est essentielle pour maintenir l'expression du CD4 et par conséquent le choix de lignage en CD4⁺ SP. Il a été identifié par le groupe de Kappes, qu'une mutation spontanée dans le gène codant pour Th-POK provoque la disparition de la population CD4⁺ SP. Chez ces souris HD (helper deficient), les thymocytes

restreints au CMH de classe II sont redirigés par défaut vers le choix de lignage CD8⁺ SP (Dave et al., 1998). La diminution d'expression des corécepteurs CD8 entraîne une interruption de la signalisation des TCR dans les thymocytes exprimant des TCR restreints aux molécules du CMH de classe I. Cette interruption de la signalisation des TCR entraîne alors l'expression du facteur de transcription RUNX3 (Runt-related transcription factor 3) qui agit en réprimant la transcription des corécepteurs CD4 et en augmentant celle des corécepteurs CD8. Il a été démontré que cette différenciation est dépendante du signal de l'IL-7 sécrétée par les cellules stromales thymiques. En effet, *in vitro* l'IL-7, essentielle pour la survie des lymphocytes T CD8⁺ SP, stimule l'expression des corécepteurs CD8 et inhibe l'expression des corécepteurs CD4. Des études suggèrent que l'IL-7 induit l'expression de RUNX3 au cours du choix de lignage CD8⁺ SP (Yu et al., 2003).

Le choix de lignage en CD4⁺ SP est déterminé d'une part par le facteur de transcription Th-POK qui inhibe l'expression de RUNX3 et d'autre part par la persistance du signal des TCR qui inhibe la signalisation de l'IL-7 par l'intermédiaire de SOCS-1. Le choix de lignage en CD8⁺ SP est déterminée par RUNX3 qui diminue l'expression de Th-POK pour inhiber l'expression du CD4 (Singer et al., 2008) (Figure 6).

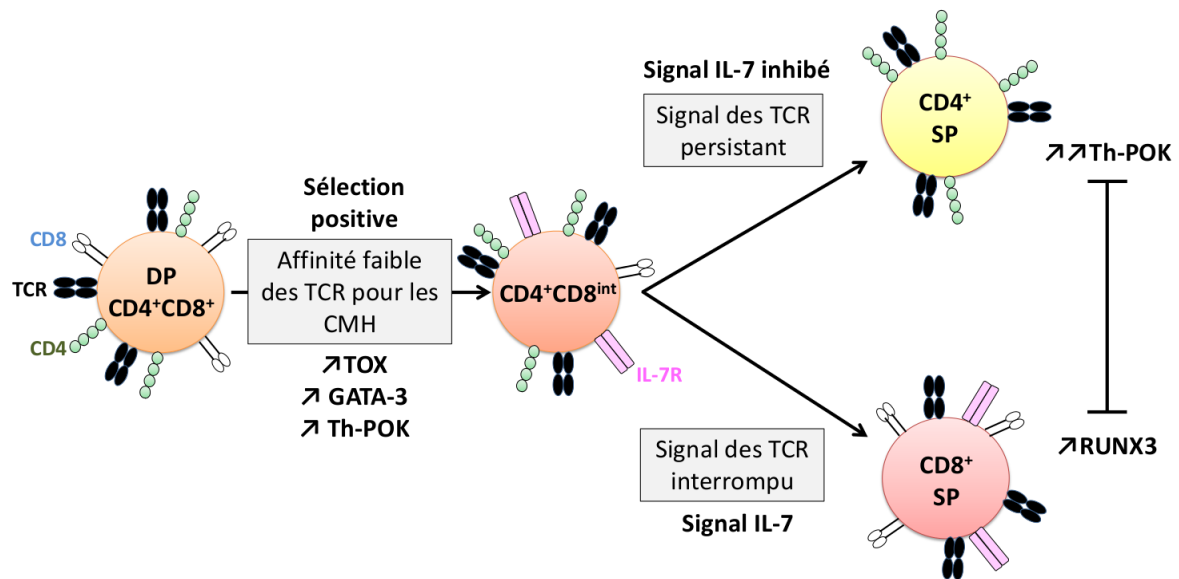


Figure 6 : Choix de lignage CD4⁺ SP ou CD8⁺ SP.

Les cellules DP sélectionnées positivement se différencient en CD4⁺CD8^{int} et expriment les facteurs de transcription TOX, GATA-3 et Th-POK. Si les cellules s'engagent aux CMH de classe II, le signal des TCR persiste, les cellules se différencient en CD4⁺ SP et augmentent fortement l'expression de Th-POK. Si les cellules s'engagent au CMH de classe I, le signal est interrompu, les cellules se différencient en CD8⁺ SP suite au signal de l'IL-7 et elles expriment RUNX3. RUNX3 et Th-POK sont mutuellement antagonistes. *Adapté de « CD8⁺ thymocytes differentiation, T cell two-step », Gascoigne, Nature Immunology, 2010.*

5 La sélection négative des lymphocytes T $\alpha\beta$ dans la médulla thymique

Après le choix de lignage, les lymphocytes T SP migrent dans la médulla où ils sont soumis à une seconde étape de sélection négative (Matzinger et al., 1984). Cette étape provoque l'élimination des lymphocytes T qui engagent leurs TCR avec une forte affinité à des CMH présentant des antigènes du soi. En effet, ces lymphocytes T potentiellement auto-réactifs pourraient favoriser le développement de maladies auto-immunes à la périphérie. Durant la sélection négative, les populations cellulaires qui expriment à leur surface les CMH présentant les antigènes du soi sont les mTEC et les DC. Ces cellules présentent un large spectre d'antigènes (par exemple, l'insuline) dont l'expression était auparavant considérée comme restreinte à la périphérie. Ces antigènes sont spécifiques de tissus (TSA) et entraînent la délétion des cellules auto-spécifiques.

Les mTEC qui représentent moins de 1% des cellules totales du thymus jouent un rôle primordial dans l'induction de la tolérance centrale. Elles expriment 19 193 gènes qui codent pour des TSA soit 85% du génome murin. Un des régulateurs de transcription les mieux décrit est AIRE (Autoimmune regulator gene) qui régule à lui seul 3980 gènes codant pour des TSA tels que l'insuline ou la protéine de la myéline. Il a été démontré qu'une mutation dans le gène AIRE est associée à une maladie récessive autosomique : APS1 ou APECED (autoimmune polyglandular syndrome type 1) et une personne possédant une mutation sur un seul des allèles est plus susceptible au développement de maladies auto-immunes (Anderson and Su, 2016). Les autres régulateurs de transcription sont moins connus, FEZF2 (FEZ family zinc finger protein 2) par exemple régule l'expression de TSA indépendamment d'AIRE et la mutation de son gène entraîne le développement de maladies auto-immunes différentes de celles provoquées par la mutation dans le gène codant AIRE (Takaba et al., 2015). Les lymphocytes T SP qui vont engager leurs TCR aux CMH présentant des TSA exprimés par les mTEC vont être éliminés et mourir par apoptose ou vont mourir par inactivation fonctionnelle, l'anergie (Gallegos and Bevan, 2004).

Les DC représentent 0.5% des cellules totales du thymus et elles n'expriment pas le régulateur AIRE. Elles présentent des antigènes endogènes et sont également capables de présenter des TSA provenant des mTEC par cross-présentation unidirectionnelle. Les

mécanismes de ce processus n'ont pas été mis en évidence mais il a été proposé l'échange de membrane, le transfère d'exosome, la consommation de corps apoptotiques ou encore le partage de jonctions communicantes. La cross-présentation favoriserait un bon scanning des lymphocytes T qui sont très mobiles dans la médulla. D'autre part, même si les mTEC expriment un large spectre de TSA, ils n'expriment pas tous les antigènes du soi périphériques. Pour compenser ce manque, des DC provenant de la périphérie migrent dans le thymus grâce à l'expression du récepteur aux chimiokines CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) et participent au mécanisme de tolérance centrale en présentant des Ag du soi tissulaires, des antigènes exogènes dérivés de la flore commensale intestinale et de l'alimentation qui ne sont pas présentés par les mTEC. Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ SP qui engagent leurs TCR aux CMH présentant des TSA exprimés par les DC vont mourir par apoptose (Lopes et al., 2015).

Contrairement à la sélection positive qui est strictement dépendante de l'engagement des TCR, la sélection négative médullaire nécessite un deuxième signal délivré par les molécules de costimulation exprimées par les mTEC et les DC. Il a été démontré que la délétion clonale induite par le superantigène SEB est réduite chez des souris néonatales déficientes pour l'expression de CD28 (Kishimoto and Sprent, 1999). Ce résultat est confirmé *in vivo* par une étude montrant qu'un blocage périnatal de CD80 et CD86 (ligands de CD28) affecte la sélection négative et entraîne le développement de lymphocytes T auto-réactifs (Gao et al., 2002). Toutefois, il a été suggéré que si la reconnaissance des TCR aux ligands du soi est de très forte affinité, les molécules de costimulation CD28 ne sont pas nécessaires pour l'induction de la sélection négative (Walunas et al., 1996).

Les lymphocytes T qui ont été sélectionnés positivement dans le cortex et qui n'ont pas été sélectionnés négativement dans la médulla migrent ensuite à la périphérie. Ces cellules sont dites naïves car elles n'ont jamais rencontré l'antigène du non soi pour lequel elles sont spécifiques (Figure 7).

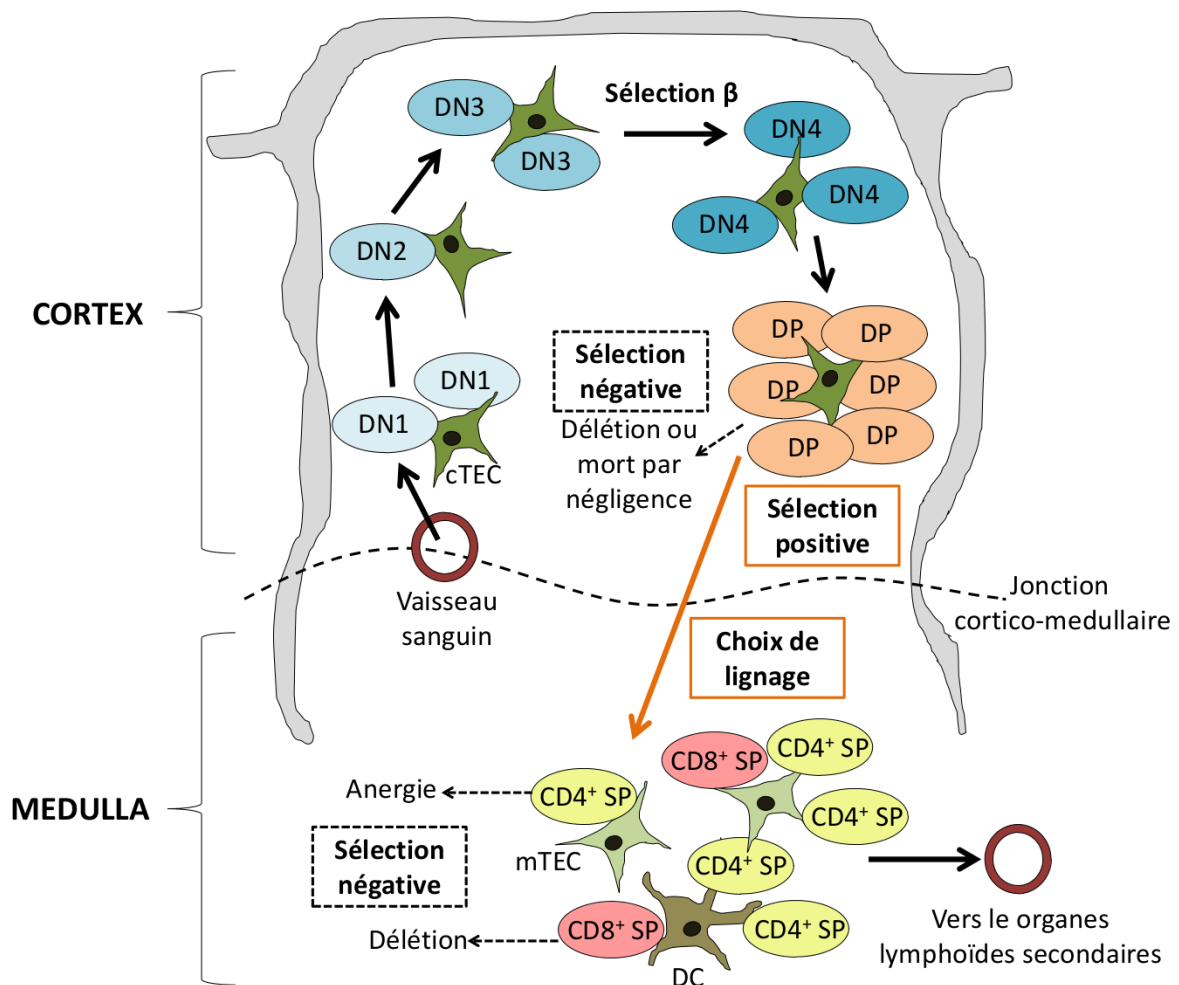


Figure 7 : Les différentes étapes de sélections thymiques au cours du développement des cellules T.

Les progéniteurs migrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire puis se différencient en DN. Ces cellules subissent la sélection β qui entraîne la survie des cellules exprimant un pré-TCR fonctionnel. Par la suite, les DP qui expriment des TCR $\alpha\beta$ fonctionnels ayant une faible affinité pour les CMH du soi sont sélectionnés positivement dans le cortex thymique. Les autres cellules sont sélectionnées négativement et meurent par apoptose ou par négligence. Les cellules DP se différencient en cellules CD4⁺ SP ou CD8⁺ SP et migrent dans la médulla, c'est le choix de lignage. Enfin, les lymphocytes auto-spécifiques qui engagent leurs TCR à des CMH présentant des antigènes du soi seront sélectionnés négativement et mourront par apoptose ou par anergie. Les autres cellules naïves migreront à la périphérie et circuleront dans les organes lymphoïdes secondaires. *Adapté de « lymphocytes development », Zhang, eLS, 2010.*

CHAPITRE 2 : LES VOIES DE SIGNALISATION DES TCR DURANT LE DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T $\alpha\beta$

L'engagement des TCR est primordial pour les différentes étapes du développement des lymphocytes T. Il déclenche des voies de signalisation qui vont réguler la sélection β , la sélection positive, la sélection négative et le choix de lignage. Suite à l'engagement des TCR aux complexes CMH/peptide, les TCR forment des microclusters de signalisation essentiels pour initier la transduction des signaux. Ces événements se produisent dans les secondes et minutes après l'engagement des TCR. L'intensité des signaux intracellulaires déclenchée par les TCR est un élément important dans la régulation des différentes étapes de sélection des lymphocytes T. Les différentes voies de signalisation des TCR ainsi que leur rôle durant le développement des lymphocytes T seront détaillés dans le chapitre 2 de l'introduction.

1 Le complexe de signalisation TCR/CD3

Les domaines intracytoplasmiques des chaînes α et β du TCR sont courts et ne contiennent pas de « module » de signalisation. Les chaînes $\alpha\beta$ des TCR sont associées de façon non covalente à des molécules CD3 présentant des domaines intracellulaires plus long et capable de transmettre les premiers signaux intracellulaires. Ce complexe est formé de sous-unités polypeptidiques non polymorphes δ , ϵ , γ et ζ qui vont s'associer afin de former les hétérodimères CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ et l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$. Contrairement au domaine CD3 ζ , toutes les sous-unités CD3 contiennent une région transmembranaire chargée négativement qui va entraîner leur association avec le TCR et faciliter la stabilité du complexe TCR/CD3 (Call et al., 2002).

Ce complexe s'associe dans le reticulum endoplasmique par des mécanismes qui sont contrôlés. Dans un premier temps, la chaîne α du TCR s'associe avec l'hétérodimère CD3 $\delta\epsilon$, puis la chaîne β du TCR s'associe avec l'hétérodimère CD3 $\gamma\epsilon$ formant ainsi l'hexamère TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\delta\epsilon$ /CD3 $\gamma\epsilon$. Ce complexe va s'associer à l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$ pour former le complexe TCR/CD3 fonctionnel qui va être exprimé à la surface des lymphocytes T (Alarcon et al., 1988).

Suite à l'engagement des TCR aux complexes CMH/peptide, les molécules CD3 entraînent l'induction du signal grâce au recrutement de kinases et d'enzymes nécessaires à l'activation des cascades de signalisation. Ces molécules se lient aux motifs ITAM (Immunoreceptor tyrosines-based activation motifs) présents dans les molécules CD3. Les molécules CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ possèdent chacun un motif ITAM alors que les molécules CD3 ζ en possèdent trois (Samelson et al., 1985) (Figure 8).

2 La signalisation proximale des TCR

2.1 Les kinases Lck et Fyn

Les complexes TCR/CD3 ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque, ils dépendent des kinases Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) et Fyn (p59-Fyn) pour initier les voies de signalisation. Ces kinases de la famille des Src kinases sont les deux premières molécules activées après l'engagement des TCR. Lck est exprimé à un niveau constant durant tout le développement des cellules T alors que Fyn est transitoirement diminué au stade DP et augmenté au stade SP mature. Il a été démontré dans les souris Lck^{-/-} qu'il y a dix fois moins de cellules DP et que les cellules SP sont indétectables par rapport à des souris contrôles. L'absence de Lck dans ces souris entraîne un blocage partiel au stade DN3 car l'activation des voies de signalisation du pré-TCR exprimé par les cellules DN3 est nécessaire pour pouvoir poursuivre la différenciation des lymphocytes T (Molina et al., 1992). Dans les souris Fyn^{-/-}, les proportions de lymphocytes T des différents stades de différenciation sont similaires à des souris contrôles (Appleby et al., 1992; Stein et al., 1992). Cependant, dans les souris déficientes à la fois pour Lck et Fyn, il est observé un blocage total de la différenciation au stade DN3 (Groves et al., 1996; van Oers et al., 1996). Ces résultats démontrent que Lck joue un rôle primordial durant le développement des lymphocytes T alors que Fyn joue un rôle moins important. Le modèle de souris Lck déficientes suggère que Lck transduit les signaux des TCR nécessaires à la sélection positive. En effet, il est observé une forte diminution des populations SP CD4⁺ et CD8⁺ dans ces souris (Molina et al., 1992). Lck est aussi essentielle pour le choix de lignage des lymphocytes T. Il a été démontré que l'expression de Lck dans des modèles de souris transgéniques dirige les lymphocytes T vers le lignage CD4 alors qu'une forme catalytiquement inactive de Lck dirige vers le lignage CD8

(Hernández-Hoyos et al., 2000; Legname et al., 2000). Ces résultats supportent le modèle de persistance du signal durant le choix de lignage des cellules T. En résumé, ces kinases qui sont les premiers acteurs de la transduction du signal des TCR sont indispensables pour toutes les étapes de développement des lymphocytes T.

Lors de l'engagement des TCR, les corécepteurs CD4 et CD8 se localisent près des TCR grâce à leur interaction avec les CMH de classe II et de classe I respectivement. Comme Lck se lie de manière non covalente aux domaines intra-cytoplasmiques des corécepteurs CD4 et CD8 (Veillette et al., 1988), ces corécepteurs favorisent le recrutement de Lck au niveau de ses substrats : les chaînes CD3 du TCR. Lck phosphoryle les tyrosines des ITAM des chaînes CD3 δ , CD3 γ , CD3 ϵ et CD3 ζ des TCR. Cette modification va entraîner le recrutement de la tyrosine kinase Zap-70 (zeta-chain-associated protein kinase 70) qui va spécifiquement lier ses domaines SH2 (Src homology domain 2) aux tyrosines phosphorylées des ITAM des CD3. L'analyse des différentes populations de lymphocytes T dans des souris Zap-70^{-/-} a démontré que cette kinase est essentielle pour la sélection positive et négative des cellules T (Negishi et al., 1995). De plus, il a été démontré que Zap-70 favorise l'induction d'un signal soutenu suite à l'activation des pré-TCR durant le stade DN4 (Palacios and Weiss, 2007). Zap-70 va par la suite être phosphorylé par Lck, conduisant à son activation. ZAP-70 est également capable de s'auto-phosphoryler augmentant ainsi son activité catalytique. Finalement, Zap-70 va phosphoryler les tyrosines de l'adaptateur transmembranaire LAT (linker for activation of T cells) ainsi que les tyrosines de l'adaptateur SLP-76 (SH2 domain containing Leucocytes Phosphoprotein of 76Kd), ce qui va entraîner le recrutement de multiples complexes de signalisation.

L'activité de Lck est régulée par la phosphorylation de deux de ses tyrosines. La phosphorylation de sa tyrosine activatrice Y394 chez l'Homme stabilise sa conformation ouverte et son activité kinase. A l'inverse, la phosphorylation de sa tyrosine 505 chez l'Homme entraîne une conformation fermée, ce qui inhibe son activité kinase (Yamaguchi and Hendrickson, 1996). Pour être activé, Lck auto-phosphoryle sa tyrosine Y394. Les phosphatases CD45, SHP-1 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6) et PTPN22 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22) déphosphorylent ce résidu pour réguler négativement la kinase. Pour inhiber Lck, CSK phosphoryle la tyrosine inhibitrice

Y505 suite à son recrutement à la membrane plasmique au niveau de la phosphoprotéine PAG (phosphoprotein associated with glycolipid-enriched membrane domains) ou de la kinase DOK1 (docking Protein 1). Pour lever l'effet inhibiteur, la tyrosine Y505 est déphosphorylée par CD45 ce qui favorise la conformation active de Lck (Rhee and Veillette, 2012). En l'absence de ces molécules, l'activité de Lck est fortement altérée. On peut noter que la phosphorylation simultanée des deux tyrosines entraîne une conformation active de Lck (Figure 8).

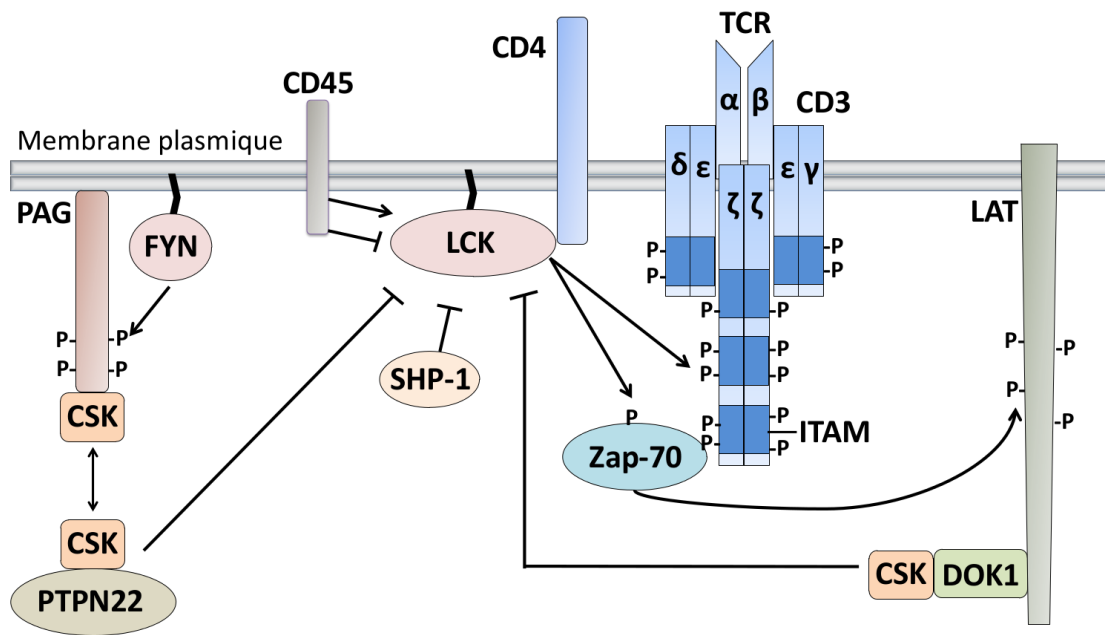


Figure 8 : Activité et régulation des kinases Lck et Fyn durant l'engagement des TCR.

Le complexe TCR/CD3 est composé de l'hétérodimère CD3 $\delta\epsilon$ associé à la chaîne α du TCR. De l'hétérodimère CD3 $\gamma\epsilon$ associé à la chaîne β du TCR. Et de l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$ formant ainsi un TCR $\alpha\beta$ fonctionnel. Lors de l'engagement des TCR, Lck est recruté près des chaînes CD3 grâce à son interaction avec les corécepteurs CD4 et CD8. Lck phosphoryle les ITAM des chaînes CD3 ce qui entraîne le recrutement de la kinase Zap-70. Cette kinase est phosphorylée par Lck pour être activée puis elle phosphoryle les tyrosines de l'adaptateur transmembranaire LAT. L'activité de Lck est régulée par la phosphorylation des tyrosines 505 et 394 chez l'Homme. Lck s'active en phosphorylant sa tyrosine 394. Cette phosphorylation est régulée négativement par les phosphatases SHP-1, PTPN22 et CD45. Lck est inactive lorsque la tyrosine 505 est phosphorylée par CSK qui peut être recrutée soit à DOK1 soit à la phosphoprotéine PAG lorsque celle-ci est phosphorylée par Fyn. La tyrosine 505 est déphosphorylée par CD45. Adapté de « *T cell receptor signaling networks: branched, diversified and bounded* », Brownlie et al., *Nature Reviews*, 2013.

2.2 L'adaptateur transmembranaire LAT et son complexe multi-protéique

L'adaptateur transmembranaire LAT est essentiel pour coordonner l'assemblage d'un complexe de signalisation multi-protéique basé sur la reconnaissance de tyrosines phosphorylées par la kinase Zap-70. Il joue par conséquent un rôle central dans la formation des différents complexes de signalisation qui vont réguler le développement des lymphocytes T. En effet, il a été observé dans les souris LAT^{-/-} un blocage complet du développement des lymphocytes T au stade DN3 où l'engagement du pré-TCR est nécessaire pour poursuivre la différenciation des cellules (Zhang et al., 1999). De plus, des souris knock out conditionnelles dans lesquelles LAT a été délété à partir du stade DP ont été générées pour analyser son rôle durant l'étape de sélection positive. Dans ces souris, il y a un blocage de la différenciation du stade DP vers le stade SP CD4⁺ et CD8⁺, ce qui démontre l'importance de LAT dans cette étape (Shen et al., 2009).

La majorité du recrutement des complexes de signalisation à LAT est localisée au niveau de 4 tyrosines en position Y132, Y171, Y191 et Y226 chez l'Homme (Paz et al., 2001). La tyrosine Y132 phosphorylée va entraîner le recrutement de la phospholipase PLC- γ 1 (phospholipase C gamma) qui interagit également avec le PIP3 (phosphoinositide) de la membrane plasmique grâce à son domaine PH (pleckstrin homology). PLC- γ 1 hydrolyse le PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) pour produire de l'IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate) et du DAG (diacylglycerol) (Rhee and Bae, 1997). Le DAG stimule l'activité de RasGRP nécessaire à l'activation de la GTPase Ras de la **voie des MAPK** (mitogen-activated protein kinases). Le DAG stimule également l'activité de la sérine/thréonine kinase PKC θ (protein kinase C) de la **voie NF- κ B** (Nuclear factor-kappa B). Enfin, l'IP₃ est important pour l'induction de la **voie calcique**.

Les tyrosines phosphorylées de LAT Y171, Y191 et Y226 lient les membres de la famille de Grb2 tels que Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), Gads (GRB2 related adaptor protein downstream of Shc) et Grap (GRB2 related adaptor protein). L'adaptateur Grb2 est impliqué dans l'activation de la voie des MAPK notamment grâce à son association constitutive avec la GEF Sos1 (guanine nucleotide exchange factor) qui va activer la GTPase Ras (Houtman et al., 2006). L'adaptateur Gads lie préférentiellement les tyrosines

phosphorylées Y171 et Y191, il entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice SLP-76 à LAT (Liu et al., 1999).

SLP-76 entraîne le recrutement de plusieurs protéines dans les complexes multi-protéique de LAT. Il interagit avec la kinase PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) qui régule positivement la **voie Akt/mTOR** (protein kinase B/mammalian target of rapamycin) et qui régule le recrutement de PLC- γ 1 grâce à la transformation du PIP₂ en PIP₃. SLP-76 interagit également avec la kinase ITK (IL-2 inducible T cell kinase) qui phosphoryle LAT et qui est nécessaire à l'activation de PLC- γ 1. Il interagit avec le facteur d'échange Vav1 (Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1) qui active les protéines G Rac1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), RhoA (ras homolog gene family, member A) et Cdc42 (cell division control protein 42 homolog) nécessaires à la réorganisation du cytosquelette d'actine, l'activation des intégrines et l'activation de la **voie JNK/p38** (c-Jun N-terminal kinases) (Saveliev et al., 2009). Et enfin, SLP-76 interagit avec l'adaptateur ADAP (adhesion and degranulation adaptor protein) qui régule l'activation des intégrines (Baker et al., 2009; Wang et al., 2009) (Figure 9).

Pour réguler négativement la signalisation induite par les complexes multi-protéiques que recrutent LAT, différents mécanismes vont être mis en place. Par exemple, la phosphatase SHP-1 déphosphoryle les tyrosines de LAT afin de prévenir la formation des complexes de signalisation (Balagopalan et al., 2010).

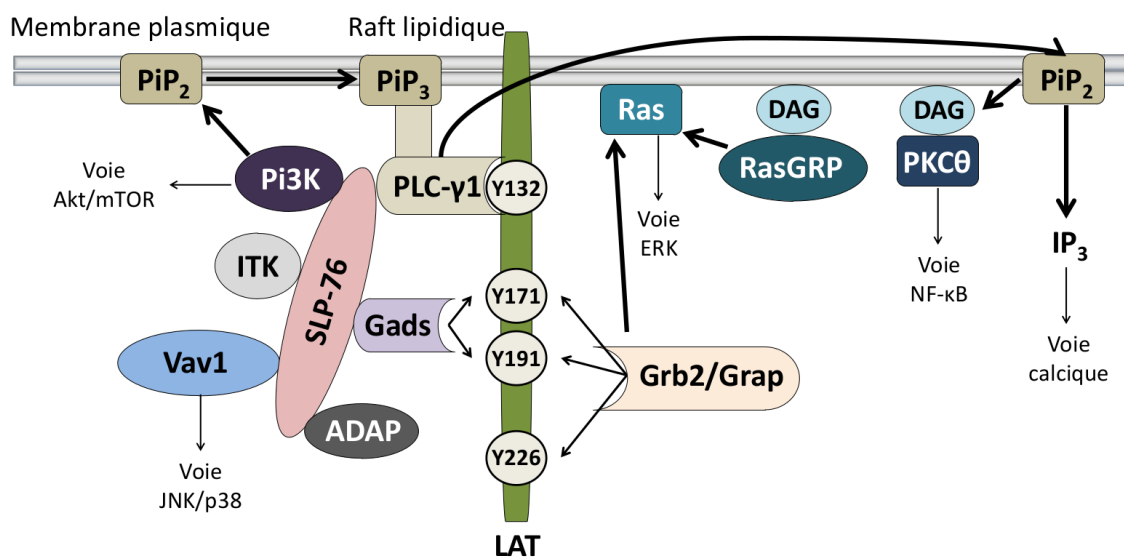


Figure 9 : Les complexes de signalisation recrutés par l'adaptateur transmembranaire LAT.

Suite à l'engagement des TCR, les tyrosines de LAT sont phosphorylées par la kinase Zap-70. La tyrosine phosphorylée en position 132 entraîne le recrutement de la phospholipase PLC-γ1 qui va hydrolyser le PIP₂ en IP₃ et DAG. L'IP₃ est nécessaire à l'activation de la voie calcique et le DAG active les voies des MAPK et la voie NF-κB. Les tyrosines phosphorylées 171, 191 et 226 entraînent le recrutement des protéines de la famille de Grb2 telles que Grb2, Gads et Grap. Grb2 participe à l'activation des voies des MAPK et Gads entraîne le recrutement de SLP-76 à LAT. L'adaptateur SLP-76 est activé suite à sa phosphorylation par Zap-70 et il favorise le recrutement des kinases Pi3K et ITK, du facteur d'échange Vav1 et de l'adaptateur ADAP. La Pi3K active la voie Akt/mTOR. ITK phosphoryle LAT et active la phospholipase PLC-γ1. Vav1 active la voie JNK/p38, active les intégrines et régule la réorganisation du cytosquelette d'actine. Enfin, ADAP est nécessaire à l'activation des intégrines. *Adapté de « Role of the LAT adaptor in T-cell development and TH2 differentiation », Malissen, Aguado and Malissen, Advances In Immunology, 2005.*

3 La signalisation distale des TCR

3.1 La voie calcique

L'IP₃ produit suite à l'activation de la PLC-γ1 se fixe sur ses récepteurs exprimés par le reticulum endoplasmique. Cette liaison entraîne la libération des stocks de calciums intracellulaires, ce qui induit l'ouverture des canaux CRAC (Ca²⁺-Release-Activated-Ca²⁺) de la membrane plasmique et entraîne un influx de calcium extracellulaire. L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire va favoriser l'activation de la calcineurine qui va déphosphoryler le facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells) et entraîner ainsi sa translocation dans le noyau. Cette translocation induit l'expression de gènes clefs pour le développement des lymphocytes T (Oh-hora, 2009).

Il a été démontré que la voie calcique régule la sélection positive des lymphocytes T. En effet, des souris traitées avec un inhibiteur de la calcineurine (CsA) provoque un blocage de la différenciation des cellules DP en cellules CD4⁺ et CD8⁺ SP (Gao et al., 1988; Jenkins et al., 1988; Neilson et al., 2004). Il a également été démontré par des expériences en temps réel de microscopie par excitation à deux photons que le calcium régule la motilité des cellules T durant la sélection positive. L'engagement des TCR entraîne une augmentation de la concentration intra-cytoplasmique de calcium, ce qui diminue la motilité des lymphocytes et prolonge l'interaction des lymphocytes avec les cellules qui présentent les complexes CMH/peptide (Bhakta et al., 2005). De plus, la durée et la fréquence du signal transduit par les TCR sont importantes pour la sélection positive des lymphocytes T. Il a été démontré que si le flux calcique est faible mais soutenu, il favorise la sélection positive des lymphocytes T alors que si le flux calcique est fort et transitoire il stimule la sélection négative des cellules (Melichar et al., 2013). Ces résultats sont en corrélation avec la nécessité pour les lymphocytes T d'être stimulés par des ligands de faibles affinités pour être sélectionnés positivement.

3.2 La voie PKCθ/NF-κB

La sérine/thréonine kinase PKCθ est spécifiquement exprimée dans les lymphocytes T. Après l'engagement des TCR, elle est recrutée à la membrane plasmique dans les rafts lipidiques

grâce à son interaction avec le DAG. Cette kinase entraîne la translocation du facteur de transcription NF- κ B dans le noyau. Pour cela, elle phosphoryle I κ B qui a pour fonction de séquestrer NF κ B dans le cytoplasme. Cette phosphorylation stimule la dégradation d'I κ B et entraîne la translocation de NF- κ B. Une des fonctions de ce facteur de transcription va être de favoriser l'expression de gènes régulant le développement des lymphocytes T (Schulze-Luehrmann and Ghosh, 2006).

Le rôle de NF- κ B dans la régulation du développement des lymphocytes T a été étudié en générant des souris transgéniques surexprimant uniquement dans les lymphocytes T une forme dominante inhibitrice d'I κ B. Dans ce modèle, il est observé une augmentation du nombre de cellules DP et une diminution du nombre de cellules SP, ce qui corrèle avec un défaut de sélection positive. De plus, un modèle de sélection négative a démontré que l'inhibition de NF- κ B n'affecte pas ce processus (Hettmann and Leiden, 2000). D'autres expériences utilisant des souris similaires ont démontré que l'inhibition de NF- κ B entraîne une perte des thymocytes sélectionnés positivement durant la β -sélection. Ce phénotype montre que NF- κ B est important pour la survie des cellules durant l'engagement des pré-TCR (Voll et al., 2000).

3.3 La voie des MAPK/ERK, JNK et p38

Les MAPK kinases sont activées par la phosphorylation de résidus sérines, thréonines ou tyrosines par des MKK (MAP kinases kinases) qui sont elles-mêmes phosphorylées par des MKKK (MAP kinases kinases kinases). Il existe trois groupes de MAPK chez les mammifères : les kinases **ERK** (extracellular signal-regulated protein kinases), les kinases **JNK** et les kinases **p38**.

L'activation de la voie Ras-ERK a été démontrée comme étant importante pour réguler la sélection positive et négative des lymphocytes T. Il a été observé que la stimulation de lymphocytes T par des agonistes induisant la sélection positive des cellules entraîne la phosphorylation d'ERK dans le cytosol et le noyau alors qu'une stimulation par des agonistes induisant la sélection négative des cellules entraîne la phosphorylation d'ERK à la membrane plasmique (Daniels et al., 2006). De plus, il a été démontré qu'une phosphorylation faible

mais soutenue d'ERK favorise la sélection positive des lymphocytes T alors qu'une phosphorylation forte et transitoire stimule la sélection négative des cellules (Mariathasan et al., 2001; McNeil et al., 2005). Ces résultats sont en accord avec le modèle de force du signal impliqué dans la sélection positive et négative des lymphocytes T.

La voie JNK/p38 a été démontrée comme favorisant la sélection négative des lymphocytes T. En effet, il est observé dans des souris traitées avec un inhibiteur de p38 une augmentation de la proportion de cellules CD4⁺ et CD8⁺ SP ce qui est corrélée avec un défaut de sélection négative (Sugawara et al., 1998). Contrairement à la voie ERK, il n'a pas été observée de localisation différente pour la voie JNK.

3.4 La voie Akt/mTOR

Après l'engagement des TCR, la PI3K est recrutée à la membrane plasmique grâce à l'interaction de son domaine SH2 avec les tyrosines phosphorylées de SLP-76. Cette kinase hydrolyse le PIP₂ en PIP₃, ce qui permet de recruter des protéines possédant des domaines PH comme la sérine/thréonine kinase Akt. Cette kinase va être activée par PDK-1 puis converger avec la voie PKC θ pour activer la voie NF- κ B. La forme activée d'Akt phosphoryle mTOR ou bien inhibe TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) pour réguler mTOR indirectement (Guo et al., 2011).

Les kinases PI3K et Akt jouent différents rôles durant le développement des lymphocytes T. Dans des souris délétées pour une sous-unité catalytique de la PI3K ou délétées pour Akt, il est observé une diminution de la taille du thymus ainsi qu'un blocage du développement des cellules au niveau de l'étape de sélection β . L'étude des souris Akt^{-/-} a également démontré que cette kinase protège les thymocytes de la mort par apoptose durant la sélection β . D'autre part, dans des souris transgéniques dans lesquelles la voie endogène PI3K/Akt est inhibée après l'étape de sélection β , il est observé un blocage de la transition du stade DN4 vers le stade DP (Juntilla et al., 2007; Xue et al., 2008).

La voie PI3K/Akt/mTOR a été montrée comme participant aux voies du récepteur Notch, nécessaire au métabolisme des thymocytes, à leur prolifération et leur différenciation en

cellules DP. Il a été montré que mTORC1, appartenant au complexe mTOR, favorise l'activation de la voie NF- κ B suite à l'engagement du récepteur Notch, pour entraîner la différenciation de cellules DN en cellules DP (Lee et al., 2012).

4 Le rôle du trafic vésiculaire dans la régulation des voies de signalisation des TCR

Il a longtemps été pensé que les événements de signalisation proximaux des TCR, se déroulaient au niveau de la membrane plasmique. Or, le trafic vésiculaire joue un rôle important dans l'activation des lymphocytes T et par conséquent la régulation des voies de signalisation lors de l'engagement des TCR aux complexes CMH/peptide. Les vésicules possèdent différentes fonctions comme le recyclage et la dégradation des TCR mais elles entraînent aussi la transmission des signaux délivrés par les TCR (Alcover and Alarcón, 2000; Finetti et al., 2015). En effet, il a été démontré que même si la majorité des protéines adaptatrices transmembranaires LAT étaient localisées à la membrane plasmique, une partie de ces protéines se localisent dans des vésicules cytosoliques mobiles. Ces vésicules sont recrutées au niveau de la synapse immunologique près des sites d'activation des TCR sans qu'elles fusionnent avec la membrane plasmique. Ce mécanisme permettrait d'entraîner la phosphorylation de LAT par les kinases associées aux TCR afin de former les complexes de signalisation associés à LAT puis il permettrait aux vésicules mobiles de propager les signaux des TCR (Billadeau, 2010; Larghi et al., 2013).

CHAPITRE 3 : LES PROTEINES DE SIGNALISATION THEMIS

Themis (thymocyte expressed molecule involved in selection) est une protéine découverte simultanément par les groupes du Dr Paul E. Love, du Dr Nicholas R.J. Gascoigne et du Dr Ronald H. Schwartz. Les études à partir de souris Themis^{-/-} ont révélé que cette protéine joue un rôle critique dans les stades tardifs du développement des lymphocytes T tels que la sélection positive et le développement de cellules matures. D'un point de vue moléculaire, Themis a été identifiée comme étant une protéine de la signalisation des TCR (Fu et al., 2009b; Johnson et al., 2009; Lesourne et al., 2009). Si le rôle physiologique de cette protéine a été largement décrit, sa fonction moléculaire au sein de ces voies reste encore mal comprise. La fonction de Themis durant le développement des lymphocytes T ainsi que les connaissances sur sa fonction moléculaire seront détaillées dans le chapitre 3 de l'introduction.

1 Fonction de Themis durant le développement des lymphocytes Tαβ

L'analyse de souris Themis^{-/-} générées par ciblage génique ou par mutagenèse induite a démontré que Themis joue un rôle essentiel dans le développement des lymphocytes T. Dans ces souris, il est observé une diminution du pourcentage et du nombre de cellules CD4⁺ et CD8⁺ SP dans le thymus et une diminution du nombre de lymphocytes T périphériques. Ce phénotype étant souvent associé à un défaut de sélection positive, il a été analysé les conséquences de la déficience en Themis sur le développement des cellules T dans des modèles murins de sélection positive. Il a été mis en évidence dans les souris Themis^{-/-} exprimant des TCR transgéniques AND, OT-I, H-Y, 5C.C7 et 3A9, une augmentation du pourcentage de cellules DP et une forte diminution du pourcentage de cellules SP par rapport à des souris contrôles. Une analyse plus fine dans les souris Themis^{-/-} démontre que les cellules DP CD3^{int} CD69⁺ en cours de sélection positive ne sont pas affectées alors que le pourcentage de cellules CD4⁺CD8^{int} qui succèdent la sélection positive est diminué (Lesourne et al., 2009). Les conséquences de la déficience en Themis sur la sélection négative des lymphocytes T ont été analysées dans différents modèles murins de sélection négative. Il a été observé dans des souris Themis^{-/-} exprimant le TCR transgénique H-Y (spécifique de

l'antigène H-Y exprimé exclusivement chez les souris mâles) ou dans des modèles de superantigène, une diminution de la sélection négative (Lesourne et al., 2009 ; Fu et al., 2009 ; Johnson et al., 2009). La sélection négative est un processus qui entraîne l'élimination de cellules auto-spécifiques potentiellement dangereuses pour l'organisme. Une diminution de la sélection négative observée dans les souris Themis^{-/-} peut être associée à une augmentation du nombre de cellules auto-spécifiques et donc au développement de maladie auto-immunes. Des travaux ont identifié chez certains rats une mutation spontanée dans le gène de Themis qui entraîne un défaut du développement des lymphocytes T similaire à celui observé dans les souris Themis^{-/-}. Ces travaux ont en outre montré que cette mutation entraîne le développement spontané d'une maladie inflammatoire de l'intestin associée à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires sécrétées par des lymphocytes T conventionnels (Chabod et al., 2012). De plus, il faut noter que des études d'association pangénomique ont récemment identifié Themis comme un gène de susceptibilité dans la sclérose en plaque, la dermatite atopique et la maladie coeliaque qui sont des pathologies auto-immunes (Dubois et al., 2010; Kim et al., 2015; Sawcer et al., 2011). On ignore néanmoins le rôle précis de Themis dans ces pathologies. Ces travaux démontrent que Themis joue un rôle essentiel dans la régulation des processus de sélection positive et négative durant le développement des lymphocytes T.

A ce jour, la fonction de Themis à la périphérie est peu connue car les souris Themis^{-/-} étant lymphopéniques, elles possèdent respectivement cinq et deux fois moins de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ périphériques par rapport à des souris contrôles. Par conséquent, nous ne pouvons pas savoir si le phénotype observé à la périphérie est dû à l'absence de Themis ou bien à la lymphopénie, connue pour favoriser le développement de maladies auto-immunes spontanées et privilégier la différenciation de certaines sous-populations de lymphocytes T effecteurs. Pour répondre à ce problème, notre équipe a récemment généré des souris Themis^{-/-} conditionnelles qui présentent une déficience sélective pour Themis dans les lymphocytes T périphériques et pas dans les thymocytes. Ces souris ne sont pas lymphopéniques et favorisent ainsi l'étude des conséquences de la déficience de Themis à la périphérie.

2 Structure de Themis

Themis est le membre fondateur d'une nouvelle famille de gènes présentant des protéines orthologues dans de nombreuses espèces animales comme les poissons ou les oiseaux. Chez les mammifères, il existe trois membres de cette famille : Themis1 qui est exprimé principalement dans les lymphocytes T mais aussi les mastocytes et les cellules NKT (**appelé Themis tout au long de ce manuscrit**), Themis2 qui est exprimé dans les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques et Themis3 qui est exprimé dans les cellules épithéliales intestinales (les fonctions de Themis2 et Themis3 ne seront pas abordées dans ce manuscrit). Le gène codant la protéine murine de Themis est localisé sur le chromosome 10 à la localisation A4 et le gène codant la protéine humaine de Themis est situé sur le chromosome Chr 6q22.33. Themis est très conservé au sein des différentes espèces, la protéine murine est composée de 636 acides aminés et elle possède 80% d'identité avec la protéine humaine qui est composée de 641 acides aminés. Une analyse bioinformatique prédictive de la séquence protéique des protéines Themis, Themis2 et Themis3 a identifié deux nouveaux domaines globulaires qui ont été nommés CABIT-1 et CABIT-2 (cysteine containing all beta in Themis) (Johnson et al., 2009). A ce jour, nous ne connaissons ni la structure ni la fonction de ces domaines mais l'alignement multiple de séquences prédit que les domaines CABIT forment une structure globulaire composée de 12 feuillets β . De plus, il a été décrit que chaque domaine contient une cystéine centrale très conservée, elle-même incluse dans une séquence conservée : φ XCX7-26 φ XLP φ X3GXF avec X pour un acide aminé aléatoire et φ pour un résidu hydrophobe aléatoire. L'analyse de différentes séquences de gènes à partir des bases de données a révélé l'existence d'autres cadres de lecture ouverts contenant qu'un seul domaine CABIT. C'est le cas des protéines homologues GAREM1 et GAREM2 (Grb2-associated regulator of Erk/MAPK1) qui sont des adaptateurs des voies de signalisation du récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) (Taniguchi et al., 2013; Tashiro et al., 2009). En plus de ses deux domaines CABIT, Themis contient deux autres motifs très conservés. Il possède une région riche en proline PRR (prolin-rich region) : PPPRPPKxP située dans la région C-terminale qui reconnaît spécifiquement des domaines SH3 (SRC Homology 3 Domain). Et il contient une séquence de localisation nucléaire NLS (nuclear localization signal) : KR-X12-KRRPR située dans le CABIT-2 qui entraîne la localisation d'une fraction de Themis dans le noyau (figure 10).

Pour identifier le rôle de ces différents domaines dans la fonction de Themis, le développement des lymphocytes T a été analysé dans des souris Themis^{-/-} exprimant des formes de Themis mutées sur ses différentes régions. Il a été démontré dans des modèles de souris transgéniques que la délétion de la NLS, du PRR et des CABIT-1 et CABIT-2 entraîne un phénotype similaire à des souris transgéniques Themis^{-/-} non mutées sur ces domaines (Okada et al., 2014). Dans un autre modèle de souris injectées avec de la moelle osseuse infectée par des rétrovirus exprimant des formes de Themis mutées, il a été également montré que la délétion de la NLS et du PRR entraîne un phénotype similaire à des souris contrôles Themis^{-/-}. Cependant, dans des souris exprimant une forme de Themis mutée uniquement sur les cystéines conservées, le pourcentage de cellules SP n'est pas autant diminué que dans des souris Themis^{-/-}, ce qui suggère que ces cystéines ne jouent pas un rôle primordial dans la régulation de la sélection positive des lymphocytes T (Zvezdova et al., 2014).

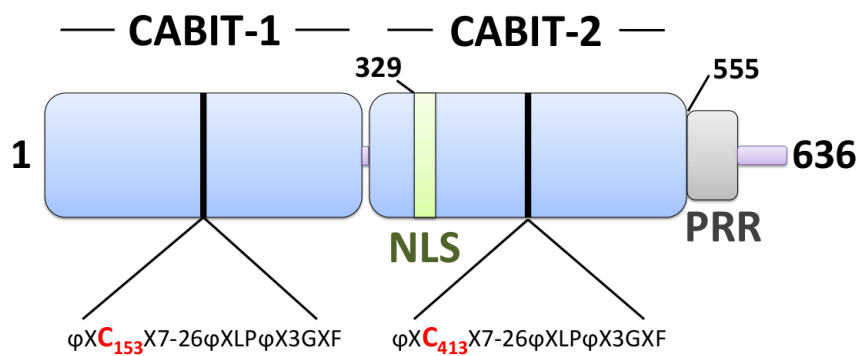


Figure 10 : Structure des protéines Themis murines.

Themis est composé de deux domaines globulaires appelés domaine CABIT (bleu) contenant chacun une cystéine centrale conservée (rouge) incluse dans une séquence également très conservée. Themis contient dans sa région carboxy terminale une région riche en proline PRR (gris) ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire NLS (vert) située dans le CABIT2. Adapté de « *Themis is a member of new metazoan gene family and is required for completion of thymocyte positive selection* », Johnson et al., *Nature Immunology*, 2009.

3 Les partenaires de Themis

Pour comprendre le rôle moléculaire de Themis durant le développement des lymphocytes T, plusieurs études ont cherché à identifier les partenaires protéiques de Themis. Initialement, Themis a été identifié comme étant un partenaire de l'adaptateur Grb2. Il est intéressant de noter que dans les souris présentant une déficience pour Grb2 dans les lymphocytes T, on observe un défaut de sélection positive et négative très similaire à celui observé dans les souris Themis^{-/-} (Jang et al., 2010). Il a été démontré que le domaine PRR de Themis lie spécifiquement le domaine SH3 C-terminal de Grb2. Cette interaction directe et constitutive permet le recrutement de Themis à l'adaptateur transmembranaire LAT durant l'engagement des TCR (Paster et al., 2013b). Il a également été démontré que Themis est rapidement phosphorylé par les kinases Lck et Zap-70 sur ses tyrosines C-terminales 542 et 543 (chez la souris) durant l'engagement des TCR (Paster et al., 2013). Cette phosphorylation est essentielle pour le recrutement de Themis à LAT et pour entraîner le développement des lymphocytes. En effet, dans des souris injectées avec de la moelle osseuse infectée par des rétrovirus exprimant des formes de Themis mutées sur ces deux tyrosines, on observe un pourcentage de cellules SP diminué par rapport à des souris contrôles (Brockmeyer et al., 2011; Paster et al., 2013b).

Une étude récente de mon équipe à laquelle j'ai participé, a permis d'identifier 42 partenaires potentiels de Themis grâce à des expériences de spectrométrie de masse dans lesquelles Themis a été immunoprécipité dans des thymocytes. Parmi les protéines qui interagissent le plus abondamment avec Themis, il a été montré que Themis interagit constitutivement avec Grb2, la phosphatase SHP-1, le facteur d'échange Vav1, l'adaptateur GADS et la protéine Lis1 (figure 11). De plus, l'engagement des TCR augmente l'interaction de Themis avec ces 5 partenaires. La stimulation des thymocytes avec du pervanadate entraîne également l'interaction de Themis avec d'autres protéines comme LAT, l'adaptateur Grap, SLP-76, l'E3 ubiquitin ligase c-Cbl et la phosphatase SHP-2 (Zvezdova et al., 2016). Il est intéressant de noter que même si une fraction de Themis est localisée dans le noyau, on ne retrouve que peu de protéines nucléaires dans ces résultats.

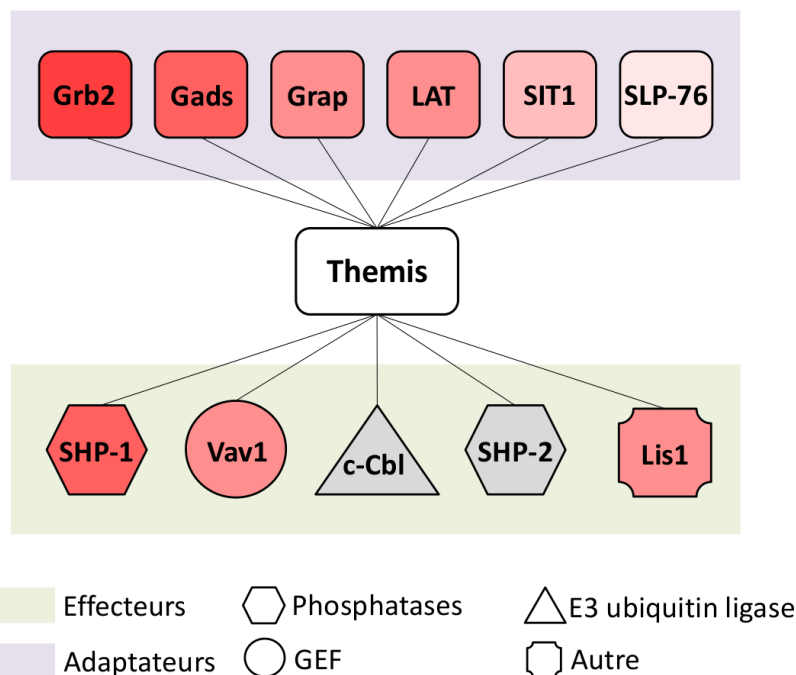


Figure 11 : Partenaires principaux de Themis dans les thymocytes.

Schéma représentant les partenaires qui se lient le plus abondamment à Themis. En rouge est représentée l'abondance d'interaction des protéines, Grb2 étant la protéine qui interagit le plus abondamment avec Themis. En violet sont représentées les protéines adaptatrices et en vert les protéines effectrices. Les formes géométriques indiquent la fonction moléculaire des protéines (phosphatases, GEF et E3 ubiquitin ligase). *Adapté de « Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability », Zvezdova and Mikolajczak et al., Science signaling, 2016.*

4 Fonction moléculaire de Themis dans les voies de signalisation des TCR

Le défaut majeur de développement des cellules T observé dans les souris Themis^{-/-} et la présence de Themis dans les complexes de signalisation précoce des TCR suggéraient un rôle primordial de Themis dans le déclenchement des voies de signalisation mobilisées par les TCR. De façon surprenante, les premières études de signalisation portant sur les thymocytes Themis^{-/-} n'ont pas révélé de déficience majeure dans la transmission des signaux déclenchés par les TCR.

4. 1 Etudes initiales de la fonction moléculaire de Themis

Plusieurs études initiales ont proposé que Themis agit comme un régulateur positif des voies de signalisation des TCR. En effet, l'expression à la surface cellulaire des corécepteurs CD5 qui sont un marqueur de la force du signal des TCR, est diminuée dans les cellules CD4⁺CD8^{int} des souris Themis^{-/-} (Lesourne et al., 2009). De plus, la sélection négative et l'engagement vers le lignage CD4⁺ SP qui nécessitent respectivement une signalisation forte et soutenue des TCR sont diminués dans les souris Themis^{-/-} (Lesourne et al., 2009 ; Fu et al., 2009). Une autre étude dans une lignée de cellules Jurkat a montré que la protéine Themis humaine régule positivement la phosphorylation d'ERK et la sécrétion d'IL-2 suite à l'engagement des TCR (Brockmeyer et al., 2011). Il a également été démontré que la phosphorylation des protéines Vav1, p38 et ERK est diminuée dans les cellules CD4⁺ SP de souris Themis^{-/-}. La surexpression de transgène codant pour Themis ou Themis2 dans des souris Themis^{-/-} restaure la phosphorylation de ces protéines, suggérant que ces deux protéines ont des fonctions moléculaires similaires (Lesourne et al., 2012). Finalement, Themis interagit avec des effecteurs positifs de la signalisation des TCR comme PLC-γ1 (Fu et al., 2009) et Vav1 (Lesourne et al., 2012) dans les thymocytes.

4.2 Etudes sur le rôle négatif de Themis dans les voies des TCR

Des travaux plus récents suggèrent, à l'inverse de ces études initiales, que Themis agit comme un régulateur négatif de la signalisation des TCR durant la sélection positive. En effet, une première étude a utilisé un modèle de souris exprimant des TCR transgéniques

OT1 capables de reconnaître des peptides modifiés de l'ovalbumine de poulet avec des affinités différentes. Ainsi, la stimulation de cellules DP exprimant les TCR OT1 par des tetramères de CMH conjugués à ces peptides permet de reproduire *in vitro* la sélection négative, en utilisant des ligands présentant une relativement forte affinité pour les TCR OT1, ou la sélection positive, en utilisant des ligands présentant une relativement faible affinité pour les TCR OT1. Ils ont observé dans les thymocytes Themis^{-/-} une augmentation du flux calcique et une augmentation de la phosphorylation d'ERK, Lck et LAT lorsque les thymocytes sont stimulés avec des ligands de faibles affinités. Ces résultats ne sont pas observés lorsque les cellules DP sont stimulées avec des ligands de forte affinité. Des expériences complémentaires ont démontré que l'absence de Themis entraîne l'entrée en apoptose des cellules DP stimulées avec des ligands de faible affinité (Fu et al., 2013). Pour expliquer ces résultats, les auteurs proposent que l'augmentation du signal observé dans les souris Themis^{-/-} entraîne une conversion de la sélection positive en sélection négative des cellules. Les auteurs suggèrent que Themis est important pour définir le seuil entre la sélection positive et la sélection négative des lymphocytes T. En effet, lors de la stimulation des TCR par des ligands de faibles affinités, Themis atténuerait les voies de signalisation des TCR durant l'étape de sélection positive afin de prévenir l'entrée en apoptose des cellules. Une autre étude a confirmé ces résultats en observant dans une lignée de cellules Jurkat que la déficience en Themis se traduit par une augmentation de la signalisation proximale des TCR après leurs stimulations (Paster et al., 2015).

Ces études ont également recherché les mécanismes moléculaires impliqués. Elles ont identifié que Themis forme un complexe avec l'adaptateur Grb2 et la phosphatase SHP-1 qui est une enzyme nécessaire à la survie des lymphocytes T matures dans le thymus. Ils ont observé que la phosphorylation de SHP-1 est diminuée dans les souris Themis^{-/-}. Ces données suggèrent que Themis inhibe la signalisation des TCR en régulant l'activité et la localisation de SHP-1. En accord avec cette hypothèse, la phosphorylation de la tyrosine active (Y505) de Lck qui est un substrat de SHP-1, est diminuée dans les souris Themis^{-/-} (Paster et al., 2015). Ce modèle propose que Themis recrute SHP-1 à la membrane près de ses substrats lors de l'engagement des TCR afin d'atténuer le signal et inhiber la mort des cellules durant l'étape de sélection positive (figure 12).

Cependant, le phénotype de souris déficientes pour SHP-1 ou exprimant des formes « dominantes négatives » de cette phosphatase ne soutiennent pas ce modèle (Carter et al., 1999; Johnson et al., 2013). En effet, le développement des lymphocytes T dans ces souris est en apparence normal dans un fond polyclonal. De plus, contrairement à ce qui est observé dans les souris Themis^{-/-}, la sélection positive et négative sont plus efficaces dans ces modèles murins. Ces résultats suggèrent que SHP-1 pourrait avoir des effets redondants avec d'autres phosphatases comme la phosphatase SHP-2 qui interagit avec Themis mais avec une plus faible abondance. Une autre hypothèse serait que la régulation de SHP-1 par Themis n'est pas le seul mécanisme permettant de réguler la sélection positive des lymphocytes T.

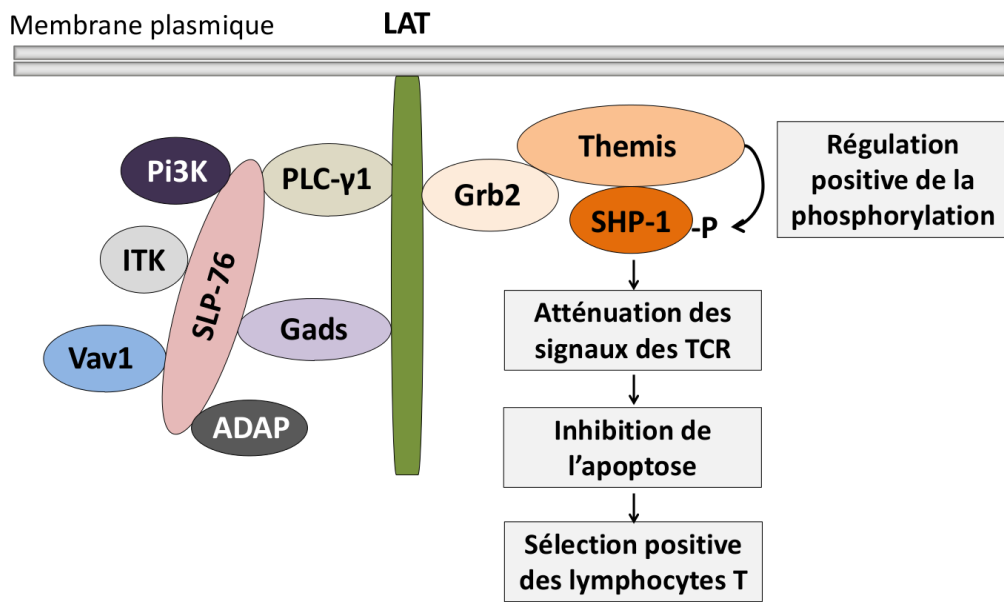


Figure 12 : Modèle de régulation de la phosphatase SHP-1 par les protéines Themis.

Ce modèle propose que Themis entraîne le recrutement de SHP-1 à l'adaptateur LAT durant l'engagement des TCR. Themis est également nécessaire pour réguler positivement la phosphorylation de SHP-1, ce qui augmente son activité phosphatase. SHP-1 est amené près de ses substrats et les déphosphoryle afin d'atténuer la force du signal induite par des ligands de faibles affinités. Cette régulation permet d'inhiber l'entrée en apoptose des cellules et donc d'inhiber leur sélection négative. Les lymphocytes T sont alors sélectionnés positivement. *Adapté de « A Themis:SHP-1 complex promotes T-cell survival », Paster et al., The EMBO journal, 2015.*

4.3 Etudes sur le rôle positif de Themis dans les voies des TCR

Afin de mieux comprendre le rôle de Themis au sein des complexes moléculaires des TCR, j'ai participé à une étude réalisée par mon équipe qui a l'inverse des résultats obtenus sur la régulation de la phosphatase SHP-1, a proposé que Themis joue un rôle positif sur les voies de signalisation des TCR durant la sélection positive des lymphocytes T (Zvezdova et al., 2016).

L'article concernant cette étude est paru dans la revue « science Signaling » en 2016. Cet article est présenté dans la partie « article 2 » de ma thèse.

CHAPITRE 4 : LES MECANISMES D'UBIQUITINATION DANS LES VOIES DE SIGNALISATION DES CELLULES IMMUNITAIRES

Les voies de signalisation des TCR doivent être régulées pour prévenir la mise en place de réponses immunitaires inappropriées. L'ubiquitination est un des processus qui entraîne l'activation, la modification ou l'inhibition des voies de signalisation des TCR. Des études concernant des pertes de fonction génétique ont montré que la dérégulation des voies d'ubiquitination entraîne un dysfonctionnement du système immunitaire. Il est devenu évident que le processus dynamique d'ubiquitination est critique pour la fonction normale des cellules du système immunitaire. Les mécanismes d'ubiquitination ainsi que leur implication dans la régulation des voies de signalisation des cellules du système immunitaire seront détaillés dans le chapitre 4 de l'introduction.

1 Le processus d'ubiquitination

C'est en 1974 que l'ubiquitine ou UBIP (ubiquitous immunopoietic polypeptide) a été découverte par l'équipe du Dr Hugh D Niall. Ils ont identifié un polypeptide de 8.5kDa capable d'induire la différenciation de cellules T et cellules B *in vitro* (Goldstein et al., 1975). En voulant comprendre par quels mécanismes l'ATP (adénosine triphosphate) participe à la dégradation des protéines, les Dr Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose ont pu caractériser en 1979 et 1980 l'ubiquitine appelée alors APF-1 (ATP-dependent proteolysis factor 1) (Ciechanover et al., 1980a; Ciechanover et al., 1980b; Hershko et al., 1980; Hershko et al., 1979). Ils ont démontré que la liaison covalente d'APF-1 sur une protéine cible conduit à sa dégradation par le protéasome de manière ATP dépendante. Ce processus s'appelle le mécanisme UPS (ubiquitin proteasome system) (Seufert and Jentsch, 1992). En 2004, ces trois docteurs ont reçu le prix Nobel de chimie pour la caractérisation de l'ubiquitine ainsi que pour de nombreux autres travaux décrivant la fonction de ce polypeptide dans la régulation du cycle cellulaire, du trafic membranaire, de la réponse immunitaire ou encore dans des processus pathologiques comme la tumorigénèse ou le développement de maladies neurodégénératives (Wilkinson, 2004).

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui entraîne la liaison covalente d'une ubiquitine ou d'une chaîne d'ubiquitine sur une protéine cible. Cette molécule est très conservée au cours de l'évolution et plus de 80% des protéines cellulaires sont soumises à ce mécanisme (Husnjak and Dikic, 2012). Grâce à une liaison isopeptidique, l'ubiquitine se lie par l'intermédiaire du résidu glycine (G76) situé à son extrémité C-terminale avec le groupe primaire amine (ϵ -amino) d'une lysine (Lys ou K) appartenant à une protéine cible. Il a également été décrit que l'ubiquitine peut se lier plus rarement à des résidus cystéines, thréonines, méthionines ou bien sérines. Lorsqu'une protéine cible accepte la liaison d'une seule molécule d'ubiquitine, on parle de mono-ubiquitination ou multimono-ubiquitination. Cependant, l'ubiquitine elle-même est capable de se lier aux lysines des autres monomères d'ubiquitine pour s'assembler et former des chaînes d'ubiquitines, on parle de poly-ubiquitination (Figure 14).

Il a été découvert que l'ubiquitine contient sept lysines qui sont elles aussi la cible d'ubiquitination, ce qui entraîne la formation de chaînes d'ubiquitines homogènes (où la même lysine est répétitivement impliquée dans l'établissement des liaisons covalentes) ou hétérogènes (où des lysines différentes sont impliquées dans la formation d'une même chaîne). De plus, le résidu méthionine (Met ou M1) situé en position N-terminale de l'ubiquitine peut également être la cible de l'ubiquitination. Il peut être ainsi formé 8 types de chaînes différentes d'ubiquitines homogènes : K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 et M1. Il peut également être formé des chaînes ramifiées où deux lysines d'une même ubiquitine sont liées par des ubiquitines différentes (Behrends and Harper, 2011) (Figure 15).

1.1 Fonction de l'ubiquitination

Les conséquences fonctionnelles de l'ubiquitination des protéines cibles sont définies par le type de chaînes d'ubiquitines qui se lie au substrat. Cependant, une même chaîne peut posséder différentes fonctions. En effet, d'autres facteurs vont entrer en jeu comme la localisation subcellulaire des substrats et des enzymes qui catalysent les réactions d'ubiquitination ou encore la spécificité d'interaction des substrats avec certains effecteurs ou avec les différentes familles d'enzymes. L'ubiquitination a pour fonction majoritaire l'adressage des protéines vers la voie de dégradation du protéasome 26S qui est une

protéinase multicatalytique. Cependant, cette modification post-traductionnelle peut également réguler l'activité enzymatique de protéine, réguler leur localisation sub-cellulaire ou encore réguler les interactions entre protéines (Komander and Rape, 2012).

Les chaînes de type K48 sont les plus abondamment exprimées dans les cellules (Peng et al., 2003). Elles sont formées d'au moins quatre molécules d'ubiquitines et ciblent les protéines mal repliées ou sénescents vers la voie de dégradation du protéasome 26S. Cette fonction de l'ubiquitination a été la première à avoir été décrite par Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose qui ont mis en évidence l'existence d'une dégradation protéique indépendante des lysosomes. Il est établi que la régulation de la liaison des chaînes de type K48 entraîne une modification des cascades de signalisation en activant la dégradation des molécules de signalisation. Par exemple, la phosphorylation d'I κ B qui est un inhibiteur de la voie NF- κ B entraîne sa liaison à des chaînes de type K48 et favorise ainsi sa dégradation par le protéasome puis la propagation du signal de cette voie de signalisation (Skaug et al., 2009).

Tous les types de chaînes d'ubiquitines peuvent avec des efficacités variables diriger les protéines cibles vers la voie de dégradation du protéasome 26S exceptées les chaînes de type K63 (Xu et al., 2009b). Ces chaînes sont bien caractérisées et elles sont le deuxième type de chaîne le plus abondant (Peng et al., 2003). Il a été démontré qu'elles possèdent des fonctions indépendantes de la dégradation par le protéasome, elles régulent l'activation de kinase, la réparation de l'ADN (acide désoxyribonucléique), le trafic et l'interaction des protéines ou encore la traduction. Par exemple, il a été démontré que l'activation de la voie NF- κ B induite par la stimulation du récepteur de l'interleukine-1 β (IL-1 β) requière l'ubiquitination par des chaînes de type K63. En effet, les chaînes K63 vont directement activer un complexe de protéines kinases TAK1 (transforming growth factor beta-activated kinase 1), TAB1 (TGF-beta activated kinase) et TAB2 et elles vont favoriser l'interaction de la protéine NEMO (NF- κ B essential modulator) avec la kinase IKK (I κ B kinase) ce qui va au final activer la voie NF- κ B (Xu et al., 2009a).

La fonction des autres types de chaînes est moins connue. Cependant, il a été démontré dans les lymphocytes T que le TCR ζ est ubiquitiné par des chaînes de type K33, ce qui inhibe

sa phosphorylation et inhibe ainsi le recrutement de la kinase Zap-70. Ce mécanisme inhibe la signalisation des TCR sans entraîner la dégradation des récepteurs favorisant ainsi la réutilisation des TCR sans dépenser de l'énergie dans sa dégradation (Huang et al., 2010; Malynn and Ma, 2010).

La mono-ubiquitination de protéines possède de nombreuses fonctions comme la régulation du trafic des protéines, la régulation de l'endocytose, de l'expression des gènes, de l'interaction entre protéines ou bien la régulation de l'activité enzymatique des protéines. Par exemple, dans les lymphocytes T, la kinase Zap-70 est mono-ubiquitinée pour inhiber son activité catalytique. L'engagement des TCR entraîne l'inhibition de la mono-ubiquitination de Zap-70, ce qui va activer cette kinase et entraîner la phosphorylation de ses substrats (Naik and Dixit, 2016).

1.2 Spécificité de l'ubiquitination

Dans la majorité des cas, l'ubiquitination des lysines présente peu de spécificité et peut donc avoir lieu sur des lysines indépendamment du contexte peptidique dans lequel ces résidus se trouvent. Ce processus peu sélectif comprend de nombreuses poly-ubiquitinations de type K48 et K11 conduisant les protéines vers la voie de dégradation du protéasome. Dans ce cas, le principal signal de dégradation est porté par la chaîne d'ubiquitine et ne nécessite pas qu'un résidu lysine particulier soit ubiquitiné. C'est le cas des protéines du cycle cellulaire p27, p21 ou des cyclines qui sont ubiquitinés sur de nombreuses lysines indépendamment de leur contexte peptidique. Cependant, dans d'autres situations, l'ubiquitination d'une lysine spécifique est requise pour que ces régulations post-traductionnelles puissent être effectives. Par exemple, les protéines PCNA (proliferating cell nuclear antigen), les histones H2A, H2B et FANCD2, FANCI (Fanconi-group protein) sont ubiquitinées sur uniquement une ou deux lysines dans les cascades de signalisation cellulaire. Dans cette situation, les enzymes ne lient pas uniquement le substrat, ils orientent l'ubiquitination vers un résidu spécifique. Il a été proposé trois cas de figures pour expliquer la spécificité de l'ubiquitination (Figure 16). Dans un cas, l'enzyme interagit avec le substrat et a accès à une large zone qui contient de nombreuses lysines, ce qui entraîne une faible spécificité d'ubiquitination (par exemple, l'enzyme SCF pour le substrat p27). Dans un autre cas,

l'enzyme a accès à une petite zone du substrat suite à des contraintes structurelles ce qui entraine une forte spécificité pour certains résidus qui seront dans la zone (par exemple, l'enzyme SCF^{β-TrCP} pour les substrats IκBα ou β-catenin). Dans le dernier cas, l'enzyme a accès à une large zone du substrat qui contient cependant peu de lysines entrainant ainsi une forte spécificité (par exemple, les substrats Rsp5 ou Sna3) (Mattioli and Sixma, 2014).

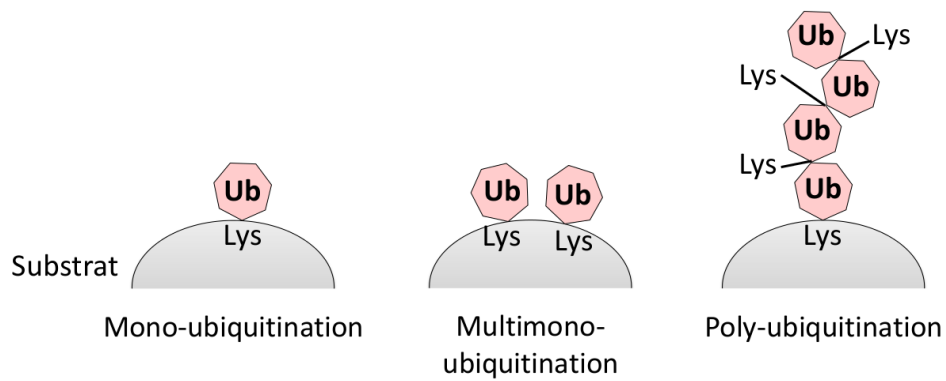


Figure 13 : Représentation schématique de la mono-ubiquitination, multimono-ubiquitination et poly-ubiquitination.

L'ubiquitination consiste en l'attachement d'un monomère d'ubiquitine sur une lysine d'une protéine cible. L'ubiquitination peut entraîner la liaison d'un seul monomère d'ubiquitine sur une protéine cible, c'est la mono ou multimono-ubiquitination. L'ubiquitination peut également favoriser la liaison d'une chaîne d'ubiquitine sur un substrat, c'est la poly-ubiquitination. *Adapté de « Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains », Behrends and Harper, Nature Structural and Molecular Biology, 2011.*

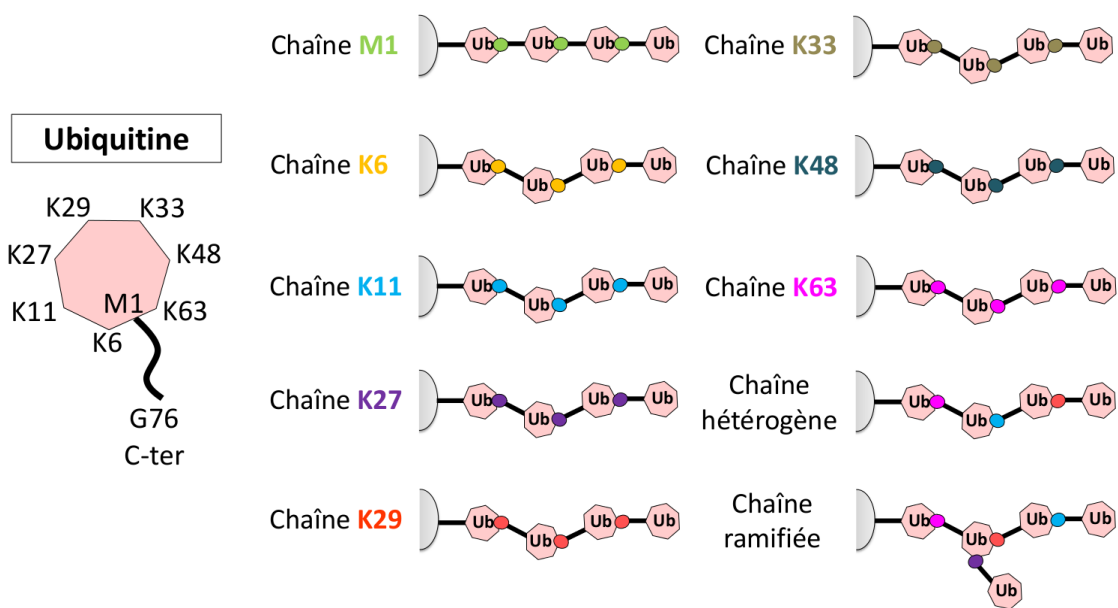


Figure 14 : Représentation schématique des différents types de chaînes d'ubiquitines.

L'ubiquitine lie sa glycine en position C-terminale (G76) sur la lysine d'une protéine cible. Les ubiquitines contiennent sept lysines qui peuvent elles mêmes être la cible d'ubiquitination. Les ubiquitines s'assemblent par l'intermédiaire de ces lysines ou par l'intermédiaire de sa méthionine (M1) pour former des chaînes d'ubiquitines. Il peut être formé 8 chaînes homogènes différentes (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63, M1), des chaînes hétérogènes ou bien des chaînes ramifiées. *Adapté de « Ubiquitin code assembly and disassembly », Heride, Urbé and Clague, Current Biology, 2014.*

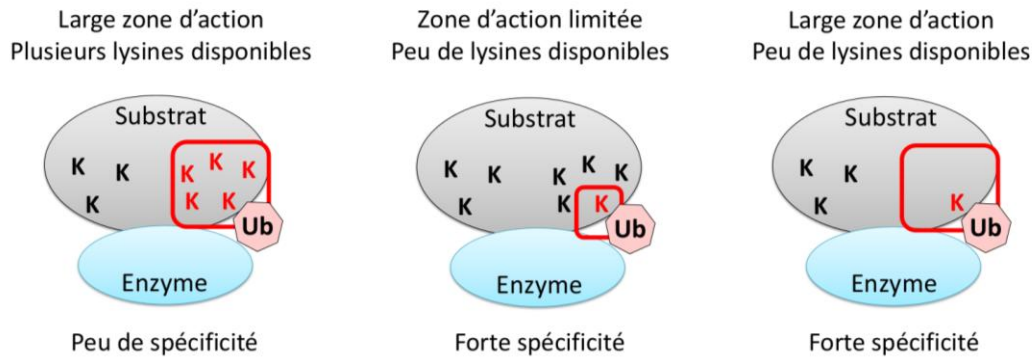


Figure 15 : Spécificité de l'ubiquitination.

Pour expliquer la spécificité de l'ubiquitination de lysines, il a été proposé que l'enzyme qui catalyse la réaction d'ubiquitination interagisse avec le substrat et ait accès à une large zone qui contient de nombreuses lysines (K). Ceci entraîne une faible spécificité d'ubiquitination car de nombreuses lysines seront ubiquitinées. Dans un autre cas, l'enzyme aurait accès à une petite zone du substrat suite à des contraintes structurelles ce qui entraîne une forte spécificité puisque seulement une ou deux lysines seront ubiquitinées. Dans le dernier cas, l'enzyme a accès à une large zone du substrat qui contient cependant peu de lysines. Ceci entraîne ainsi une forte spécificité pour une ou deux lysines. *Adapté de "Lysine-targeting specificity in ubiquitin and ubiquitin-like modification pathways", Mattioli and Sixma, Nature Structural and Molecular Biology, 2014.*

2 Mécanismes de régulation de l'ubiquitination

La réaction d'ubiquitination est un processus séquentiel en trois étapes qui met en jeu différentes enzymes. L'enzyme E1 ou UBE1 (ubiquitin-activating enzyme 1), l'enzyme E2 ou UBC (ubiquitin-conjugating enzyme 2) et l'enzyme E3 ou E3 ubiquitin ligase. A l'inverse, la déubiquitination est un mécanisme qui clive les ubiquitines des protéines cibles. C'est un processus réversible et ATP dépendant qui met en jeu des déubiquitinases (DUB) ou protéases spécifiques de l'ubiquitine.

2.1 L'enzyme d'activation E1

La première étape de l'ubiquitination est l'activation de l'ubiquitine par l'enzyme E1. L'ubiquitine va lier un ATP pour former un intermédiaire ubiquitine-adénylate qui va se lier à l'enzyme E1. Cette enzyme va parallèlement lier un ATP, ce qui entraîne un changement conformationnel et une meilleure affinité de l'enzyme E1 pour l'ubiquitine. La glycine (G76) en position C-terminale de l'ubiquitine est ensuite activée par l'enzyme E1 grâce à une attaque nucléophile effectuée par l'atome soufre de la cystéine du site actif de l'enzyme E1. Ce processus ATP-dépendant entraîne la formation d'une liaison thioester entre la glycine G76 et la cystéine du site actif de l'enzyme E1. Chaque enzyme active E1 est capable de lier deux molécules d'ubiquitines, une avec une liaison thioester et une autre avec une liaison adénylate favorisant ainsi la liaison et l'activation des ubiquitines de manière séquentielle (Haas et al., 1982; Scheffner et al., 1995).

Durant de nombreuses années, l'enzyme E1 ou UBE1 a longtemps été considérée comme étant unique. Cependant, il a été découvert d'autres molécules possédant la même fonction que cette enzyme : UBA6 (ubiquitin-like modifier activating enzyme 6) et UBE1L2 (ubiquitin-activating E1-Like protein 2) (Groettrup et al., 2008; Pelzer et al., 2007).

2.2 L'enzyme de conjugaison E2

Des études *in silico* ont recensées environ 40 enzymes E2 ou UBC et des analyses phylogénétiques ont classé ces enzymes en 17 sous-familles (Michelle et al., 2009). Toutes

les E2 partagent un motif catalytique conservé d'environ 150 acides aminés appelé domaine UBC (ubiquitin conjugating domain) qui possède une cystéine sur laquelle se lie la molécule d'ubiquitine. Les enzymes E2 diffèrent entre elles au niveau de leurs extensions N- et C-terminales, ce qui module leur activité intrinsèque ou qui détermine leur spécificité d'interaction avec les différentes enzymes E3 ou avec les substrats. L'association des E2 avec des cofacteurs influence également leur localisation, leur activité et leur spécificité (Ye and Rape, 2009). Les enzymes E2 vont lier l'ubiquitine précédemment activée au niveau de leur cystéine située dans le domaine UBC formant ainsi une liaison thioester. Dans certaines conditions (décrites dans la partie suivante) l'ubiquitine peut être transférée directement à une lysine d'un substrat ou bien à une lysine d'une ubiquitine entraînant la formation de chaînes d'ubiquitines. Enfin, ce sont ces enzymes qui sélectionnent le type de chaîne d'ubiquitine qui va être lié au substrat (Pickart, 2001).

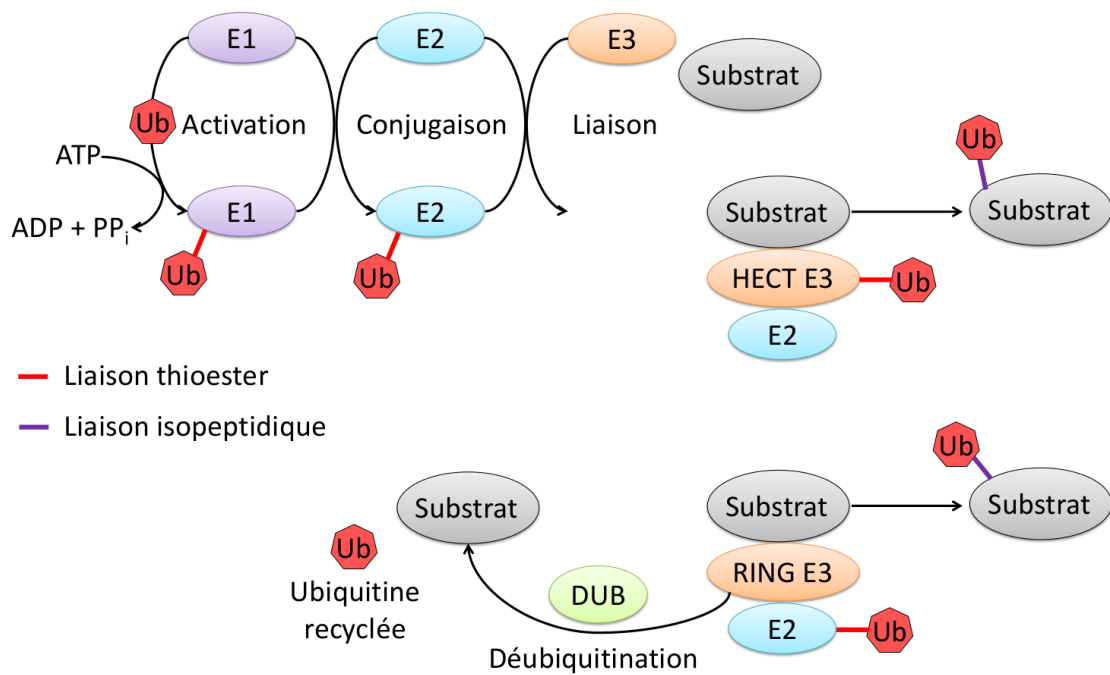


Figure 16 : Cascade de liaison de l'ubiquitine.

L'ubiquitine est activée par l'enzyme d'activation E1 de manière ATP dépendante et se lie à la cystéine active de l'enzyme E1 par une liaison thioester. L'ubiquitine est ensuite transférée à une enzyme de conjugaison E2 et se lie également à la cystéine de cette enzyme. L'enzyme E2 va interagir avec une ligase E3 qui a pour rôle d'amener le substrat dans ce complexe. Enfin, l'enzyme E2 va soit directement lier l'ubiquitine sur le substrat dans le cas où la ligase est de la famille des RING soit transférer l'ubiquitine sur une enzyme E3 de la famille des HECT qui liera l'ubiquitine sur le substrat par la suite. Les ubiquitines sont clivées des substrats par une déubiquitinase (DUB), ce qui entraîne le recyclage de la molécule. *Adapté de « Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions », Husnjak and Dikic, Annual Review of Biochemistry, 2012.*

2.3 Les ligases E3

Des études bioinformatiques ont démontré qu'il existe plus de 700 enzymes E3 ligases pouvant interagir avec les différentes enzymes E2 et les substrats. Les enzymes E3 ont été décrites comme étant des passerelles entre les enzymes E2 et les substrats. Ce sont ces enzymes qui vont sélectionner une protéine cible et cette interaction peut être modulée par des modifications post traductionnelles comme la phosphorylation sur sérines ou tyrosines ou encore la glycosylation (Pickart, 2004). La ligase E3 va donc d'une part interagir avec le substrat suite à un signal d'ubiquitination puis favoriser la liaison isopeptidique de l'ubiquitine sur le substrat (Ye and Rape, 2009). Cette catégorie d'enzyme est classée en deux grandes familles : les HECT (homologous to the E6-AP carboxy terminus) et les RING (really interesting new gene). D'autres types d'E3 ont été plus récemment découvertes : les ligases de la famille U-Box, RBR (RING-in-between-RING) ou BTB (bric-a-brac, tramtrack, broad complex) (Patterson, 2002; Pintard et al., 2004; Spratt et al., 2014).

2.3.1 Spécificité et fonction des HECT

Il existe une trentaine de membres de ligases de la famille des HECT classés suivant l'architecture de leur domaine N-terminal qui est variable. Il existe trois groupes de HECT : la famille Nedd4 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4) (neuf membres), la famille HERC (HECT domain and RCC domain) (six membres) et la famille des autres HECT. Le domaine N-terminal interagit avec le substrat et détermine selon sa structure la spécificité d'interaction avec la protéine cible. Ces enzymes possèdent toutes un domaine HECT carboxy-terminal d'environ 350 acides aminés partagé en deux lobes : un lobe N-terminal (N-lobe) qui interagit avec l'enzyme E2 et un lobe C-terminal (C-lobe) qui contient un site actif contenant une cystéine qui va former une liaison thioester avec l'ubiquitine. Durant l'ubiquitination des protéines, l'ubiquitine est transférée de l'enzyme E2 à la cystéine catalytique de l'enzyme E3. Cette enzyme va par la suite transférer l'ubiquitine sur le substrat ou à une autre ubiquitine liée au substrat pour former des chaînes. Ce mécanisme est spécifique de cette famille.

Pour la majorité des HECT, la reconnaissance du substrat est déterminée par un autre domaine que le domaine catalytique HECT. La spécificité d'interaction avec un substrat peut être également déterminée par des partenaires additionnels qui entraînent le recrutement de cette ligase au substrat. Les HECT sont capables d'une part de sélectionner une lysine cible sur un substrat et d'autre part de sélectionner un type d'ubiquitination. Par exemple, la ligase Rsp5 lie des chaînes K63 uniquement sur la lysine K125 de la protéine transmembranaire Sna3, ce qui est dépendant d'un autre domaine que le domaine HECT (Stawiecka-Mirota et al., 2007). La spécificité de reconnaissance des substrats et des lysines pour cette famille de ligase n'est pas complètement élucidée.

Les HECT possèdent de nombreuses fonctions comme la régulation du trafic cellulaire, des réponses immunitaires ou encore de certaines voies de signalisation (Rotin and Kumar, 2009). L'enzyme E3 Itch (E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog) de la famille Nedd4 joue de nombreuses fonctions dans la régulation des réponses immunitaires (Aki et al., 2015). Par exemple, l'engagement des TCR stimule l'interaction d'Itch avec MEK/ERK kinase 1 (MEEK1) de la voie MAPK et stimule sa phosphorylation par la kinase JNK. Cette phosphorylation active la ligase qui régule négativement le facteur de transcription JunB en entraînant son ubiquitination et sa dégradation (Enzler et al., 2009). De plus, Itch entraîne l'ubiquitination et la dégradation de Bcl-10 (B-cell lymphoma 10) qui est un régulateur positif de l'activation de NF- κ B durant la stimulation des TCR. En parallèle, la ligase Nedd4 dégrade également Bcl-10 ce qui témoigne d'une redondance entre ces deux enzymes (Scharschmidt et al., 2004). La ligase Itch entraîne également l'ubiquitination du TCR ζ par les chaînes K33 pour inhiber sa phosphorylation et le recrutement de la kinase Zap-70 (Huang et al., 2010). En résumé, Itch régule négativement les voies de signalisation des TCR en favorisant la dégradation de molécule de signalisation ou en inhibant les interactions entre ces molécules. Il y a d'autres exemples de ligase de la famille des HECT qui régule les réponses immunitaires comme les ligases SMURFS (Smad ubiquitin regulatory factors) qui régulent la voie du TGF- β (Transforming growth factor- β) (Liu, 2004).

2.3.2 Spécificité et fonction des RING

Il existe plus de 600 membres de la famille des RING qui constituent la famille des E3 ligases la plus grande chez l'Homme. Elles partagent toutes un domaine catalytique conservé de 40 à 60 résidus qui est caractérisé par un domaine RING (really interesting new gene) contenant un motif riche en cystéines. Contrairement aux ligases de la famille des HECT qui lient les ubiquitines, les ligases RING servent uniquement de passerelle et entraînent le transfert de l'ubiquitine liée par l'enzyme E2 directement sur le substrat. Les ligases RING fonctionnent sous forme de monomère ou de complexe multi-protéique. Elles peuvent se dimériser grâce à leur domaine RING pour former des homodimères ou des hétérodimères. Les ligases des homodimères peuvent toutes les deux interagir avec les enzymes E2 alors que pour les hétérodimères une des deux enzymes sert d'adaptateur et de stabilisateur du complexe multi-protéique (Metzger et al., 2014).

La plupart des ligases RING ne sont pas spécifiques de lysines en particulier. Elles entraînent la liaison de chaînes de poly-ubiquitines qui sont suffisantes pour donner un signal de dégradation. D'autres enzymes sont plutôt spécifiques d'une zone du substrat plutôt que d'une lysine. C'est le cas de la ligase c-Cbl (casitas B-lineage lymphoma) exprimée spécifiquement dans les lymphocytes T qui favorise la fixation de plusieurs mono-ubiquitines sur différents sites de liaison entraînant l'internalisation de récepteurs tyrosine kinase (Haglund et al., 2003). Pour d'autres ligases de la famille RING, la reconnaissance du substrat est contrôlée par un domaine de l'enzyme qui est différent du domaine catalytique RING. En effet, PCNA est mono-ubiquitinée uniquement sur la lysine K164 par la ligase RAD18 dont le domaine RING ne suffit pas pour catalyser la réaction d'ubiquitination. A l'inverse, le domaine catalytique RING de certaines ligases est suffisant pour ubiquitiner un substrat. L'histone H2A au sein des nucléosomes est mono-ubiquitinée uniquement sur le résidu K119 par la ligase PRC1 (polycomb repressive complex 1) dont le domaine RING isolé est capable d'ubiquitiner le substrat (Cao et al., 2005).

Les ligases RING sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, notamment la régulation des voies de signalisation des TCR. Parmi ces enzymes, les ligases c-Cbl et Cbl-b ont été décrites comme régulant négativement la signalisation des TCR. Elles sont

exclusivement exprimées dans les lymphocytes T : c-Cbl durant le développement de ces cellules et Cbl-b à partir de la fin du développement. Grâce à des études dans des souris c-Cbl^{-/-}, il a été démontré que cette ligase régule négativement la sélection positive des lymphocytes T (Naramura et al., 1998). Suite à la stimulation des TCR, Zap-70 sert d'adaptateur et entraîne le recrutement de c-Cbl au TCR afin que la ligase ubiquitine le TCR ζ et entraîne sa dégradation (Wang et al., 2001). De plus, c-Cbl régulerait négativement l'activité de Zap-70 puisque dans des souris c-Cbl^{-/-}, il y a une augmentation de la phosphorylation inhibitrice de Zap-70 et de la phosphorylation des substrats de Zap-70 (Murphy et al., 1998; Thien and Langdon, 1998). c-Cbl possède d'autres substrats dans les voies des TCR comme WASP qui régule la polymérisation de l'actine (Watanabe et al., 2013), p85 de la voie Pi3K/Akt (Thien et al., 2010) et CD5 qui est un corécepteur qui régule négativement la signalisation des TCR (Roa et al., 2013). Cependant, le rôle de cette ubiquitination dans la régulation du signal des TCR est moins bien décrit. En résumé, c-Cbl régule négativement les voies de signalisation des TCR afin de réguler le développement des lymphocytes T en favorisant la dégradation et l'inhibition de l'activité de molécules de signalisation clefs. D'autres ligases RING régulent les réponses des lymphocytes T comme TRIM28 (tripartite motif /RING finger, B-box and coiled-coil 28) qui est nécessaire au réarrangement du TCR α , GRAIL (gene related to anergy in lymphocytes) qui est essentiel pour induire l'anergie des cellules T, Pellino 1 qui régule négativement la voie NF- κ B durant l'engagement des TCR ou encore TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) qui est important pour induire la voie NF- κ B suite à la stimulation des TCR (O'Leary et al., 2015).

2.3.3 Fonction des U-Box

Il existe 6 ligases U-box qui ont été identifiées et qui représentent 3% à 4% des enzymes E3 chez l'Homme. Le domaine U-box de cette famille présente de fortes similarités avec le domaine RING et il est possible que ces deux familles possèdent des conséquences fonctionnelles proches (Patterson, 2002). Dans les lymphocytes T, il a été démontré que la ligase Stub1 ubiquitine et diminue l'expression du facteur de transcription FoxP3 suite à la stimulation des TCR. Cette dégradation entraîne la diminution du développement des lymphocytes T régulateurs qui sont une sous population de lymphocytes T possédant une action immunosuppressive (Chen et al., 2013).

2.4 Les déubiquitines ou déubiquitines ligases (DUB)

L'ubiquitination est un processus réversible grâce au clivage par des DUB du groupe carbonyle du résidu glycine 76 des ubiquitines. La plupart des DUB ont une conformation inactive lorsqu'elles ne sont pas liées au substrat. Lorsque ces enzymes interagissent avec les substrats, elles s'activent et hydrolysent les liaisons isopeptidiques entre l'ubiquitine et le substrat ou entre les ubiquitines liées entre elles pour former des chaînes. Les DUB peuvent cliver la dernière ubiquitine d'une chaîne ou bien cliver à l'intérieur de la chaîne. Les DUB peuvent également cliver la chaîne d'ubiquitine entière en une fois. Il est également possible que les DUB laissent uniquement une ubiquitine sur le substrat pour que celui-ci soit mono-ubiquitiné (Amerik and Hochstrasser, 2004) (Figure 17).

Les DUB sont classées en six familles suivant la structure de leur domaine catalytique : les USP (ubiquitin specific proteases) qui est la famille la plus vaste chez l'Homme avec 55 membres, les OTU (ovarian tumour proteases), les MCPIP (monocyte chemotactic protein-induced protein), les MJD (Machado-Joseph disease protein domain protéases), les JAMM (JAB1/MPN/Mov37 metalloproteases) et les UCH (Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase). Toutes ces familles de DUB sont des cystéines protéases à l'exception des JAMM qui sont des zinc-métalloprotéases (Nijman et al., 2005).

2.4.1 Spécificité des DUB

Il a été dénombré 90 gènes chez l'Homme codant des protéases spécifiques de l'ubiquitine. Cependant, les ligases E3 seraient environ 700 et les substrats en plus grand nombre sûrement (il a été estimé environ 5000 protéines ubiquitinées), ce qui pose la question de la spécificité des DUB pour les substrats (Bhowmick et al., 2013). Ces enzymes sont spécifiques à la fois pour le type de chaînes d'ubiquitines liées et à la fois pour le substrat ubiquitiné. Il est possible que ce soit la combinaison de la reconnaissance de la cible et la reconnaissance de l'ubiquitination qui confère la spécificité d'action de chaque DUB. D'autres mécanismes, comme la localisation et l'interaction avec des partenaires peuvent également définir la spécificité d'une DUB.

Concernant la spécificité d'une DUB pour un substrat, ces enzymes reconnaissent probablement les protéines cibles grâce à des séquences hors de leur domaine catalytique. Par exemple, l'interaction entre la DUB CYLD avec son substrat NEMO est régulée par un des domaines CAP-Gly de l'enzyme (Saito et al., 2004). De plus, il a été montré chez la levure que la spécificité de la DUB Ubp2 pour son substrat était strictement dépendante de la présence de la ligase E3 Rsp5 (Kee et al., 2005). La présence au sein d'un même complexe de la DUB et de la ligase E3 peut ainsi être un moyen de spécifier le substrat et son ubiquitination.

Concernant la spécificité d'une DUB pour un type de chaîne, il a été suggéré que certaines DUBs clivent spécifiquement certaines chaînes en reconnaissant la conformation des chaînes. En effet, selon leur branchement, les chaînes d'ubiquitines diffèrent dans leur conformation (Varadan et al., 2004). Par exemple, les chaînes de type K48 adoptent une conformation refermée et compacte, alors que les chaînes de type K63 et M1 sont plus étendues (Komander et al., 2009b). Il a été démontré que la DUB endosomale AMSH de la famille des JAMM hydrolyse les chaînes d'ubiquitine K63 mais pas les K48 *in vitro* (McCullough et al., 2006). De plus, la spécificité d'une DUB n'est pas restreinte à sa famille. Certaines DUB d'une même famille vont cliver un type de chaîne en particulier alors que les autres vont cliver n'importe quel type de chaîne. Par exemple, USP8 hydrolyse indifféremment les chaînes K48 et K63 *in vitro*, alors que USP14 semble spécifique des chaînes K48 (Hu et al., 2005; Row et al., 2006).

Par ailleurs, les domaines non catalytiques des DUB participent à la reconnaissance de chaînes d'ubiquitines spécifiques ou interfèrent avec l'efficacité enzymatique. Il a été montré que deux isoformes de USP2, une forme sauvage et une forme tronquée qui ne possèdent que son « cœur » catalytique, étaient toutes les deux capables de cliver à la fois les chaînes K48 et les chaînes M1 mais avec des efficacités très différentes. Le « cœur » catalytique clive préférentiellement les chaînes M1, alors que la forme sauvage est plus efficace pour les chaînes K48 (Lin et al., 2001). Ces résultats suggèrent que des séquences hors du domaine catalytique participe à la spécificité de reconnaissance des chaînes d'ubiquitines. De plus, les DUBs peuvent contenir des domaines UBDs (Ubiquitin Binding Domain) qui vont se lier directement aux ubiquitines. Ces domaines ne reconnaissent que

des protéines associées à de nombreuses ubiquitines, ce qui participe à la spécificité d'une DUB (Grabbe and Dikic, 2009).

Finalement, suivant leur structure, les DUB vont cliver à l'extérieur de la chaîne d'ubiquitines ou bien à l'intérieure. Par exemple, USP14 possède un domaine Finger en contact avec 40% du domaine C-terminal de l'ubiquitine située en bout de chaîne, ce qui rend inaccessible l'intérieure de la chaîne (Komander et al., 2009a).

2.4.2 Fonction des DUB

Les fonctions des DUB dans la régulation des cellules du système immunitaire sont nombreuses. Différentes DUB de la famille USP ont été décrites comme régulant la signalisation des TCR comme USP9X, USP15, USP34, USP12 et USP7. USP9X est fortement exprimé dans le thymus et la rate chez la souris, ce qui suggère un rôle de cette DUB dans les lymphocytes T. Une étude utilisant des souris dans lesquelles le gène codant pour USP9X a été excisé spécifiquement dans les lymphocytes T ou les cellules hématopoïétiques a démontré que l'engagement des TCR entraîne un défaut de la phosphorylation de molécules des TCR comme PLC- γ 1 et LAT. Ils ont également proposé que le défaut de signalisation des TCR qu'ils observent dans les souris USP9X^{-/-} entraîne un défaut de sélection négative et le développement d'une pathologie auto-immune de type lupus (Naik et al., 2014). Une étude plus récente a démontré qu'USP9X clive les ubiquitines liées à Zap-70 afin d'activer cette kinase et entraîner la phosphorylation de ses substrats comme LAT ou PLC- γ 1 (Naik and Dixit, 2016). D'autre part, USP15 est également fortement exprimé dans les lymphocytes T. Il a été démontré qu'USP15 déubiquitine MDM2 (mouse double minute 2 homolog) qui est une ligase qui ubiquitine et dégrade le facteur de transcription p53. La déubiquitination de MDM2 entraîne la stabilisation de l'expression de cette ligase qui peut ainsi ubiquitiner ses substrats afin de réguler négativement la sécrétion d'interleukine-2 (Il-2) et interféron- γ (IFN- γ) qui participe à l'élimination de pathogènes et de tumeurs (Zou et al., 2014). Il a été montré dans une autre étude qu'USP34 stabilise l'expression du facteur inhibiteur I κ B α , entraînant la régulation négative de la voie NF- κ B durant l'engagement des TCR (Poalas et al., 2013). Une autre étude, décrit qu'USP12 déubiquitine LAT durant la stimulation des TCR pour prévenir sa dégradation par les lysosomes, entraînant le maintien des complexes de

signalisation proximaux des TCR (Jahan et al., 2016). Enfin, il a été montré qu'USP7 clive les ubiquitines du facteur de transcription FoxP3 afin de stabiliser son expression, favorisant le développement de lymphocytes T régulateurs (van Loosdregt et al., 2013).

D'autres familles de DUB régulent les voies de signalisation des TCR. Par exemple, Otud7b (OTU domain-containing protein 7b) de la famille OTU, régule positivement la signalisation des TCR. Il a été démontré dans des souris *Otud7b^{-/-}* que cette DUB interagit avec Zap-70 pour cliver les ubiquitines de cette kinase afin d'entraîner son activation et par conséquent la phosphorylation des substrats de Zap-70 (Hu et al., 2016).

Ces études démontrent que les DUB déubiquitinent des molécules de signalisation des TCR pour réguler leur activité et leur expression. Il est également suggéré que l'on retrouve des redondances de fonction comme par exemple les DUB USP9X et Otud7b qui déubiquitinent Zap-70 pour entraîner son activation.

OBJECTIFS DE LA THESE

Nous avons observé que les niveaux d'expression des ARNm codant Themis sont diminués dans les stades précoces de la sélection positive alors que les niveaux d'expression des protéines sont parallèlement augmentés. De plus, nous avons montré que Themis est ubiquitiné dans les thymocytes. Ces résultats suggèrent que des modifications post-traductionnelles stabilisent l'expression de Themis pour réguler sa fonction durant le développement des cellules T. Les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'ubiquitination de Themis et les conséquences fonctionnelles de cette modification sur le développement des cellules T sont inconnus. Les objectifs de ma thèse étaient de caractériser les processus d'ubiquitination qui régulent Themis et de déterminer comment cette modification affecte la fonction de Themis durant le développement des lymphocytes T.

RESULTATS

Article 1: Grb2-mediated recruitment of USP9X to LAT enhances Themis stability following thymic selection

Themis est une protéine de signalisation des TCR des lymphocytes T essentielle pour l'étape de sélection positive et le choix de lignage en cellules CD4⁺ SP. Nous avons observé que l'expression des ARNm codant Themis est diminuée dans les cellules DP engagées dans la sélection positive alors que l'expression des protéines est parallèlement augmentée dans ces cellules. Ces résultats suggèrent que l'expression de Themis est stabilisée par des modifications post-traductionnelles durant le développement des lymphocytes T. Nous avons également montré que Themis est ubiquitiné dans les thymocytes. Cette modification post-traductionnelle qui est régulée par des déubiquitinases et des E3 ligases, joue un rôle important dans l'adressage des protéines vers la voie de dégradation par le protéasome. De plus, j'ai participé à une étude réalisée par mon équipe qui a identifiée que Themis interagit avec deux déubiquitinases dans les thymocytes, USP9X et USP19 (article 2), suggérant que ces enzymes clivent les chaînes d'ubiquitines liées à Themis pour stabiliser son expression.

Les objectifs de ma thèse étaient de caractériser les processus d'ubiquitination qui régulent Themis et de déterminer comment cette modification affecte la fonction de Themis durant le développement des lymphocytes T.

Nous avons comparé les niveaux d'expression des protéines et des ARNm codant Themis dans les différents stades de développement des lymphocytes T. Alors que l'expression des ARNm codant pour Themis diminue dans les stades précoces de la sélection positive, son expression protéique est parallèlement augmentée. De plus, nous avons montré dans des modèles murins de sélection positive dans lesquels les thymocytes expriment des TCR transgéniques spécifiques de l'ovalbumine que l'expression de Themis est augmentée dans les cellules DP sélectionnées positivement par rapport à des cellules DP non engagées dans cette étape. Nos résultats suggèrent que l'expression de Themis est stabilisée par des modifications post-traductionnelles durant le développement des lymphocytes T.

Pour identifier le rôle des déubiquitinasés dans la régulation de l'expression de Themis, nous avons incubé des thymocytes avec un inhibiteur de déubiquitinasés, ce qui entraîne une forte diminution de l'expression de Themis. Ces résultats montrent que l'expression de Themis est stabilisée par des déubiquitinasés. Nous avons montré que Themis interagit avec deux déubiquitinasés, USP9X et USP19. Comme USP9X est décrit comme un régulateur positif de la signalisation des TCR dans les thymocytes, nous avons utilisé des souris dont le gène codant USP9X est excisé spécifiquement dans les cellules T pour étudier le rôle de cette enzyme sur la fonction de Themis. Nous avons montré que la stimulation des TCR avec des anticorps anti-TCR et anti-CD4 diminue l'ubiquitination de Themis alors que la délétion d'USP9X entraîne une augmentation de cette ubiquitination dans les mêmes conditions. De plus, l'expression protéique de Themis contrairement à l'expression des ARNm codant Themis, est diminuée dans les cellules DP de souris USP9X^{-/-}, ce qui est exacerbée dans les cellules SP sélectionnées positivement. Ces résultats suggèrent qu'USP9X déubiquitine Themis pour stabiliser son expression durant la stimulation des TCR.

Nous avons par la suite recherché les mécanismes par lesquels USP9X régule l'expression de Themis durant l'engagement des TCR. Nous avons déterminé qu'USP9X interagit directement avec le domaine CABIT N-terminal de Themis et indirectement avec Grb2, un adaptateur important pour le recrutement de Themis à l'adaptateur transmembranaire LAT. De plus, le recrutement d'USP9X à LAT est diminué dans les thymocytes de souris Grb2^{+/-}, supportant l'hypothèse selon laquelle Grb2 facilite l'activation d'USP9X pour stabiliser l'expression de Themis durant l'engagement des TCR. En accord avec ce modèle, nous avons montré que l'expression de Themis, contrairement à l'expression des ARNm codant Themis, est diminuée dans des souris Grb2^{+/-}. De plus, l'ubiquitination de Themis est augmentée dans les souris Grb2^{+/-} suite à l'engagement des TCR. Nous proposons qu'USP9X soit activé durant l'engagement des TCR grâce à son recrutement dans les complexes proximaux des TCR par l'intermédiaire de Grb2 et Themis, entraînant la déubiquitination et la stabilisation de l'expression de T.

Nous pensons que ce mécanisme est important pour maintenir l'expression de Themis durant la sélection positive et le choix de lignage des lymphocytes T afin de favoriser l'induction d'un signal des TCR persistant, requis pour l'efficacité de ces processus.

**Grb2-mediated recruitment of USP9X to LAT enhances Themis stability
following thymic selection**

Anne Garreau¹, Gaëtan Blaize¹, Nelly Rouquié¹, Audrey Tourdès¹, Stephen A. Wood²,
Abdelhadi Saoudi¹, Renaud Lesourne^{1†}

¹Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Université de Toulouse, Centre National
de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UPS,
31024, Toulouse, France.

²Griffith Institute for Drug Discovery, Griffith University 4111, Brisbane, Australia

[†]To whom correspondence should be addressed.

Email: renaud.lesourne@inserm.fr

Abstract

Themis is a new component of the T cell receptor (TCR) signaling machinery that plays a critical role during T cell development. The positive selection of immature CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) thymocytes and their commitment to the CD4⁺CD8⁻ single positive (SP) stage are impaired in *Themis*^{-/-} mice suggesting that Themis might be important to sustain TCR signals during these key developmental processes. However, the analysis of Themis mRNA levels revealed that *Themis* gene expression is rapidly extinguished during positive selection. We show here that Themis protein expression is increased in DP thymocytes undergoing positive selection and sustained in immature SP thymocytes despite the strong decrease of Themis mRNA levels in these subsets. We found that Themis stability is controlled by the ubiquitin specific protease, USP9X, which removes ubiquitin K48-linked chains on Themis following TCR engagement. Biochemical analyses indicate that USP9X binds directly to the N-terminal CABIT domain of Themis and indirectly to the adaptor protein Grb2, the latter interaction enabling recruitment of Themis/USP9X complexes to LAT thereby sustaining Themis expression following positive selection. Together, these data suggest that TCR-mediated signals enhance Themis stability upon T cell development and identify USP9X as a key regulator of Themis protein turnover.

Introduction

The selection of thymocytes that express a functional self-tolerant T cell antigen receptor (TCR) and the commitment of immature CD4⁺CD8⁺ thymocytes [referred to as double-positive (DP) thymocytes] to the CD4⁺ or the CD8⁺ T cell lineages constitute two major decision checkpoints during T cell development (1). The affinities of TCRs for self-peptides bound to the major histocompatibility complex (self-pMHC) determine the fate of T cells during selection in the thymus. Thymocytes that express TCRs that bind with high affinity to self-pMHC are negatively selected and are triggered to undergo apoptotic cell death, whereas thymocytes that express TCRs that bind with low affinity to self-pMHC are positively selected and become CD4 or CD8 single-positive (SP) thymocytes according to the MHC-class restriction of their TCRs (2).

The fate of thymocytes during these processes is dependent upon signals transmitted by the TCR and by co-receptors such as CD4 and CD8 that bind together with the TCR to self-pMHC. The strength of TCR-self-pMHC interaction and the differential kinetics of CD4 and CD8 surface expression during the transition from the DP to the SP stages govern the intensity and the duration of TCR signals, which in turn dictate distinct developmental outcomes (3). Whereas positive selection and CD4 lineage commitment are promoted by sustained or repeated TCR signaling waves (4-7), negative selection and CD8 lineage commitment are preferentially induced by short-lived or interrupted TCR signaling events, respectively (5, 8, 9).

Signals triggered by TCRs and co-receptors propagate through a complex network of intracellular signaling proteins that exhibit enhancing or inhibitory functions. TCR

engagement by pMHC leads to the activation of the protein tyrosine kinases (PTK) Lck and ZAP-70, which phosphorylate the transmembrane adaptor protein LAT on multiple tyrosine residues (10). Phosphorylated LAT proteins serve as a docking sites for cytosolic adaptors, such as Grb2, GADS and SLP76, that enable the recruitment of effectors proteins, such as PLC γ 1, Vav1 and Itk, which in turn trigger distinct signaling pathways important for the regulation of T cell development (11). Inhibitory proteins such as the protein tyrosine phosphatase (PTP) SHP-1, function to attenuate or interrupt TCR-mediated signals, according to the strength of TCR-pMHC interactions (12-14).

Themis is a recently identified TCR signaling protein that has an important role during T cell development (15-17). Themis contains a proline rich C-terminal sequence (PRS), which binds to the adaptor protein Grb2 (18, 19), and two globular Cysteine-containing All Beta in Themis (CABIT) domains (16). Themis is recruited to LAT through Grb2 following TCR engagement (20). Although the molecular function of Themis has long remained elusive, it was shown recently that Themis enhances TCR signaling in thymocytes by blocking the inhibitory activity of SHP-1 (21) (Choi et al., 2017, in press in Nature Immunology). This action is mediated by the CABIT domains of Themis, which bind to the phosphatase domain of SHP-1 and promote or stabilize the oxidation of the SHP-1 catalytic cysteine (Choi et al., 2017, in press in Nature Immunology).

The phenotype of *Themis*^{-/-} mice shows that Themis is essential for the positive selection of DP thymocytes (15-17) and for their commitment to the CD4 lineage (17), suggesting that Themis might be important to perpetuate and sustain TCR signals during these steps of T cell development. However, previous studies reported that the transcription of the gene

encoding for Themis is strongly down regulated in DP cells at the early stages of positive selection (15, 16). We show here that, despite the strong down regulation of Themis mRNA, the amount of Themis protein increases following positive selection. We found that Themis stability is controlled by the ubiquitin-specific protease, USP9X, which removes K48-linked ubiquitin chains on Themis following TCR engagement. Biochemical analyses reveal that USP9X binds directly to the N-terminal CABIT domain of Themis. Using Grb2-deficient thymocytes, we show that Grb2 promotes the recruitment of Themis/USP9X to LAT, which stabilizes Themis expression during T cell development.

Results

Post-translational control of Themis expression during positive selection

We first compared the protein and mRNA levels of Themis in DP thymocytes, before selection (“pre-selection”, $\text{TCR}^{\text{lo}}\text{CD69}^{\text{lo}}\text{CD5}^{\text{lo}}$) or early after they were stimulated by self-pMHC ligand ($\text{TCR}^{\text{lo}}\text{CD69}^{\text{hi}}\text{CD5}^{\text{hi}}$). In accordance with previous studies (15, 16), we show that Themis mRNA levels are strongly decreased in $\text{TCR}^{\text{lo}}\text{CD69}^{\text{hi}}\text{CD5}^{\text{hi}}$ DP thymocytes as compared to that in pre-selection DP thymocytes (Fig. 1A). Unexpectedly, we found that the amount of Themis protein is increased in DP thymocytes undergoing positive selection, indicating a post-translational regulation of Themis expression (Fig. 1B). The amount of Themis protein was similarly increased in $\text{TCR}^{\text{lo}}\text{CD69}^{\text{hi}}\text{CD5}^{\text{hi}}$ DP thymocytes expressing either class I (OT-1) or class II (OT-2) restricted TCR, suggesting that the increased amount of Themis observed in these cells does not result from a shift in the TCR repertoire and is not specific to thymocytes positively selected by either MHC I or MHC II self-pMHC interactions (Fig. 1C and 1D). Further analyses at later stages of T cell development show that Themis mRNA levels are

decreased by approximately 80% in CD69^{hi} CD4 SP thymocytes as compared to that in pre-selection DP, whereas the amounts of Themis protein are similar in these two populations (Fig. 1B). Finally, Themis protein levels are decreased in mature CD69^{lo} CD4 and CD8 SP thymocytes as compared to that in pre-selection DP thymocytes, confirming the previously reported decrease of Themis protein expression in these mature thymocyte subsets (Fig. 1B).

Ubiquitin-specific proteases regulate Themis expression in thymocytes

The discrepancy between Themis mRNA and protein levels during the positive selection of DP thymocytes suggests that post-translational events might be important to stabilize Themis expression at this stage of T cell development. Ubiquitin-specific proteases (USP) remove mono- or poly-ubiquitin chains on proteins and thus enhance their stability by preventing them from degradation by the proteasome (22). Mass spectrometry analysis of proteins that co-immunoprecipitate with Themis in thymocytes led us to identify several USPs (USP9X, USP24, USP19 and USP15), among other proteins, as potential binding partners of Themis in these cells (21). To investigate the potential role of these interactions on Themis expression, we incubated thymocytes with PR619, a well-characterized inhibitor that blocks the activity of most deubiquitylating enzymes (DUB) (23). We found that thymocytes incubation with PR619 results in a rapid and dramatic decrease of Themis protein amount whereas the amount of other signaling proteins such as c-Cbl was not affected, indicating that Themis expression is highly sensitive to DUB-mediated stabilization (Fig. 2A).

We identified USP9X, but not the other USPs, as a binding partner of Themis in a yeast-two

hybrid screen using a cDNA bank of murine splenocytes (Fig. S1A). Transfection of human embryonic kidney (HEK) 293T cells with complementary DNA (cDNA) encoding tagged versions of Themis and USP9X confirmed the binding of USP9X to Themis (Fig. 2B). To investigate whether USP9X controls the stability of Themis, we analyzed Themis protein levels in thymocytes from *Usp9X^{flox/flox}* mice expressing the *Cd4-Cre* transgene, which begins to be expressed in DP thymocytes (24). We found that the amount of Themis was similar in *Usp9X^{fl/fl}* and *Usp9X^{fl/fl};Cd4-Cre* (named for simplicity *Usp9X^{+/+}* and *Usp9X^{-/-}* respectively) CD4⁻ CD8⁻ double-negative (DN) thymocytes but were decreased in *Usp9X^{-/-}* DP thymocytes (Fig. 2C and 2D). Themis protein levels were further decreased in positively selected *Usp9X^{-/-}* CD4 and CD8 SP thymocytes and in peripheral CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 2C, 2D and S1B). However, the amount of Themis remained higher in *USP9X^{-/-}* SP thymocytes in comparison to its amount in thymocytes treated with PR619 (Fig. 2A), indicating that USPs other than USP9X contribute to regulate Themis expression. Quantification of *Themis* mRNA amounts by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) showed similar expression level in *Usp9X^{+/+}* and *Usp9X^{-/-}* CD4 SP thymocytes, showing that the decreased protein abundance of Themis in *Usp9X^{-/-}* thymocytes does not result from a transcriptional defect (Fig. 2E). The adaptor protein Grb2 and the tyrosine phosphatase SHP-1, which are known binding partners of Themis, were expressed normally in *Usp9X^{-/-}* CD4 SP thymocytes, indicating a selective effect of USP9X on Themis (Fig. 2F).

USP9X promotes Themis deubiquitylation following TCR engagement

We next investigated whether Themis is directly regulated by ubiquitin-mediated modifications. Analysis of Themis in unstimulated thymocytes and in Jurkat cells transfected with cDNA encoding for tagged versions of Themis and ubiquitin showed that Themis is poly-

ubiquitylated (Fig.3A and 3B). Incubation of thymocytes with the proteasome inhibitor MG132 resulted in an increase in ubiquitylated Themis, supporting that Themis is targeted to the proteasome through ubiquitin chain modifications (Fig. 3C). We next investigated the type of linkage by which Themis-ubiquitin chains are assembled. We found that ubiquitylated Themis was recognized by ubiquitin K48 chains-specific antibodies but not by antibodies specific for ubiquitin K63 chains in freshly isolated thymocytes (Fig. 3D). Confirming these results, we found that Themis ubiquitylation was strongly reduced in Jurkat cells expressing tagged versions of ubiquitin mutated on its K48 residue (K48R) whereas it was only moderately affected in Jurkat cells expressing K63R, K29R and K33R ubiquitin mutants (Fig. 3E and Fig. S2A).

We noticed that Themis ubiquitylation was increased when thymocytes were rested for one hour in culture medium, suggesting that stimuli occurring in the thymic environment might dampen or prevent Themis ubiquitylation (Fig. S2B). We thus examined the effect of TCR cross-linking on Themis ubiquitylation and found that the amount of ubiquitylated Themis decreases following the stimulation of thymocytes or peripheral CD4⁺ T cells with anti-CD3 + anti-CD4 antibodies (Fig. 3F and S2C). By contrast, we found that Themis ubiquitylation was enhanced in *Usp9X*^{-/-} thymocytes after stimulation, suggesting that ubiquitin ligases may further ubiquitylate Themis following TCR engagement but that USP9X overcome this process by rapidly removing ubiquitin chain on Themis (Fig. 3G).

USP9X interacts directly with Themis CABIT1 domain

We next investigated the molecular mechanism by which USP9X controls Themis expression and ubiquitylation. We found that USP9X co-immunoprecipitates with Themis in unstimulated thymocytes (Fig. 4A). TCR cross-linking with anti-CD3 and anti-CD4 antibodies did not result in a significant increase of this interaction (Fig. 4A). Additionally, we found that Grb2 and Themis co-immunoprecipitate with USP9X in thymocytes (Fig. 4B). Transfection of human embryonic kidney (HEK) 293T cells with complementary DNA (cDNA) encoding tagged versions of Grb2 and USP9X confirmed the binding of USP9X to Grb2 (Fig. 4C), indicating that Grb2 and USP9X may interact in the absence of Themis. However, the co-immunoprecipitation of Grb2 with USP9X was reduced in *Themis*^{-/-} thymocytes, suggesting that part of the interaction between Grb2 and USP9X occurs through Themis in thymocytes (Fig. 4B). The mutation of Themis PRS, required for the binding of Themis to Grb2, did not prevent Themis interaction with USP9X in 293T cells, supporting a direct interaction between Themis and USP9X (Fig. 4D and 4E). Accordingly, we found that recombinant proteins of Themis and USP9X could co-precipitate in cell free assays (Fig. 4F). We next investigated whether the CABIT modules of Themis were important for its interaction with USP9X and found that the deletion of Themis CABIT1(1-260) domain, but not of its CABIT2(260-493) domain, impaired the co-immunoprecipitation of USP9X with Themis (Fig. 4D and 4E).

The adaptor protein Grb2 regulates the recruitment of Themis/USP9X complexes to LAT and enhances Themis stability

The recruitment of USP9X to LAT promotes its phosphorylation on one of its serine residue (S1600) and enhances its catalytic activity (25). Since Grb2 is important for the recruitment

of Themis to LAT, we suspected that Grb2 might also be involved in the translocation of USP9X to LAT signaling complexes through its interaction with Themis. To address this possibility, we analyzed the interaction of USP9X to LAT in thymocytes partially deficient for Grb2 (*Grb2*^{+/-}), to avoid the substantial perturbations of early TCR signaling observed in thymocytes fully deficient for Grb2 (26). We found that the amounts of LAT that co-immunoprecipitate with USP9X following TCR engagement were decreased in *Grb2*^{+/-} heterozygote thymocytes (Fig. 5A). We then analyzed Themis ubiquitylation in *Grb2*^{+/-} thymocytes, suspecting that Grb2 might be important to regulate USP9X activity and thereby to positively regulate Themis deubiquitylation. We found that the ubiquitylation of Themis was increased in *Grb2*^{+/-} thymocytes as compared to that in *Grb2*^{+/+} thymocytes when thymocytes were stimulated with anti-CD3 + anti-CD4 antibodies (Fig. 5B). Accordingly, we found that the expression levels of Themis were comparable in *Grb2*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} DN thymocytes but were decreased in *Grb2*^{+/-} DP thymocytes (Fig. 5C and 5D). The amounts of Themis protein were further decreased in SP thymocytes whereas the relative amount of Themis mRNA remained unchanged in these cells (Fig. 5C, 5D and 5E). Expression of other binding-partners of Grb2 such as Cbl or Vav1 remained unchanged in *Grb2*^{+/-} thymocytes, indicating that Grb2 selectively stabilizes Themis in thymocytes (Fig. 5F). Collectively, these results identify Grb2 as an important regulator of Themis stability that promotes the deubiquitylation of Themis by USP9X following TCR engagement.

Discussion

The strong defect of T cell development initially reported in *Themis*^{-/-} mice and the concomitant lack of clear molecular model to explain this phenotype has lead to intensive

investigations to resolve the molecular function of this protein. Recent findings suggesting that Themis enhances TCR signaling through the selective inhibition of the tyrosine phosphatase SHP-1 constitute an important breakthrough in the comprehension of this enigmatic molecule (Choi et al., 2017, in press in Nature Immunology). Although the role of Themis on TCR signaling begins to be better understood, the mechanisms that regulate Themis expression and/or function have not yet been investigated. Here we show that Themis binds to the ubiquitin-specific protease USP9X, which sustains Themis expression transiently during positive selection while the gene encoding for Themis is transcriptionally shutdown. USP9X associates with Themis/Grb2 signaling complexes and enhances Themis stability by removing K48-ubiquitin chains on Themis following TCR engagement. Our study suggests that Grb2 is not only required for the recruitment of Themis into TCR signaling complexes but also contributes to stabilize Themis expression to sustain TCR signals by recruiting USP9X to LAT where its activity is enhanced by serine-phosphorylation.

We show that Themis is ubiquitylated predominantly by K48-linked chains that have a well-established function in the targeting of proteins to proteasomes for degradation (27). Supporting this mechanism, ubiquitylated Themis accumulates when thymocytes are incubated with the proteasome inhibitor MG132. Themis ubiquitylation is detected in unstimulated thymocytes and Jurkat cells suggesting that Themis is constitutively ubiquitylated in these cells and may have a high turnover rate. These results are supported by proteomic resources obtained in Jurkat cells that identifies up to twenty-one different ubiquitylation sites on Themis (28). The mechanism that promotes Themis ubiquitylation is currently unknown. We previously used mass spectrometry to characterize the interactome of Themis in thymocytes and identified several ubiquitin-ligases such as c-Cbl, Aih2 and

Nedd4 as potential binding partners of Themis (21). The cellular levels of Themis remain unchanged in *c-Cbl*^{-/-} thymocytes (data not shown), suggesting that Aih2, Nedd4 or another ubiquitin ligase might be responsible for Themis ubiquitylation. Further experiments with Aih2- and Nedd4-deficient T cells will be required to determine whether these enzymes are involved in this process.

In this study, we show that the amount of ubiquitylated Themis is decreased following TCR cross-linking suggesting that TCR-mediated signals promote deubiquitylation and stabilization of Themis. We identified Themis as a new target for the DUB USP9X, a protein that was recently shown to positively regulate TCR signaling (29). USP9X enhances TCR signaling by removing inhibitory monoubiquitylation from ZAP70 and by preventing the sequestration of ZAP-70 in early endosomes (25). Interestingly, it was recently shown that the recruitment of USP9X to LAT induces its phosphorylation on a S1600, which enhances its catalytic activity (25); however, the mechanism of USP9X recruitment to LAT was not identified in that study. Our biochemical analysis demonstrates that USP9X binds directly to Themis, through its CABIT domains and may also directly bind to Grb2. Themis, via its PRS, binds to the C-terminal SH3 domain of Grb2 and is recruited by Grb2 to tyrosine phosphorylated LAT following TCR engagement (20). By facilitating the recruitment of Themis/USP9X complexes to LAT, Grb2 might promote activation of USP9X by serine phosphorylation which then deubiquitylates Themis. Supporting this mechanism, we found that Themis ubiquitylation is increased in *Grb2*^{+/-} thymocytes. Thus, in addition to recruiting Themis to LAT signaling complexes, Grb2 is also important for the stabilization of Themis once it becomes recruited to this transmembrane adaptor.

We show that the amounts of Themis protein are increased in DP thymocytes stimulated by self-pMHC ligand even though Themis mRNA is decreased, suggesting that positive selection signals both stabilize Themis protein expression and shutdown *Themis* gene expression. The stabilization of Themis protein at this stage of T cell development might be important to compensate for the profound drop of Themis mRNA levels which could lead to a sudden decrease of TCR signaling and consequently impair positive selection or CD4 lineage commitment, known to be dependent upon long lasting TCR signals (30). On the other side, the down regulation of Themis mRNA level might be important for longer terms, in peripheral T cells, to persistently reduce the amount of Themis protein and to dampen thereby the responsiveness of these cells to self-ligands, which is required for the prevention of autoimmunity. It is interesting to notice in this context that Themis and SHP-1 expression profiles are inversely correlated, with SHP-1 being more expressed in mature T cells than in immature DP thymocytes (31). Reducing Themis/SHP-1 ratio in mature T cells might be important to relieve the brake that Themis exerts on SHP-1 and enable this phosphatase to inhibit weak TCR signals that may potentially lead to self-recognition (14).

A recent analysis of *Usp9X*^{-/-} mice suggests that USP9X is important for the negative selection of SP thymocytes (29). We found that positive selection and CD4 lineage choice occurs normally in *Usp9X*^{-/-} mice, suggesting that the reduced expression of Themis observed in *Usp9X*^{-/-} thymocytes might not be sufficient to impair significantly these developmental processes (Fig S3A and S3B). It is possible that USP9X acts redundantly with other USPs to stabilize Themis expression during these late stages of T cell development. Supporting this hypothesis, the expression levels of Themis are only moderately decreased in *Usp9X*^{-/-}

thymocytes in comparison to the dramatic decrease of Themis expression observed in thymocytes treated with the pan-DUB inhibitor PR619. Mass spectrometry analysis of Themis binding partners showed that Themis binds other USPs (USP24, USP19 and USP15) in addition to USP9X that have no reported function on T cell development (21). Further studies will be required to evaluate the role of these proteins on Themis-mediated signaling events and more generally on thymic selection processes.

We previously showed that Themis enhances Grb2 stability by reducing its ubiquitylation in thymocytes (21). This suggests that Themis and Grb2 are more stable as a complex than as free unbound proteins. This mutual stabilization mechanism might be important to enrich thymocytes with effective Themis/Grb2 signaling complexes, which may facilitate the transmission of TCR signals and their persistence during the development of T cells. We showed in the same report that the transgenic expression of Themis in *Grb2*^{+/-} thymocytes expressing the class-II restricted AND TCR rescues the defect of positive selection resulting from the partial loss of Grb2 (21). We speculated at this time that Themis acts by readjusting the amount of intracellular Grb2 close to its level in wild-type thymocytes. This new study provides a different interpretation to these data, suggesting that the defect of positive selection in Grb2-deficient mice might result from the destabilization of Themis and from the subsequent decrease of its expression. Thus, an unexpected function of Grb2 could be to maintain the expression of Themis above a certain level under which TCR signals are not sufficient to effectively promote positive selection. Whether or not the transgenic expression of Themis rescues the defect of positive selection in thymocytes that are fully deficient for Grb2 remains to be addressed.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6 mice are from Janvier (Le Genest St.Isle, France). *Themis*^{-/-} (17), *Grb2*^{+/-} (32) and *Usp9X*^{flox/flox} (33) mice were described previously. AND-TCR transgenic mice were from Taconic Farms. OTI- and OTII-TCR transgenic mice were provided by Pr. Roland Liblau (INSERM UMR1043, Toulouse). CD4-Cre mice were provided by Dr. Olivier Joffre (INSERM UMR1043, Toulouse). All the experiments were conducted with sex and age-matched mice between 6 and 10 weeks old housed under specific pathogen-free conditions at the INSERM animal facility (Zootechnie US-006; accreditation number A-31 55508), which is accredited by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice. All experimental protocols were approved by the local ethics committee and are in compliance with the French and European regulations on care and protection of the Laboratory Animals (EC Directive 2010/63).

Antibodies and flow cytometry

Sources for antibodies and reagents used in this study are: anti-Vav1 (C-14), anti-c-Cbl (A9), anti-GAPDH (FL-335), anti-ERDj3 (C-7), anti-GFP (B-2), Santa Cruz Biotechnologies; anti-V5, anti-USP9X, Bethyl Laboratories; anti-Ubiquitin (P4D1), anti-K48 (D9D5) and anti-K63 (D7A11) poly-ubiquitin, Cell Signaling; anti-HA, anti-FLAG (M2), Sigma-Aldrich; anti-Themis (Q13-1103), anti-Grb2, anti-PTP1C/SHP-1, anti-LAT Y226, BD Biosciences. Anti-Themis (3A3) antibody was provided by Dr Paul E. Love (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Anti-FLAG[®] M2 and anti-V5 Agarose Affinity Gel are from Sigma Aldrich. Thymocytes were incubated for the indicated period of times with MG132 20 μM or with PR-619 10 μM (Sigma-Aldrich). Fluorochrome-conjugated antibodies against CD4 and CD69, were from

Biolegend, and against CD8 α , CD5, TCR β and Themis were from eBioscience. Biotin-conjugated antibodies against CD3 ϵ (145-2C11), CD4 (GK1.5) were purchased from BD Biosciences. For flow cytometry analysis, single-cell suspensions from thymus, spleen or lymph nodes were incubated in phosphate-buffered saline (PBS), 0.5 % bovine serum albumin (BSA), and 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution (EDTA) containing the appropriate antibodies. Intracellular staining was performed by cells fixation with 4% of formaldehyde and cells permeabilization with 0.5% of triton. Cells detection was performed on a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences), after analysis was performed with FlowJo software (Tree Star, Inc.).

Real-time PCR analysis

For the purification of thymocytes subpopulation, total thymocytes were labelled with appropriate antibodies. Each population was isolated with a BD FACSAria cell sorter. For gene-expression studies, total cell RNA was isolated with an RNeasy kit (Quiagen). RNA samples (500 ng of each) were reverse-transcribed with the SuperScript III (Invitrogen) and were assayed by RT-PCR. Transcripts were quantified with a Roche Light-Cycler 480. Duplicates were run for each sample in a 96-well plate; β 2-microglobulin served as the endogenous reference gene. The relative quantification method was used, with the ratio of the mRNA abundance of the gene of interest normalized to the abundance of β 2-microglobulin mRNA and with the average of control thymocyte samples serving as the calibrator value. Themis primers were exon-3 forward 5'-TGAAATCCAAGGTGTGCTGA-3' and exon-4 reverse 5'-CGTCCGTAGACAGCAACTGA-3'; β 2m forward 5'-ACATACGCCTGCAGAGTTAAGCAT-3'; β 2m reverse 5'-CGATCCCAGTAGACGGTCTTG-3'.

Plasmids and constructs

Plasmids encoding for FLAG-ThemisWt, FLAG-Themis Δ PRS, GFP-Themis and V5-USP9X were described (19, 34). HA-Ubiquitin, HA-UbiquitinK48R, FLAG-USP19 were purchased from Addgene. Plasmids encoding for FLAG-Themis Δ CABIT1(1-243), FLAG-Themis Δ CABIT2(267-494), HA-UbiquitinK63R, HA-UbiquitinK33R and HA-UbiquitinK29R were generated by site-directed mutagenesis with the QuikChange Kit (Stratagene).

Cell stimulation and immunoprecipitation

For the analysis of Themis ubiquitylation, 6×10^7 thymocytes or 5×10^6 Jurkat cells were stimulated or not with anti-CD3 ϵ , anti-CD4 and streptavidin 30 μ g/ml at 37 °C. Stimulation was stopped on ice and cells were immediately centrifuged and resuspend in 140 μ l of ice cold lysis buffer (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Triton 1 %, Na₃VO₄ 2 mM, NaF 5 mM, EDTA 1 mM, SDS 1 %, Iodoacetamide 10 mM, N-Ethylmaleimide 10 mM, protease inhibitor cocktail tablet (Roche)). Lysates were boiled at 95°C for 10 min and sonicated two times for 5 s (30 % duty cycle). Lysates were diluted in a total of 1.4 ml of ice cold lysis buffer without SDS and cleared by centrifugation at 12000 rpm for 15 minutes at 4 °C. Themis was immunoprecipitated from cleared lysate for 2 h at 4 °C with 15 μ l of protein A-sepharose resin coated with 10 μ l of serum containing polyclonal rabbit anti-Themis antibodies. Resins were washed and incubate on a shaker for 15 min with elution buffer (Themis antigenic peptides 100 μ g/ml, Tris 50 mM, NaCl 150 mM). Samples were further processed for Western blot analysis. For any other immunoprecipitation, thymocytes or Jurkat cells were resuspend in ice-cold lysis buffer (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Triton 1 %, Na₃VO₄ 2 mM, NaF 5 mM, Glycerol 10 %, protease inhibitor cocktail tablet (Roche)) for 20 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 12000 rpm for 15 minutes at 4 °C and proteins were

immunoprecipitated from cleared lysate with 15µl of sepharose resin coated with the indicated antibodies for 2 h at 4 °C.

Cell lines and transfections

Jurkat-TAg cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma Aldrich). Human embryonic kidney epithelial cells (HEK293) were maintained in DMEM, 10% FBS. For transfection, 10⁷ Jurkat-TAg were washed three times with RPMI 1640 medium without FBS and resuspended in 100µl of Ingenio[®] electroporation solution (Euromedex) containing 20 µg of the indicated plasmids. Cells were electroporated with the Nucleofector[®] II Device (H10 program). For lipofection, HEK293 cells were incubated for 6 hours with in 500 µl of DMEM containing 5 µg of the indicated plasmids and 15 µl of LipoD293™ DNA (Tebu).

Pull-down-assays

10 µg of purified human USP9X (E-552, Boston Biochem) and 10 µg of purified mouse Themis were incubated for 45min in buffer containing NaCl 150 mM and Tris pH 7.4 10 mM. Solution was adjusted with Triton 0.2% and USP9X was immunoprecipitated for 3 h at 4°C with 15µl of protein A-sepharose resin coated with anti-USP9X antibodies. Samples were further processed for Western blot analysis.

Western blot

Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. The membrane was blocked with 20 % SVF for the analysis of Themis ubiquitylation and 5% milk for coimmunoprecipitation analysis in TBST for 1 hour at room temperature prior to incubation

with primary antibodies at 4 °C overnight. After washing, membranes were incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Subsequently, membranes were incubated with ECL solution for 5 minutes in the dark and luminescence was captured using a BioRad XRS+ imager. Images were analyzed using the BioRad ImageLab software.

Statistical analysis

Statistical comparisons were carried out with the Fisher's test to verify equal variance of the populations, followed by unpaired or paired two-tailed t-test or Mann-Whitney test if variance was not equal. The p values are indicated in the figure legends.

Acknowledgements

We thank P.E Love and A. Saoudi for critical reading of the manuscript; the Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan flow cytometry facility; the INSERM UMS006-CREFRE animal care facility. This work was supported by INSERM and Sanofi (Avenir grant to R.L.); the Fondation pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP); a Marie Curie International Reintegration Grant (R.L.); the French Ministry of Higher Education and Research (PhD fellowships for A.G. and G.B.); the Fondation pour la Recherche Médicale (extension of PhD fellowship for A.G.).

Figures legends

Figure 1: Post-translational control of Themis expression during positive selection. (A) RT-PCR analysis of Themis mRNA abundance in “pre-selection” DP (TCR^{lo}CD69^{lo}CD5^{lo}), “self-pMHC stimulated” DP (TCR^{lo}CD69^{hi}CD5^{hi}) and CD4 SP CD69^{hi} thymocytes. (B) Left: Contour plot represents the gating strategy to analyze Themis expression in “pre-selection” (red line)

and “self-pMHC stimulated” (blue line) DP thymocytes. Right: histogram represents Themis staining in the indicated DP thymocyte subsets from *Themis*^{+/+} and *Themis*^{-/-} (black and dashed lines) mice; bar graph represent the relative expression of Themis protein in the indicated thymocyte subsets. (C) (D) Histograms represent Themis staining in the indicated DP thymocyte subsets from OTII-TCR (C) and OTI-TCR (D) transgenic mice (black and dashed lines represent the isotype control). Bar graphs represent the relative expression of Themis protein in the indicated DP thymocyte subsets. Data are means ± SEM of three (A) (B), or four (C) (D) independent experiments. * P<0.05, **P < 0.01 by two-tailed, paired t test.

Figure 2: Themis expression is controlled by the ubiquitin-specific protease USP9X. (A)

Western blot analysis of Themis, Cbl and GAPDH in thymocytes incubated with PR619 (10μM) for the indicated times. Total cytoplasmic extract (TCE) from each sample were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Bar graph shows the relative abundances of Themis proteins after PR619 treatment during indicated times as determined by calculating the ratios of the intensities of the bands corresponding to Themis proteins to those corresponding to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), the loading control. (B) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding V5-tagged USP9X. Samples were then subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies specific for V5 and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated epitope. (C)(D) Flow cytometry analysis of Themis protein abundance in DN, DP, CD4 SP and CD8 SP thymocyte subsets from *Usp9X*^{+/+}, *Usp9X*^{-/-} and *Themis*^{-/-} mice. Bar graphs represent the relative expression of Themis protein in the indicated subsets from *Usp9X*^{+/+} and *Usp9X*^{-/-} mice. (E) RT-PCR analysis of Themis mRNA abundance in CD4⁺ SP thymocytes from *Usp9X*^{+/+} and *Usp9X*^{-/-} mice. (F) Western blot analysis

of USP9X, Themis, SHP-1, Grb2 and GAPDH in total thymocytes from *Usp9X^{+/+}* and *Usp9X^{-/-}* mice. Data are means \pm SEM of three (C) (D) (E) independent experiments *P < 0.05 by two-tailed, unpaired t test. Western blots are from one experiment and are representative of three (A) (B) or four (F) independent experiments.

Figure 3: USP9X removes K48-ubiquitin chains on Themis following TCR engagement. (A)

Themis was immunoprecipitated from cellular extracts of thymocytes as described in Materials and Methods. Samples were analyzed by Western blotting with anti-ubiquitin and anti-Themis antibodies. (B) Jurkat cells were transfected with plasmids encoding for FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding HA-tagged ubiquitin. Themis was immunoprecipitated from cellular extracts and samples were analyzed by Western blotting with anti-HA antibodies. (C) Total thymocytes were incubated with MG132 for 2 hours. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for Themis and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. (D) Western blot analysis of Themis ubiquitylation in total thymocytes with antibodies specific of K48 or K63 polyubiquitin chains. (E) Jurkat cells were transfected with plasmids encoding FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding HA-tagged ubiquitin wild-type (WT) or ubiquitin K48R or K63R. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for FLAG and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. (F) (G) Thymocytes from *Themis^{+/+}* (F), *Usp9X^{+/+}* or *Usp9X^{-/-}* (G) mice were stimulated with premixed anti-CD3 (α -CD3) and anti-CD4 (α -CD4) antibodies for the indicated times. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for Themis and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. Western blots are from

one experiment and are representative of four (A) (B) (C), three (D) (E) (G), six (F) independent experiments.

Figure 4: USP9X interacts directly with the N-terminal CABIT domain of Themis. (A)(B) Thymocytes from *Themis*^{+/+} and *Themis*^{-/-} mice were stimulated (A) or not (B) with premixed anti-CD3 and anti-CD4 antibodies for the indicated times. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for Themis (A) or USP9X (B) and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. (C) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding for V5-tagged USP9X plus plasmids encoding for FLAG-tagged Grb2. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for FLAG and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. (D) Schematic of constructs used for transfection. (E) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding for V5-tagged USP9X plus plasmids encoding for the indicated Themis constructs. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for FLAG and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. (F) Purified Themis and USP9X proteins were incubated together prior immunoprecipitation with antibodies specific for USP9X and Western blot analyses with the indicated antibodies. Western blots are from one experiment and are representative of three (A) (C) or two (B) (E) (F) independent experiments.

Figure 5: Grb2 prevents Themis ubiquitylation and degradation by promoting the recruitment of USP9X to LAT. (A) (B) Thymocytes from *Grb2*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} mice were stimulated with premixed anti-CD3 and anti-CD4 antibodies for the indicated times. Samples were then subjected to immunoprecipitation with control (Ctl) (A), anti-USP9X (A) or anti-

Themis (B) antibodies and then analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. (C)(D) Histogram represents Themis staining in the indicated thymocyte subsets from *Themis*^{+/+}, *Themis*^{-/-} and *Grb2*^{+/-} mice; bar graph represents the relative expression of Themis protein in the indicated thymocyte subsets. (E) RT-PCR analysis of Themis mRNA abundance in total thymocytes from *Grb2*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} mice. (F) Total cytoplasmic extracts of thymocytes from *Grb2*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} mice were analyzed by Western blotting. Data are means ± SEM of three (C) (D) (E) independent experiments *P < 0.05 by two-tailed, unpaired t test. Western blots are from one experiment and are representative of three (F) (B) or one (A) independent experiments.

Supplementary figure legends

Figure S1: Themis expression is controlled by ubiquitin-specific proteases in thymocytes and peripheral T cells. (A) Schematic of Themis-binding partners identified by yeast two-hybrid. Proteins framed in red were also identified as Themis interactors by mass spectrometry (21). (B) Histogram represents Themis staining in lymph nodes CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *Usp9X*^{+/+}, *Usp9X*^{-/-} and *Themis*^{-/-} mice; bar graph represents the relative expression of Themis protein in the T cell subsets. Data are means ± SEM two independent experiments *P < 0.05 by two-tailed, unpaired t test.

Figure S2: Themis ubiquitylation and expression are regulated by TCR engagement (A) Jurkat cells were transfected with plasmids encoding for FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding for HA-tagged ubiquitin wild-type or ubiquitin K33R or K29R. Themis ubiquitylation was analyzed by Western blotting. (B) Freshly isolated thymocytes were rested or not (0')

during the indicated times at 37°C. Themis was immunoprecipitated from cellular extracts analyzed by Western blotting with anti-ubiquitin antibodies. (C) CD4 peripheral T cells were stimulated with premixed anti-CD3 and anti-CD4 antibodies for the indicated times. Themis was immunoprecipitated and ubiquitylation was analyzed by Western blotting. Western blots are from one experiment and are representative of three (A), four (B) or one (C) independent experiments.

Figure S3: Normal positive selection and CD4 versus CD8 lineage commitment in *Usp9X*^{-/-} mice. (A) Flow cytometry analysis of positive selection in AND *Usp9X*^{-/-} mice. Contour plots represent the CD4 versus CD8 staining profiles of thymocytes from *Usp9X*^{+/+} and *Usp9X*^{-/-} mice expressing the AND TCR. (B) Graph represents the ratio of CD3^{hi} CD4 SP to CD3^{hi} CD8 SP thymocytes in *Usp9X*^{+/+} and *Usp9X*^{-/-} mice. Plots and graph are representative of two (A) and five (B) independent experiments.

References

1. Carpenter, A. C., and R. Bosselut. 2010. Decision checkpoints in the thymus. *Nature immunology* 11: 666-673.
2. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* 21: 139-176.
3. Hogquist, K. A., and S. C. Jameson. 2014. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate 'decisions' and effector function. *Nature immunology* 15: 815-823.
4. Wilkinson, R. W., G. Anderson, J. J. Owen, and E. J. Jenkinson. 1995. Positive selection of thymocytes involves sustained interactions with the thymic microenvironment. *J Immunol* 155: 5234-5240.

5. Mariathasan, S., A. Zakarian, D. Bouchard, A. M. Michie, J. C. Zúñiga-Pflücker, and P. S. Ohashi. 2001. Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* 167: 4966-4973.
6. Ross, J. O., H. J. Melichar, B. B. Au-Yeung, P. Herzmark, A. Weiss, and E. A. Robey. 2014. Distinct phases in the positive selection of CD8+ T cells distinguished by intrathymic migration and T-cell receptor signaling patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2550-2558.
7. Daniels, M. A., E. Teixeira, J. Gill, B. Hausmann, D. Roubaty, K. Holmberg, G. Werlen, G. A. Holländer, N. R. Gascoigne, and E. Palmer. 2006. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444: 724-729.
8. Brugnera, E., A. Bhandoola, R. Cibotti, Q. Yu, T. I. Ginter, Y. Yamashita, S. O. Sharrow, and A. Singer. 2000. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 13: 59-71.
9. Dzhagalov, I. L., K. G. Chen, P. Herzmark, and E. A. Robey. 2013. Elimination of self-reactive T cells in the thymus: a timeline for negative selection. *PLoS Biol* 11: e1001566.
10. Acuto, O., V. Di Bartolo, and F. Michel. 2008. Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nature reviews. Immunology* 8: 699-712.
11. Malissen, B., C. Gregoire, M. Malissen, and R. Roncagalli. 2014. Integrative biology of T cell activation. *Nature immunology* 15: 790-797.
12. Kosugi, A., J. Sakakura, K. Yasuda, M. Ogata, and T. Hamaoka. 2001. Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts. *Immunity* 14: 669-680.
13. Lorenz, U. 2009. SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. *Immunol Rev* 228: 342-359.
14. Stefanova, I., B. Hemmer, M. Vergelli, R. Martin, W. E. Biddison, and R. N. Germain. 2003. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nature immunology* 4: 248-254.

15. Fu, G., S. Vallee, V. Rybakin, M. V. McGuire, J. Ampudia, C. Brockmeyer, M. Salek, P. R. Fallen, J. A. Hoerter, A. Munshi, Y. H. Huang, J. Hu, H. S. Fox, K. Sauer, O. Acuto, and N. R. Gascoigne. 2009. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nature immunology* 10: 848-856.
16. Johnson, A. L., L. Aravind, N. Shulzhenko, A. Morgun, S. Y. Choi, T. L. Crockford, T. Lambe, H. Domaschenz, E. M. Kucharska, L. Zheng, C. G. Vinuesa, M. J. Lenardo, C. C. Goodnow, R. J. Cornall, and R. H. Schwartz. 2009. Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nature immunology* 10: 831-839.
17. Lesourne, R., S. Uehara, J. Lee, K. D. Song, L. Li, J. Pinkhasov, Y. Zhang, N. P. Weng, K. F. Wildt, L. Wang, R. Bosselut, and P. E. Love. 2009. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nature immunology* 10: 840-847.
18. Patrick, M. S., H. Oda, K. Hayakawa, Y. Sato, K. Eshima, T. Kirikae, S. Iemura, M. Shirai, T. Abe, T. Natsume, T. Sasazuki, and H. Suzuki. 2009. Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 16345-16350.
19. Lesourne, R., E. Zvezdova, K. D. Song, D. El-Khoury, S. Uehara, V. A. Barr, L. E. Samelson, and P. E. Love. 2012. Interchangeability of themis1 and themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J Immunol* 189: 1154-1161.
20. Paster, W., C. Brockmeyer, G. Fu, P. C. Simister, B. de Wet, A. Martinez-Riano, J. A. Hoerter, S. M. Feller, C. Wulfig, N. R. Gascoigne, and O. Acuto. 2013. GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J Immunol* 190: 3749-3756.
21. Zvezdova, E., J. Mikolajczak, A. Garreau, M. Marcellin, L. Rigal, J. Lee, S. Choi, G. Blaize, J. Argenty, J. Familiades, L. Li, A. Gonzalez de Peredo, O. Burlet-Schiltz, P. E. Love, and R. Lesourne. 2016. Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Science signaling* 9: ra51.
22. Komander, D., M. J. Clague, and S. Urbé. 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 550-563.
23. Tian, X., N. S. Isamiddinova, R. J. Peroutka, S. J. Goldenberg, M. R. Mattern, B. Nicholson, and C. Leach. 2011. Characterization of selective ubiquitin and ubiquitin-

- like protease inhibitors using a fluorescence-based multiplex assay format. *Assay Drug Dev Technol* 9: 165-173.
24. Shi, J., and H. T. Petrie. 2012. Activation kinetics and off-target effects of thymus-initiated cre transgenes. *PloS one* 7: e46590.
 25. Naik, E., and V. M. Dixit. 2016. Usp9X Is Required for Lymphocyte Activation and Homeostasis through Its Control of ZAP70 Ubiquitination and PKC β Kinase Activity. *J Immunol* 196: 3438-3451.
 26. Jang, I. K., J. Zhang, Y. J. Chiang, H. K. Kole, D. G. Cronshaw, Y. Zou, and H. Gu. 2010. Grb2 functions at the top of the T-cell antigen receptor-induced tyrosine kinase cascade to control thymic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 10620-10625.
 27. Pickart, C. M. 1997. Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J* 11: 1055-1066.
 28. Udeshi, N. D., T. Svinkina, P. Mertins, E. Kuhn, D. R. Mani, J. W. Qiao, and S. A. Carr. 2013. Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K- ϵ -GG) antibody enables routine quantification of 10,000s of ubiquitination sites in single proteomics experiments. *Mol Cell Proteomics* 12: 825-831.
 29. Naik, E., J. D. Webster, J. DeVoss, J. Liu, R. Suriben, and V. M. Dixit. 2014. Regulation of proximal T cell receptor signaling and tolerance induction by deubiquitinase Usp9X. *The Journal of experimental medicine* 211: 1947-1955.
 30. Liu, X., and R. Bosselut. 2004. Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo. *Nature immunology* 5: 280-288.
 31. Stephen, T. L., A. Tikhonova, J. M. Riberdy, and T. M. Laufer. 2009. The activation threshold of CD4+ T cells is defined by TCR/peptide-MHC class II interactions in the thymic medulla. *J Immunol* 183: 5554-5562.
 32. Gong, Q., A. M. Cheng, A. M. Akk, J. Alberola-Ila, G. Gong, T. Pawson, and A. C. Chan. 2001. Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nature immunology* 2: 29-36.
 33. Stegeman, S., L. A. Jolly, S. Premarathne, J. Gecz, L. J. Richards, A. Mackay-Sim, and S. A. Wood. 2013. Loss of Usp9x disrupts cortical architecture, hippocampal development and TGFbeta-mediated axonogenesis. *PloS one* 8: e68287.

34. Theard, D., F. Labarrade, M. Partisani, J. Milanini, H. Sakagami, E. A. Fon, S. A. Wood, M. Franco, and F. Luton. 2010. USP9x-mediated deubiquitination of EFA6 regulates de novo tight junction assembly. *The EMBO journal* 29: 1499-1509.

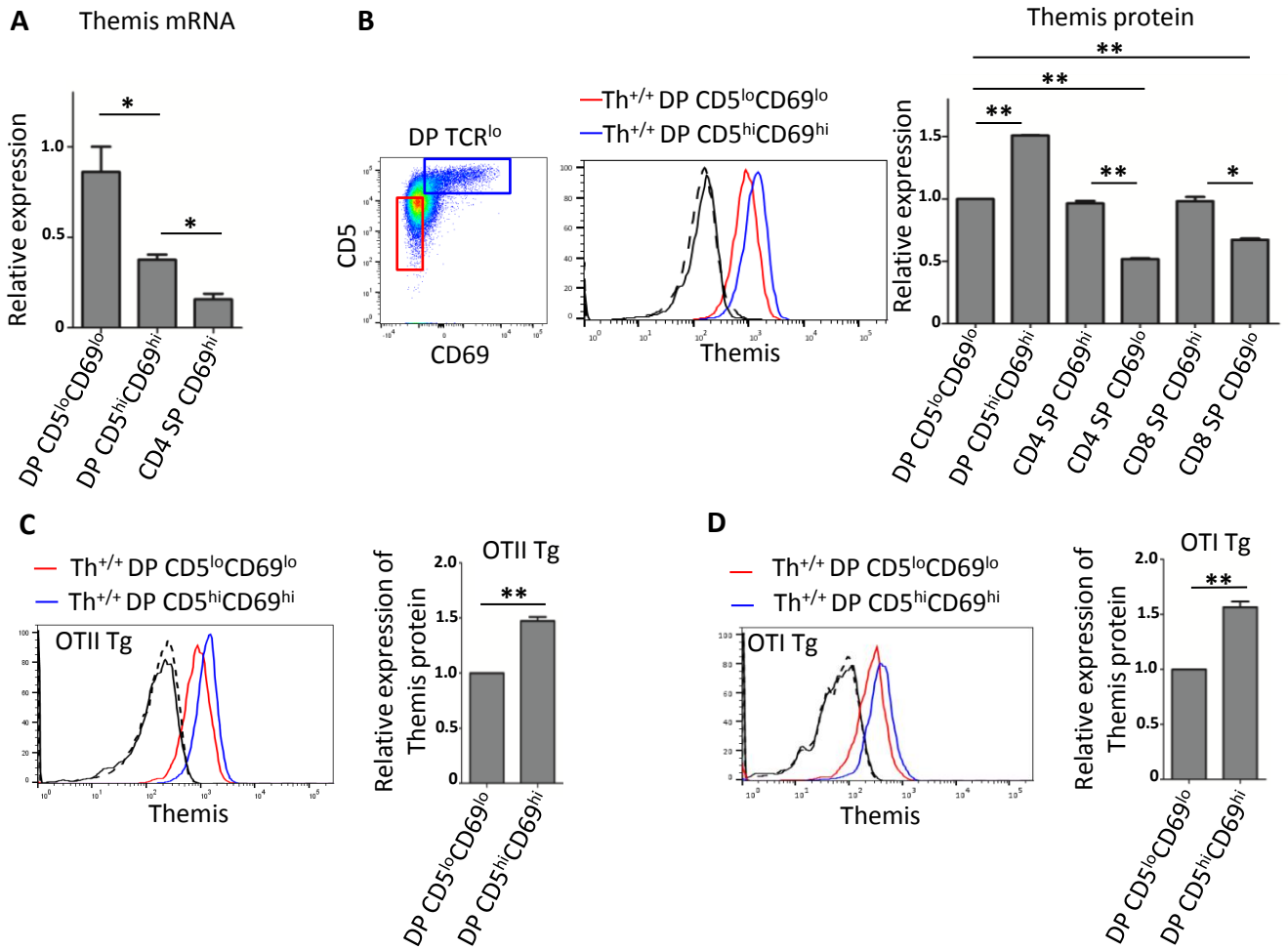


Figure 1: Post-translational control of Themis expression during positive selection. (A) RT-PCR analysis of Themis mRNA abundance in “pre-selection” DP (TCR^{lo}CD69^{lo}CD5^{lo}), “self-pMHC stimulated” DP (TCR^{lo}CD69^{hi}CD5^{hi}) and CD4 SP CD69^{hi} thymocytes. (B) Left: Contour plot represents the gating strategy to analyze Themis expression in “pre-selection” (red line) and “self-pMHC stimulated” (blue line) DP thymocytes. Right: histogram represents Themis staining in the indicated DP thymocyte subsets from *Themis*^{+/+} and *Themis*^{-/-} (black and dashed lines) mice; bar graph represent the relative expression of Themis protein in the indicated thymocyte subsets. (C) (D) Histograms represent Themis staining in the indicated DP thymocyte subsets from OTII-TCR (C) and OTI-TCR (D) transgenic mice (black and dashed lines represent the isotype control). Bar graphs represent the relative expression of Themis protein in the indicated DP thymocyte subsets. Data are means ± SEM of three (A) (B), or four (C) (D) independent experiments. * P<0.05, **P < 0.01 by two-tailed, paired t test.

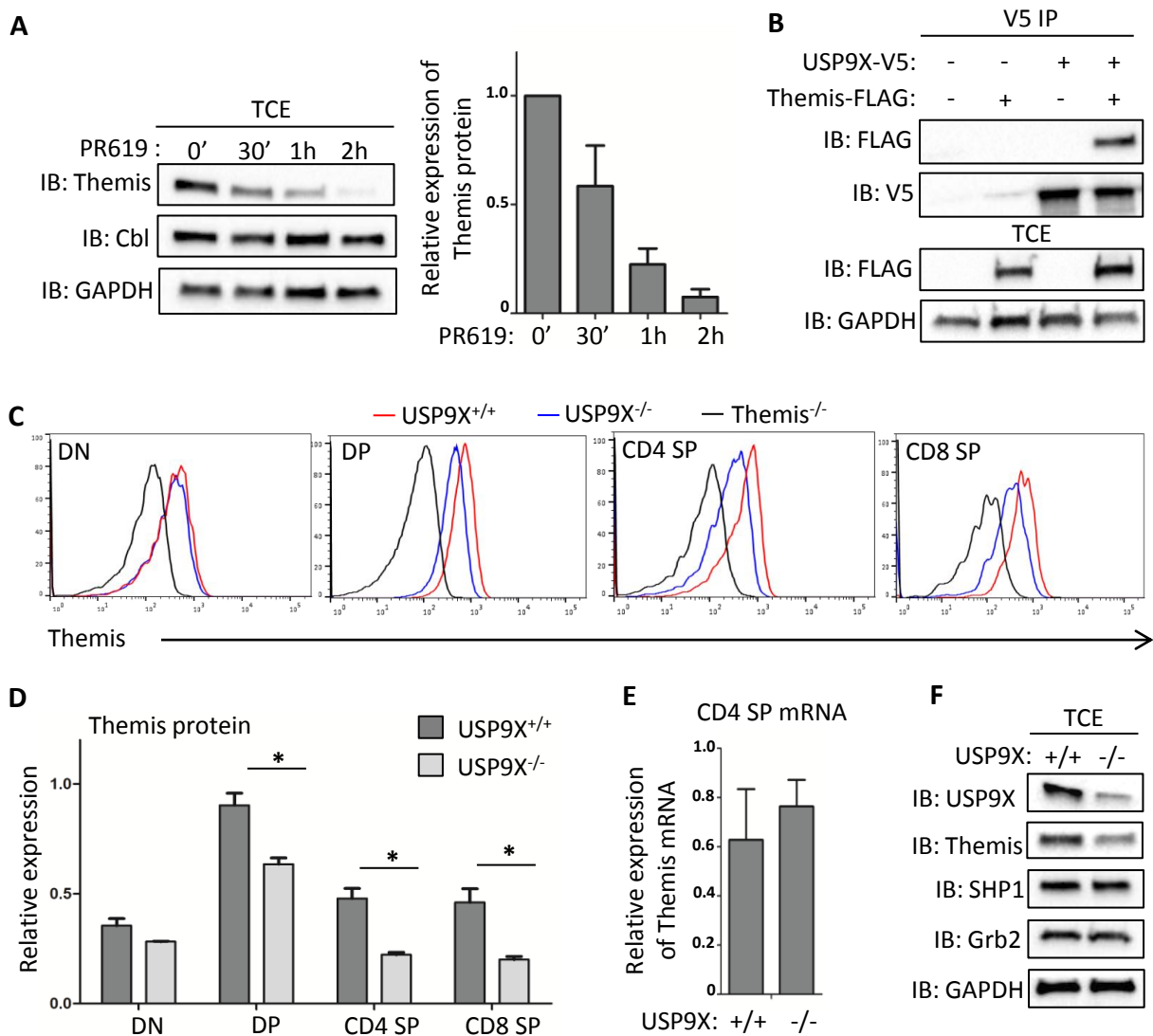
Figure 2

Figure 2: Themis expression is controlled by the ubiquitin-specific protease USP9X. (A) Western blot analysis of Themis, Cbl and GAPDH in thymocytes incubated with PR619 (10 μ M) for the indicated times. Total cytoplasmic extract (TCE) from each sample were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Bar graph shows the relative abundances of Themis proteins after PR619 treatment during indicated times as determined by calculating the ratios of the intensities of the bands corresponding to Themis proteins to those corresponding to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), the loading control. (B) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding V5-tagged USP9X. Samples were then subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies specific for V5 and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated epitope. (C)(D) Flow cytometry analysis of Themis protein abundance in DN, DP, CD4 SP and CD8 SP thymocyte subsets from *Usp9X*^{+/+}, *Usp9X*^{-/-} and *Themis*^{-/-} mice. Bar graphs represent the relative expression of Themis protein in the indicated subsets from *Usp9X*^{+/+} and *Usp9X*^{-/-} mice. (E) RT-PCR analysis of Themis mRNA abundance in CD4⁺ SP thymocytes from *Usp9X*^{+/+} and *Usp9X*^{-/-} mice. (F) Western blot analysis of USP9X, Themis, SHP-1, Grb2 and GAPDH in total thymocytes from *Usp9X*^{+/+} and *Usp9X*^{-/-} mice. Data are means \pm SEM of three (C) (D) (E) independent experiments *P < 0.05 by two-tailed, unpaired t test. Western blots are from one experiment and are representative of three (A) (B) or four (F) independent experiments.

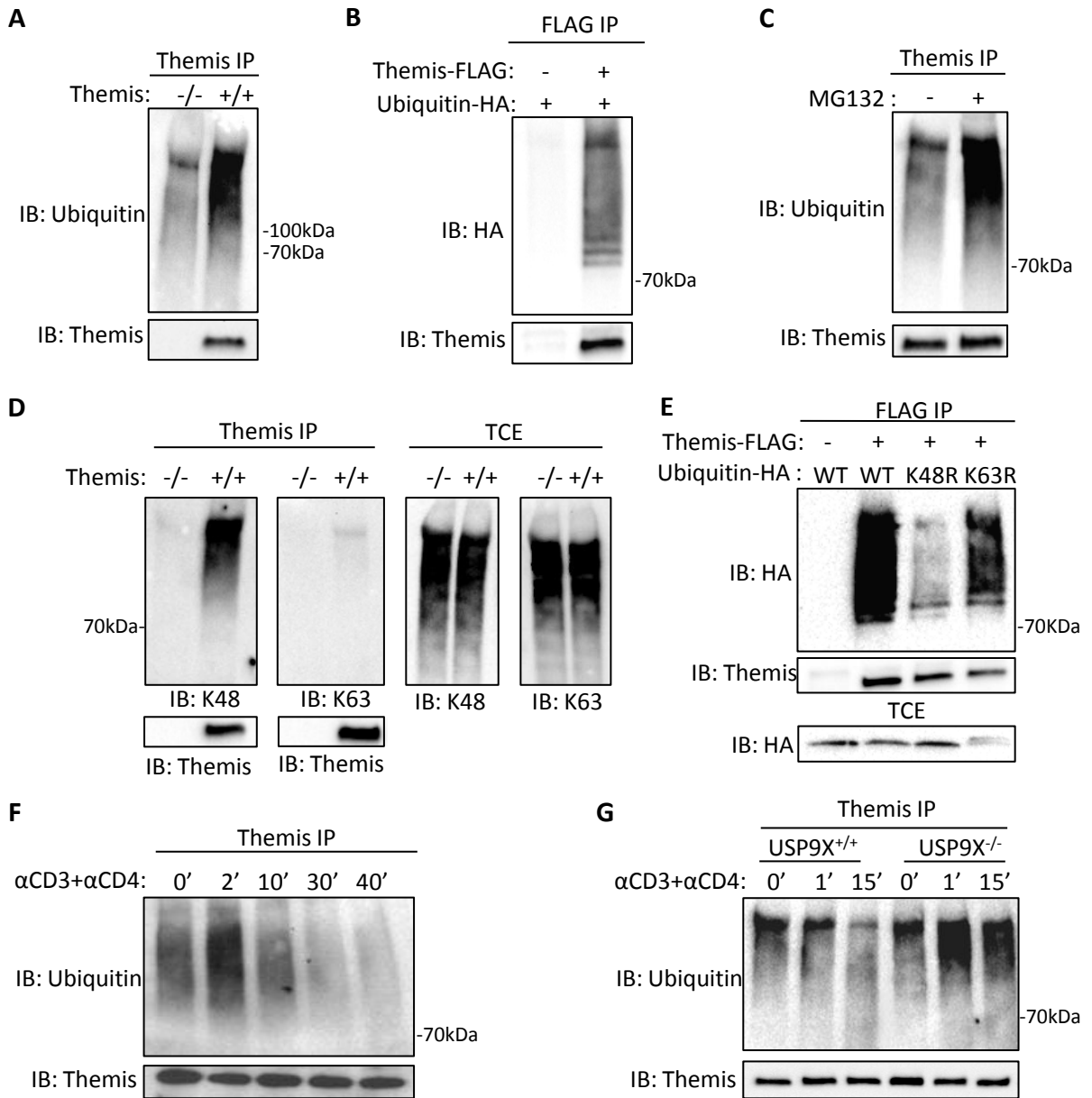
Figure 3

Figure 3: USP9X removes K48-ubiquitin chains on Themis following TCR engagement. (A) Themis was immunoprecipitated from cellular extracts of thymocytes as described in Materials and Methods. Samples were analyzed by Western blotting with anti-ubiquitin and anti-Themis antibodies. (B) Jurkat cells were transfected with plasmids encoding for FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding HA-tagged ubiquitin. Themis was immunoprecipitated from cellular extracts and samples were analyzed by Western blotting with anti-HA antibodies. (C) Total thymocytes were incubated with MG132 for 2 hours. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for Themis and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. (D) Western blot analysis of Themis ubiquitylation in total thymocytes with antibodies specific of K48 or K63 polyubiquitin chains. (E) Jurkat cells were transfected with plasmids encoding FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding HA-tagged ubiquitin wild-type (WT) or ubiquitin K48R or K63R. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for FLAG and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. (F) (G) Thymocytes from *Themis*^{+/+} (F), *Usp9X*^{+/+} or *Usp9X*^{-/-} (G) mice were stimulated with premixed anti-CD3 (α -CD3) and anti-CD4 (α -CD4) antibodies for the indicated times. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for Themis and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. Western blots are from one experiment and are representative of four (A) (B) (C), three (D) (E) (G), six (F) independent experiments.

Figure 4

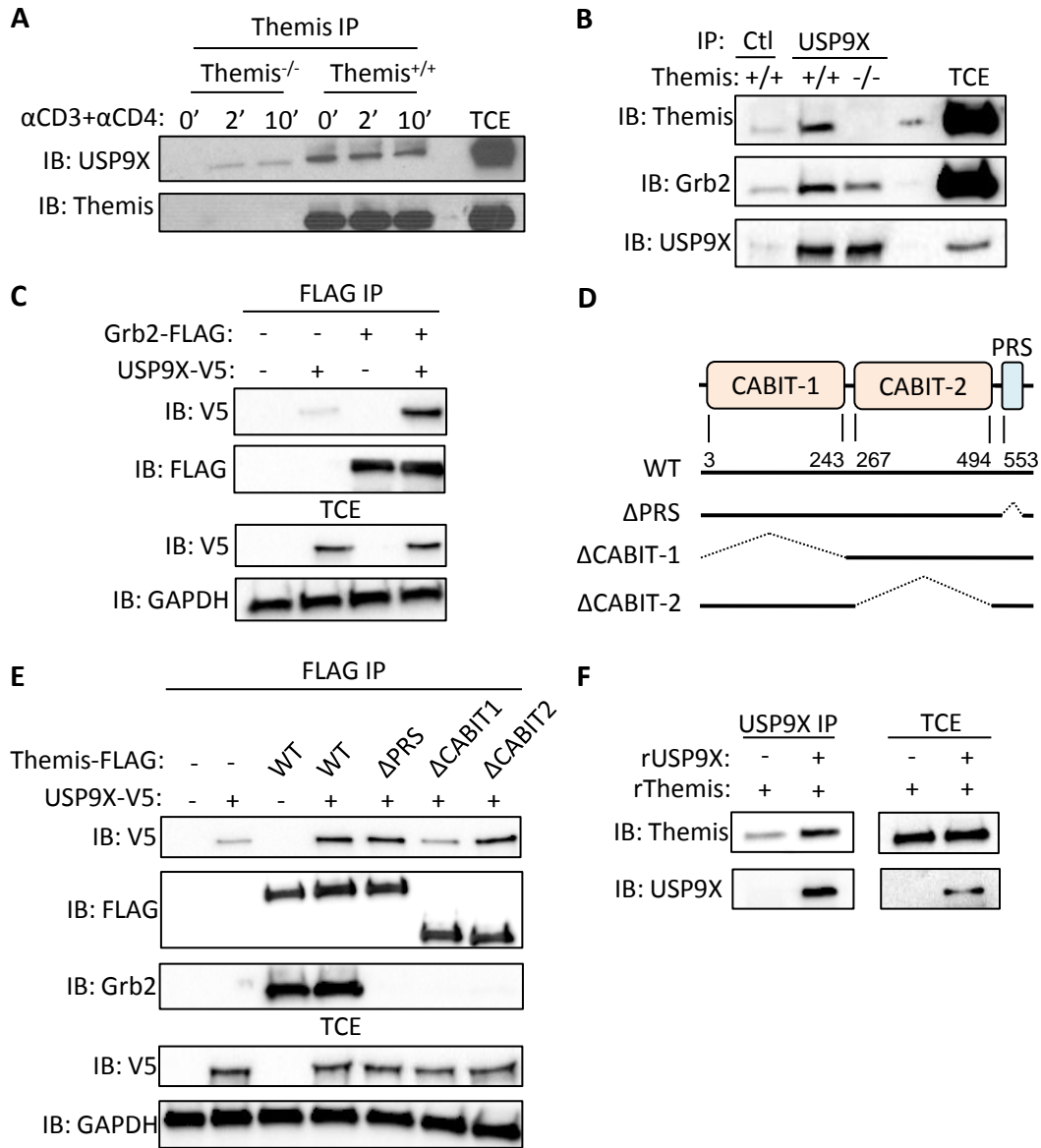


Figure 4: USP9X interacts directly with the N-terminal CABIT domain of Themis. (A)(B) Thymocytes from *Themis*^{+/+} and *Themis*^{-/-} mice were stimulated (A) or not (B) with premixed anti-CD3 and anti-CD4 antibodies for the indicated times. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for Themis (A) or USP9X (B) and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. (C) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding for V5-tagged USP9X plus plasmids encoding for FLAG-tagged Grb2. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for FLAG and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. (D) Schematic of constructs used for transfection. (E) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding for V5-tagged USP9X plus plasmids encoding for the indicated Themis constructs. Samples were subjected to immunoprecipitation with antibodies specific for FLAG and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins. (F) Purified Themis and USP9X proteins were incubated together prior immunoprecipitation with antibodies specific for USP9X and Western blot analyses with the indicated antibodies. Western blots are from one experiment and are representative of three (A) (C) or two (B) (E) (F) independent experiments.

Figure 5

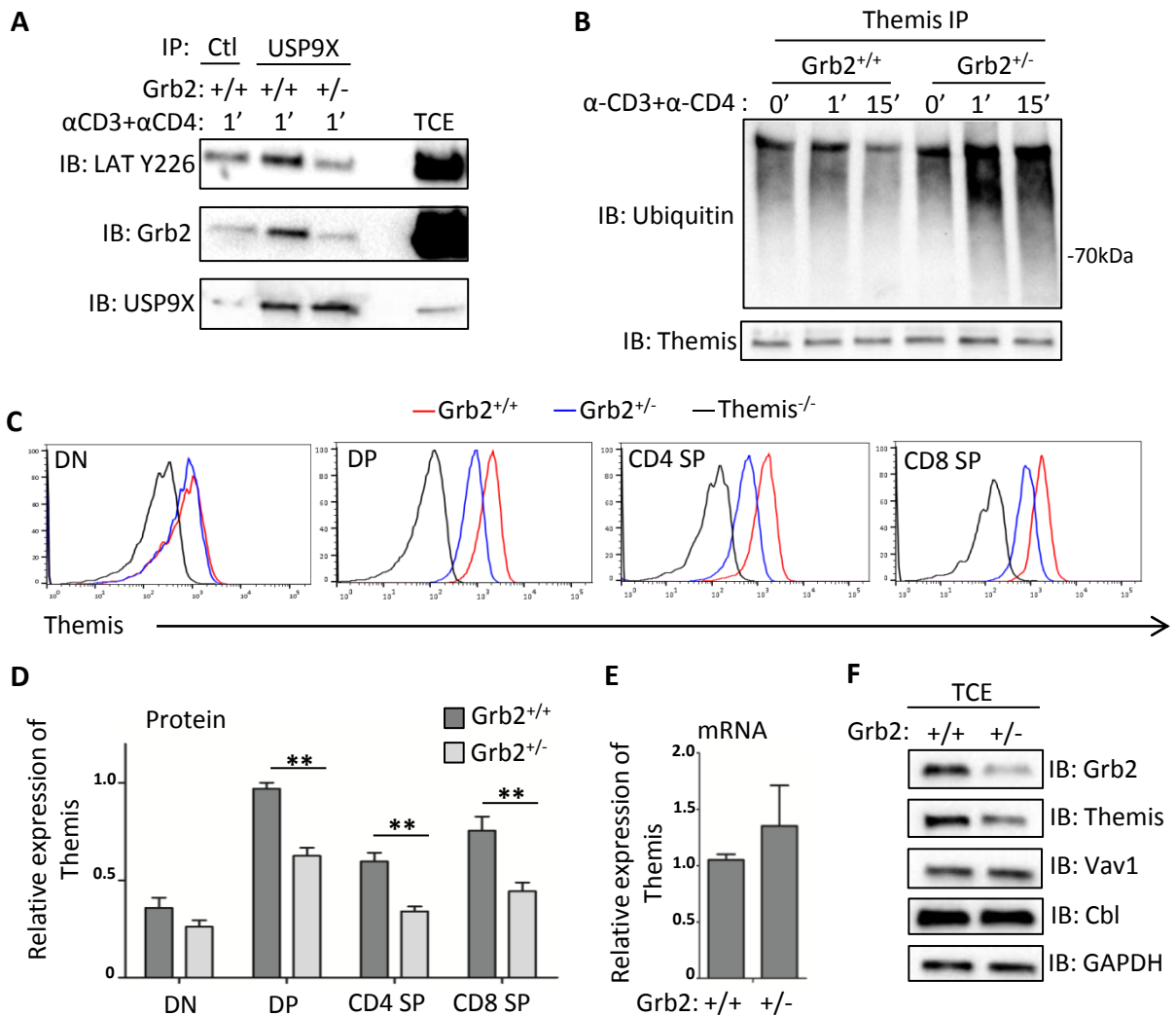


Figure 5: Grb2 prevents Themis ubiquitylation and degradation by promoting the recruitment of USP9X to LAT. (A) (B) Thymocytes from *Grb2*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} mice were stimulated with premixed anti-CD3 and anti-CD4 antibodies for the indicated times. Samples were then subjected to immunoprecipitation with control (Ctl) (A), anti-USP9X (A) or anti-Themis (B) antibodies and then analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. (C)(D) Histogram represents Themis staining in the indicated thymocyte subsets from *Themis*^{+/+}, *Themis*^{-/-} and *Grb2*^{+/-} mice; bar graph represents the relative expression of Themis protein in the indicated thymocyte subsets. (E) RT-PCR analysis of Themis mRNA abundance in total thymocytes from *Grb2*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} mice. (F) Total cytoplasmic extracts of thymocytes from *Grb2*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} mice were analyzed by Western blotting. Data are means ± SEM of three (C) (D) (E) independent experiments *P < 0.05 by two-tailed, unpaired t test. Western blots are from one experiment and are representative of three (F) (B) or one (A) independent experiments.

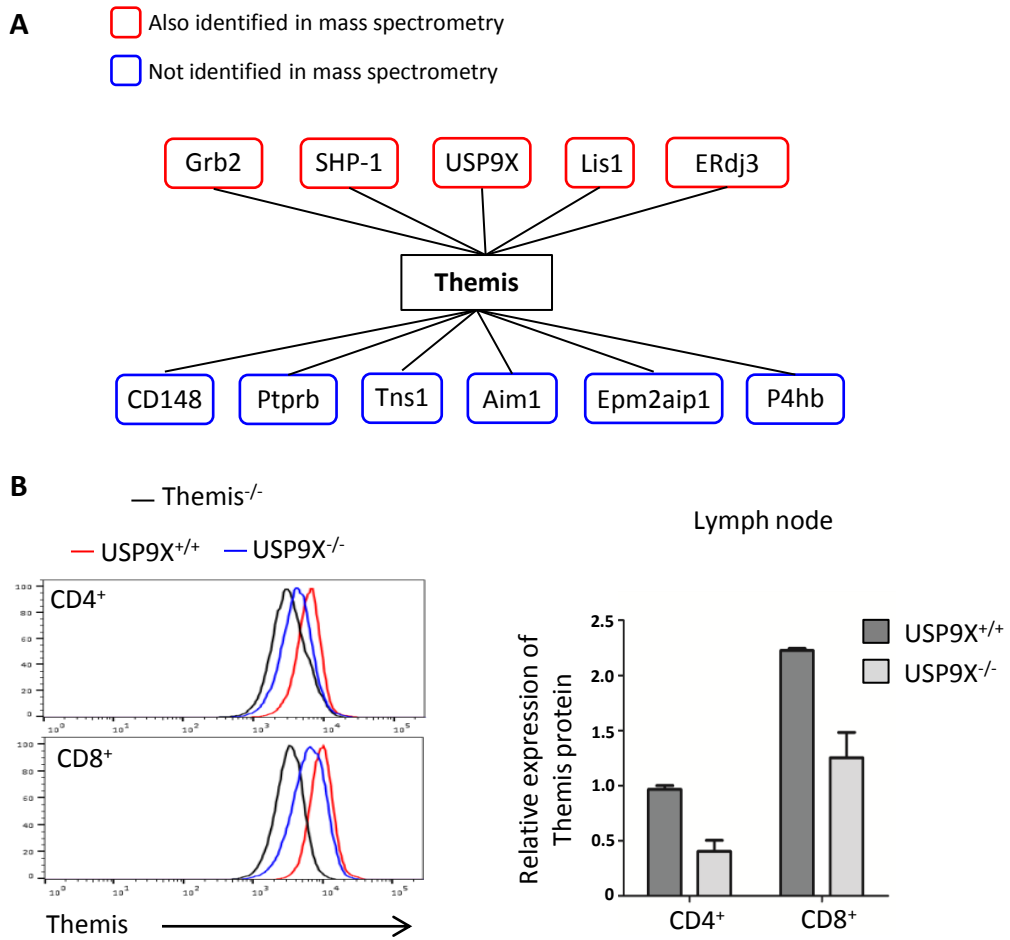


Figure S1: Themis expression is controlled by ubiquitin-specific proteases in thymocytes and peripheral T cells. (A) Schematic of Themis-binding partners identified by yeast two-hybrid. Proteins framed in red were also identified as Themis interactors by mass spectrometry (21). (B) Histogram represents Themis staining in lymph nodes CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *Usp9X*^{+/+}, *Usp9X*^{-/-} and *Themis*^{-/-} mice; bar graph represents the relative expression of Themis protein in the T cell subsets. Data are means ± SEM two independent experiments *P < 0.05 by two-tailed, unpaired t test.

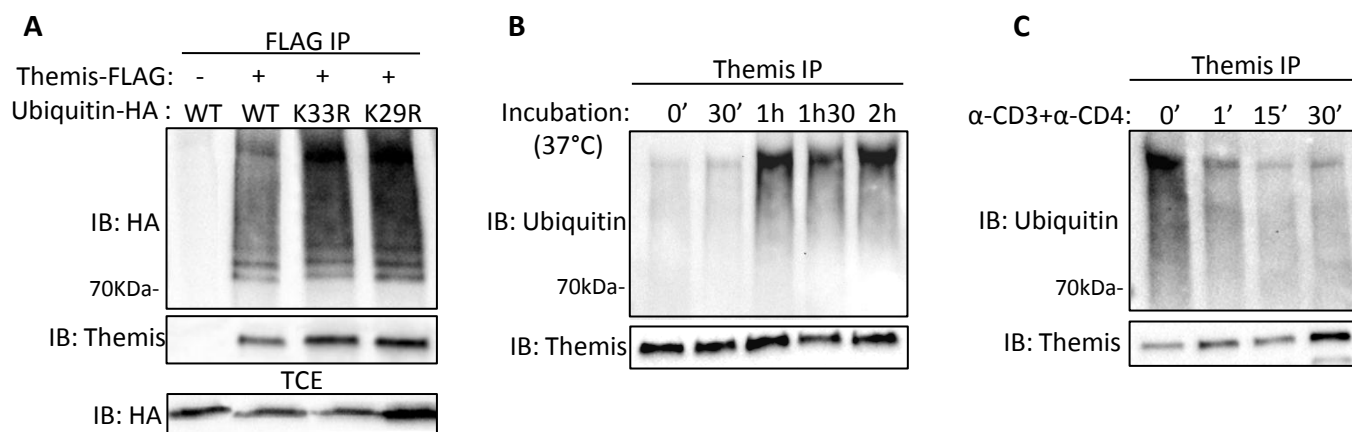


Figure S2: Themis ubiquitylation and expression are regulated by TCR engagement (A) Jurkat cells were transfected with plasmids encoding for FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding for HA-tagged ubiquitin wild-type or ubiquitin K33R or K29R. Themis ubiquitylation was analyzed by Western blotting. (B) Freshly isolated thymocytes were rested or not (0') during the indicated times at 37°C. Themis was immunoprecipitated from cellular extracts analyzed by Western blotting with anti-ubiquitin antibodies. (C) CD4 peripheral T cells were stimulated with premixed anti-CD3 and anti-CD4 antibodies for the indicated times. Themis was immunoprecipitated and ubiquitylation was analyzed by Western blotting. Western blots are from one experiment and are representative of three (A), four (B) or one (C) independent experiments.

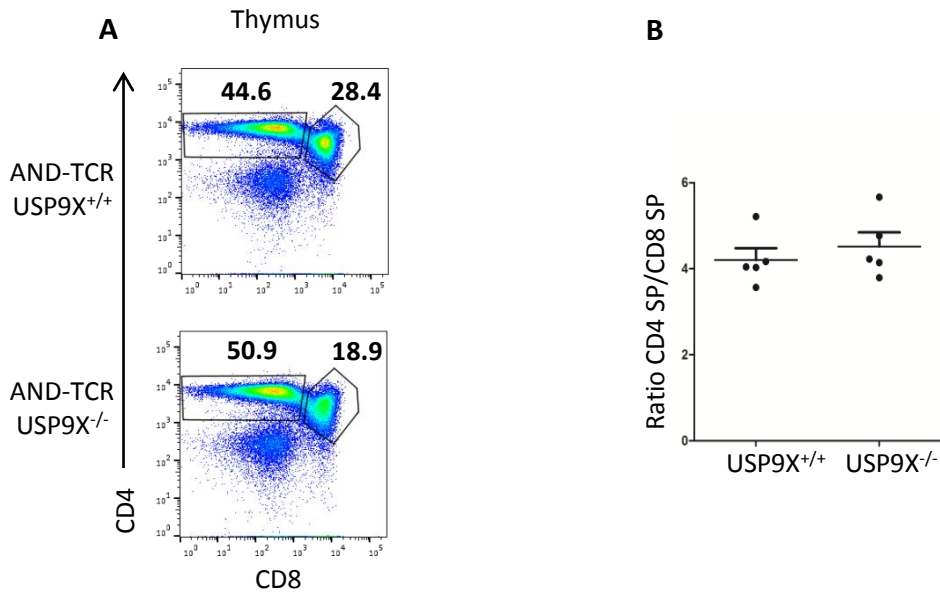


Figure S3: Normal positive selection and CD4 versus CD8 lineage commitment in *Usp9X*^{-/-} mice. (A) Flow cytometry analysis of positive selection in AND *Usp9X*^{-/-} mice. Contour plots represent the CD4 versus CD8 staining profiles of thymocytes from *Usp9X*^{+/+} and *Usp9X*^{-/-} mice expressing the AND TCR. (B) Graph represents the ratio of CD3^{hi} CD4 SP to CD3^{hi} CD8 SP thymocytes in *Usp9X*^{+/+} and *Usp9X*^{-/-} mice. Plots and graph are representative of two (A) and five (B) independent experiments.

Article 2: Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability

Plusieurs études initiales ont proposé que Themis agisse comme un régulateur positif des voies de signalisation des TCR. Cependant, deux articles ont par la suite proposé que Themis atténue les voies de signalisation en entraînant le recrutement de la phosphatase SHP-1 à LAT durant la stimulation des TCR avec des ligands de faible affinité afin de prévenir la sélection négative des lymphocytes T (Fu et al., 2013 ; Paster et al., 2015). Cependant, le développement des lymphocytes T n'est pas affecté dans les souris déficientes pour SHP-1 ou exprimant des formes « dominantes négatives » de cette phosphatase, ne récapitulant pas le phénotype des souris Themis^{-/-} (Carter et al., 1999 ; Johnson et al., 2013). Ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes moléculaires sont impliqués.

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre la fonction moléculaire de Themis au sein des complexes de signalisation des TCR durant le développement des lymphocytes T. Mon équipe a dans de nouvelles études utilisée des souris transgéniques Nur77-GFP permettant d'évaluer l'intensité des signaux des TCR dans les thymocytes en cours de développement (l'expression de la GFP étant corrélée à l'intensité des signaux). Ces expériences proposent que Themis joue un rôle positif sur les voies de signalisation des TCR durant la sélection positive des lymphocytes T. Pour décrire les mécanismes moléculaires impliqués, mon équipe a identifiée l'interactome de Themis dans les thymocytes en réalisant des expériences de spectrométrie de masse. Suite à ces résultats, nous nous sommes intéressés à la régulation du facteur d'échange Vav1 car c'est une des protéines effectrices les plus abondamment liées à Themis. De plus, il avait été décrit que la phosphorylation de Vav1 est diminuée dans les thymocytes SP de souris Themis^{-/-} (Lesourne et al., 2012). L'ensemble des résultats de cette étude suggèrent que Themis régule positivement l'activité de Vav1 durant la sélection positive. Nous avons également démontré que Themis contrôle l'expression de Grb2, un adaptateur important pour le recrutement de Vav1 à LAT, au niveau post-traductionnel. L'ensemble de nos résultats suggèrent que Themis stabilise l'expression de Grb2 ce qui favorise le recrutement de Vav1 à LAT durant l'engagement des TCR et facilite la sélection positive des lymphocytes T. Notre hypothèse est que Themis joue un rôle de régulateur positif de la signalisation déclenchée par les TCR.

Durant ce projet, j'ai participé à l'identification de l'interactome de Themis par spectrométrie de masse. En effet, j'ai réalisé les expériences d'immunoprécipitation des protéines Themis et de ses partenaires puis j'ai préparé les échantillons (purification et digestion des complexes protéiques) qui ont été séquencés par le spectromètre de masse. J'ai également réalisé des expériences pour la soumission et pour la révision du papier qui n'ont cependant pas été publiés.

Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability

Ekaterina Zvezdova,^{1*} Judith Mikolajczak,^{2,3,4,5*} Anne Garreau,^{2,3,4,5} Marlène Marcellin,⁶ Lise Rigal,^{2,3,4,5} Jan Lee,¹ Seeyoung Choi,¹ Gaëtan Blaize,^{2,3,4,5} Jérémy Argenty,^{2,3,4,5} Julien Familiades,^{2,3,4,5} Liqi Li,¹ Anne Gonzalez de Peredo,⁶ Odile Burlet-Schiltz,⁶ Paul E. Love,¹ Renaud Lesourne^{2,3,4,5†}

The T cell signaling protein Themis1 is essential for the positive and negative selection of thymocytes in the thymus. Although the developmental defect that results from the loss of Themis1 suggests that it enhances T cell receptor (TCR) signaling, Themis1 also recruits Src homology 2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) to the vicinity of TCR signaling complexes, suggesting that it has an inhibitory role in TCR signaling. We used TCR signaling reporter mice and quantitative proteomics to explore the role of Themis1 in developing T cells. We found that Themis1 acted mostly as a positive regulator of TCR signaling in vivo when receptors were activated by positively selecting ligands. Proteomic analysis of the Themis1 interactome identified SHP-1, the TCR-associated adaptor protein Grb2, and the guanine nucleotide exchange factor Vav1 as the principal interacting partners of Themis1 in isolated mouse thymocytes. Analysis of TCR signaling in Themis1-deficient and Themis1-overexpressing mouse thymocytes demonstrated that Themis1 promoted Vav1 activity both in vitro and in vivo. The reduced activity of Vav1 and the impaired T cell development in *Themis1*^{-/-} mice were due in part to increased degradation of Grb2, which suggests that Themis1 is required to maintain the steady-state abundance of Grb2 in thymocytes. Together, these data suggest that Themis1 acts as a positive regulator of TCR signaling in developing T cells, and identify a mechanism by which Themis1 regulates thymic selection.

INTRODUCTION

Both the positive and negative selection of thymocytes are required to optimize T cell responses to foreign antigens and to prevent autoimmune reactions against self-antigens. The affinities of T cell antigen receptors (TCRs) for self-peptides bound to the major histocompatibility complex (pMHC) determine the fate of T cells during selection in the thymus. Negative selection eliminates T cells that strongly interact with self-pMHC molecules, which could otherwise result in autoimmunity, whereas positive selection promotes the survival and maturation of T cells with relatively low affinity for self-pMHC molecules, favoring the development of cells with greater self-reactivity within a permissible range constrained by the negative selection threshold (1). The recognition of pMHCs by the TCR stimulates multiple intracellular signaling events that are modulated quantitatively and qualitatively on the basis of the strength of TCR-pMHC interaction to selectively trigger selection processes and to promote genetic programs required for T cell maturation and egress from the thymus. Whereas the signaling pathways activated by TCR engagement have been identified, it remains unclear how the intensity of TCR stimulation precisely

regulates the activation of downstream pathways such that two distinct outcomes [cell death (negative selection) or survival and continued maturation (positive selection)] can be elicited by engaging pMHC.

We and others identified the previously uncharacterized protein Themis1 as being required for the positive selection and maturation of T cells in the thymus (2–6). Themis1 lacks any discernable catalytic domain, but it contains two previously uncharacterized cysteine-based globular domains (named “CABIT”) of unknown structure and function (3). It also contains a bipartite nuclear localization signal (KR-X12-KRRPR) and a C-terminal proline-rich region (PRR) that matches a class II Src homology 3 (SH3) recognition motif. Themis1 is constitutively associated with the cytosolic adaptor protein Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) (5–7) and is recruited to the transmembrane adaptor protein LAT (linker of activated T cells) after TCR engagement, where it becomes rapidly phosphorylated by the protein tyrosine kinase Lck (8, 9).

Although Themis1 was identified as a component of the TCR signalosome, initial investigations failed to pinpoint a major alteration in TCR signaling in Themis1-deficient thymocytes; however, several experimental findings obtained from *Themis1*^{-/-} mice are consistent with there being reduced TCR signal strength. The cell surface abundance of the signaling sensor CD5 is reduced in CD4⁺CD8^{lo} *Themis1*^{-/-} thymocytes (5), whereas that of CD69 is decreased in the absence of Themis1 in preselected OT-I TCR transgenic CD4⁺CD8⁺ thymocytes [referred to as double-positive (DP) thymocytes] after stimulation through ovalbumin peptide-conjugated tetramers (2). In addition, negative selection and CD4⁺ T cell lineage commitment, which are dependent on intense or sustained TCR signals, respectively, are both impaired in *Themis1*^{-/-} mice (2, 5). In agreement with these studies of rodent thymocytes, human Themis1 enhances extracellular signal-regulated

¹Section on Cellular and Developmental Biology, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA. ²Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse F-31300, France. ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1043, Toulouse F-31300, France. ⁴Centre National de la Recherche Scientifique, U5282, Toulouse F-31300, France. ⁵Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse F-31300, France. ⁶Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse F-31077, France.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: renaud.lesourne@inserm.fr

kinase (ERK) phosphorylation and nuclear factor of activated T cells (NFAT)–activator protein 1 (AP1) luciferase promoter activity in Jurkat cells stimulated with TCR cross-linking antibodies (8). Further biochemical investigation to identify the molecular function of Themis1 has shown that it interacts with two other positive effectors of TCR signaling, phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) (2) and Vav1, a guanine nucleotide exchange factor (GEF) Rho family guanosine triphosphatases (GTPases) (9), in thymocytes, but the importance of these interactions for TCR signaling and T cell development remains obscure.

In contrast to these initial studies, one recent report proposed that Themis1 sets the threshold between positive and negative selection by acting as an attenuator of TCR signaling during positive selection mediated by low-affinity antigens (10). It was shown in that study that the loss of Themis1 results in enhanced calcium (Ca^{2+}) flux and increased phosphorylation of Lck, LAT, and ERK in preselected DP thymocytes that are stimulated by low-affinity pMHCs. Themis1 binds to the inhibitory protein tyrosine phosphatases SHP-1 (Src homology 2 domain-containing phosphatase-1) and SHP-2 in thymocytes (10) and Jurkat cells (11). The tyrosine phosphorylation of SHP-1 and its recruitment to LAT are reduced in *Themis1*^{-/-} thymocytes, which suggests that Themis1 inhibits early signaling events by controlling the activity and localization of SHP-1. On the basis of these results, it was proposed that Themis1 functions to “digitalize” TCR signaling to prevent the generation of strong signals that induce negative selection in response to relatively low-affinity TCR–self-pMHC interactions. However, this model is inconsistent with results obtained in vivo that indicate that negative selection and CD4⁺ T cell lineage commitment are impaired in *Themis1*^{-/-} mice. In addition, the proposed model is not fully supported by previous studies that showed that SHP-1 is not necessary for normal T cell development (12–15).

To gain further insight into the function of Themis1 during thymic selection, we analyzed the effect of Themis1 deficiency or overexpression on TCR signals elicited in vivo by positively selecting ligand interactions. Through experiments with TCR signaling reporter mice, we showed that Themis1 acted mostly as a positive regulator of TCR signaling during positive selection. Molecular analysis by quantitative mass spectrometry (MS) revealed that Themis1 interacted preferentially with Grb2, SHP-1, and Vav1, but to a lesser extent with SHP-2 and PLC- γ 1. Analysis of TCR signaling events in cells treated with either low or high concentrations of TCR cross-linking complexes demonstrated that Themis1 promoted the phosphorylation and activity of Vav1 independently of the strength of TCR stimulation. Further biochemical analysis revealed that the reduced phosphorylation and activation of Vav1 in *Themis1*^{-/-} thymocytes was due in part to the increased turnover of Grb2 in these cells, demonstrating a requirement for Themis1 in the maintenance of steady-state Grb2 protein abundance in thymocytes. Finally, we showed that positive selection was impaired in *Grb2*^{+/-} mice and was rescued by the transgenic expression of Themis1, suggesting that the reduction in Grb2 abundance accounted for part of the developmental defect observed in *Themis1*^{-/-} mice.

RESULTS

Signaling reporter mice identify a positive role for Themis1 in TCR signaling in vivo

Themis1 is a component of the TCR signaling machinery, but its precise function, and particularly whether it positively or negatively regulates TCR signaling responses, remains unclear. Some in vitro studies have proposed that Themis1 acts as a negative regulator of TCR signaling (10, 11); however, this is inconsistent with the developmental defect observed in *Themis1*^{-/-} mice, which supports a positive role for Themis1 in

TCR signaling (2, 3, 5, 9). To analyze the effect of Themis1 on the TCR signaling response to endogenous selecting ligands in developing thymocytes, we took advantage of the previously reported Nur77–green fluorescent protein (GFP) transgenic mouse model in which GFP abundance correlates with the intensity of TCR signals transmitted during positive or negative selection (16). We crossed *Themis1*^{-/-} mice with Nur77-GFP transgenic mice expressing a fixed MHC class II–restricted $\alpha\beta$ -TCR transgene (AND). GFP amounts were analyzed by flow cytometry ex vivo in preselection (TCR^{lo}CD69^{lo}) CD4 and CD8 DP thymocytes, in postselection DP thymocytes at early (TCR^{lo}CD69^{hi}) or late (TCR^{hi}CD69^{hi}) stages of positive selection, and in postselection CD4 single-positive (SP) thymocytes. As previously reported for mice on the wild-type C57BL/6 background, GFP abundance was low in preselection DP thymocytes and was increased in postselection DP thymocytes (Fig. 1A). GFP abundance was similar in preselection *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} DP thymocytes, but was reduced in *Themis1*^{-/-} DP thymocytes undergoing positive selection (Fig. 1A) and in *Themis1*^{-/-} CD4 SP thymocytes (fig. S1A). To further analyze the influence of Themis1 on TCR signaling, we next crossed AND–Nur77-GFP transgenic mice with mice that overexpress Themis1 (*Themis1*-tg). In these mice, Themis1 abundance was increased by about threefold in DP thymocytes compared to that in DP thymocytes in nontransgenic wild-type controls (fig. S1B). GFP amounts were comparable in preselection *Themis1*^{+/+} and *Themis1*-tg DP thymocytes, but were increased in postselection *Themis1*-tg DP thymocytes (Fig. 1A) and in CD4 SP thymocytes (fig. S1A). Together, these data suggest that Themis1 has a positive role in the regulation of TCR signaling during positive selection.

A previous report proposed that Themis1 acts as an attenuator of TCR signaling, such that in the absence of Themis1, positive selection signals, which promote the development of DP thymocytes to the SP stage, are converted to negative selection signals, leading to thymocyte apoptosis (10). On the basis of this model, the reduced amount of GFP that we observed in *Themis1*^{-/-} mice might reflect the absence of “strongly signaled” thymocytes (which would have been eliminated by apoptosis) rather than an intrinsic decrease in TCR signal strength that occurred because of a positive function of Themis1 in TCR signaling. To exclude this possibility, we analyzed the effect of Themis1 deficiency on GFP protein abundance in transgenic mice that overexpressed the prosurvival factor B cell lymphoma 2 (*Bcl2*-tg), which blocks negative selection (17, 18). We observed that DP thymocytes from *Bcl2*-tg mice had greater amounts of GFP at early and late stages of positive selection than did equivalent cell populations from non-*Bcl2*-tg mice (Fig. 1A), which was suggestive of the overall rescue of thymocyte clones that had received a strong signal through the TCR. However, we found that the amount of GFP in *Bcl2*-tg–*Themis1*^{-/-} DP thymocytes was reduced compared to that in *Bcl2*-tg–*Themis1*^{+/+} DP thymocytes (Fig. 1A). Together, these results suggest that the reduced TCR signaling observed in *Themis1*^{-/-} thymocytes was not caused by the elimination of thymocytes that exhibited enhanced TCR signaling, but rather reflected an intrinsic defect in TCR signaling in DP thymocytes.

We previously showed that the transgenic expression of *Bcl2* in *Themis1*^{-/-} mice restores the development of CD8 SP thymocytes, but not CD4 SP thymocytes, which also suggests that the block in CD4⁺ T cell development in *Themis1*^{-/-} mice did not result from an enhanced susceptibility of CD4 SP thymocytes to negative selection (5). It was proposed that disruption of *Bim* (a gene essential for negative selection) rescues CD4 SP development in *Themis1*^{-/-} mice; however, a detailed analysis of thymocyte maturation and mature T cells was not performed in that study (10). To examine in greater detail whether the disruption of *Bim* could rescue SP thymocyte maturation in *Themis1*^{-/-} mice, we recapitulated these experiments and analyzed the proportions of mature SP

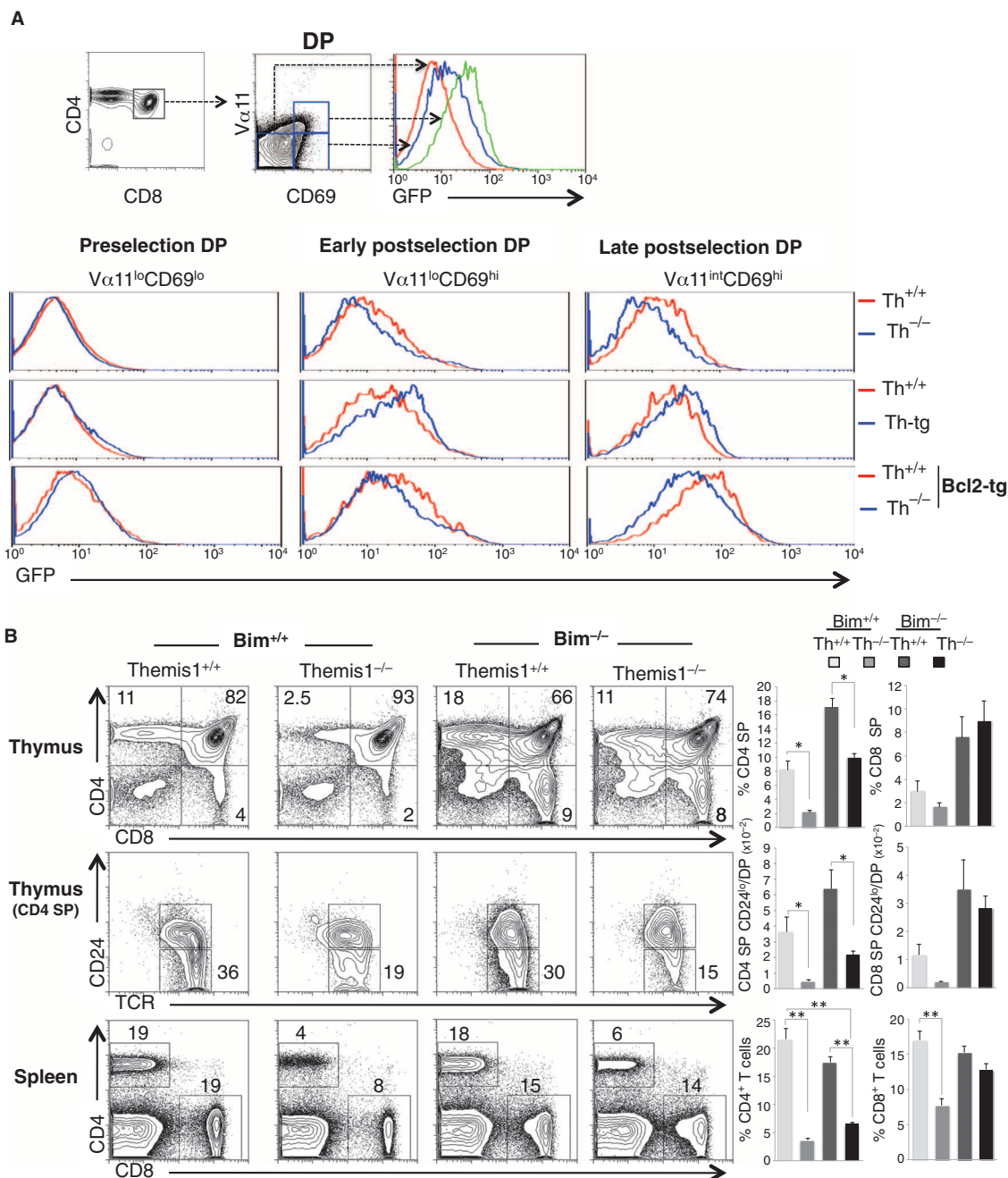


Fig. 1. Themis1 enhances TCR signaling during thymic positive selection. (A) Contour plots represent the gating strategy to analyze GFP expression in preselection (TCR^{lo}CD69^{lo}; red line in the GFP plot) and postselection (TCR^{lo}CD69^{hi} or TCR^{int}CD69^{hi}; blue and green lines in the GFP plot, respectively) DP thymocytes from AND-Nur77-GFP transgenic mice. The abundance of the AND TCR was analyzed with anti-Vα11 antibodies. Histograms represent GFP expression in pre- and postselection DP thymocytes from AND-Nur77-GFP transgenic mice that either do or do not express the Bcl2 transgene (Bcl2-tg). Thymocytes from *Themis1*^{+/+} mice (Th^{+/+}) were compared to those from *Themis1*^{-/-} mice (Th^{-/-}) or to Themis1 transgenic mice (Th-tg). Data are from one experiment and are representative of four independent experiments. (B) Left: Flow cytometric anal-

ysis of T cell development in *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} mice that are either sufficient (*Bim*^{+/+}) or deficient (*Bim*^{-/-}) in the proapoptotic factor Bim. Contour plots represent either CD4 versus CD8 staining profiles of thymocytes (top) and splenocytes (bottom) or CD24 versus TCR staining profiles of CD4 SP thymocytes (middle). Numbers indicate the percentage of cells in the gated population. Right: Bar graphs present the mean percentages of CD4 and CD8 SP thymocytes (top), the mean ratio of mature CD24^{lo} CD4 SP or CD24^{lo} CD8 SP thymocytes to DP thymocytes (middle), and the mean percentages of splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells (bottom). Data are means ± SEM of three independent experiments containing one mouse of each genotype. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 by two-tailed, unpaired *t* test.

thymocytes (CD24^{lo}) and peripheral T cells. We observed that, similar to the effect of Bcl2 overexpression, *Bim* disruption restored CD8 SP thymocyte development in *Themis1*^{-/-} mice (Fig. 1B). However, the percentages and numbers of CD4 SP thymocytes and CD4⁺ splenic T cells remained reduced in *Themis1*^{-/-}*Bim*^{-/-} mice compared to those in *Themis1*^{+/+}*Bim*^{-/-} control mice (Fig. 1B and fig. S1C). The percentages of CD24^{lo} CD4 SP thymocytes were also markedly reduced in *Themis1*^{-/-}*Bim*^{-/-} mice compared to those in *Themis1*^{+/+}*Bim*^{-/-} mice (Fig. 1B). These data suggest that the disruption of *Bim* does not rescue the block in CD4 SP T cell development in *Themis1*^{-/-} mice, and support the notion that Themis1 acts as a positive regulator of TCR signaling that promotes positive selection.

Quantitative proteomic analysis identifies SHP-1 and Vav1 as predominant interacting partners of Themis1 with effector functions in thymocytes

Previous studies reported that Themis1 interacts with several positive (PLC- γ 1, Grb2, SHP-2, and Vav1) and negative (SHP-1) regulators of TCR signaling, but the relative importance of these interactions remains unclear because some of these binding partners were identified in independent studies or within distinct cellular models through approaches that do not always enable global comparisons of protein-protein interactions. To determine which of these signaling proteins preferentially interacted with Themis1 during T cell development, and to investigate the mechanism by which Themis1 positively regulated TCR signaling, we performed an MS-based analysis of Themis1-containing signaling complexes in thymocytes. Themis1 was immunoprecipitated from wild-type or *Themis1*^{-/-} thymocytes that were untreated or treated with pervanadate. Protein complexes were eluted with antigenic peptides, and the components of the different purified complexes were characterized by nanoflow liquid chromatography combined with tandem MS. To estimate the relative abundances of the different interacting partners in the immunoprecipitated samples, we used the intensity-based absolute quantification (iBAQ) metric, which corresponds to the sum of all of the peptide intensities divided by the number of theoretically observable tryptic peptides of a protein (for further details, see Materials and Methods).

On the basis of our selection criteria (see Materials and Methods), we identified 42 potential interacting partners of Themis1 in thymocytes (table S1). We decided to focus our analysis on the most abundant interactors (mean iBAQ > 20 × 10⁵), which represented more likely direct binding partners of Themis1 or proteins that had a functional link with Themis1 (Fig. 2). Under these conditions, we found that Themis1 interacted mainly with distinct proteins in resting thymocytes (Fig. 2, A and B). Among these proteins was the cytosolic adaptor Grb2, the tyrosine phosphatase SHP-1 (also known as PTN6), and the Rho family GEF Vav1, which were previously reported to interact with Themis1 (5, 9, 10). In addition, we found that Themis1 constitutively interacted with the cytosolic adaptor protein GADS (also known as Grap2) and Lis1, a protein that has no reported function in T cells. Quantitative analysis of these interactions (with normalized iBAQ intensities) indicated that Grb2 was by far the most prominent binding partner of Themis1 in thymocytes (iBAQ = 980 × 10⁵), whereas the interactions between Themis1 and SHP-1 (iBAQ = 30 × 10⁵), Lis1 (iBAQ = 22 × 10⁵), Grap2 (iBAQ = 15 × 10⁵), and Vav1 (iBAQ = 10 × 10⁵) were quantitatively similar (Fig. 2A). Treatment of thymocytes with the phosphatase inhibitor pervanadate increased either moderately (by about 2-fold for Grb2 and Lis1) or strongly (by about 10-fold for SHP-1, Vav1, and Grap2) the extent of the associations between these proteins and Themis1 (Fig. 2A). Treatment of thymocytes with pervanadate also induced the association of Themis1 with additional proteins, including the transmembrane adaptor proteins LAT and SIT1 (SHP-2-interacting transmembrane adaptor

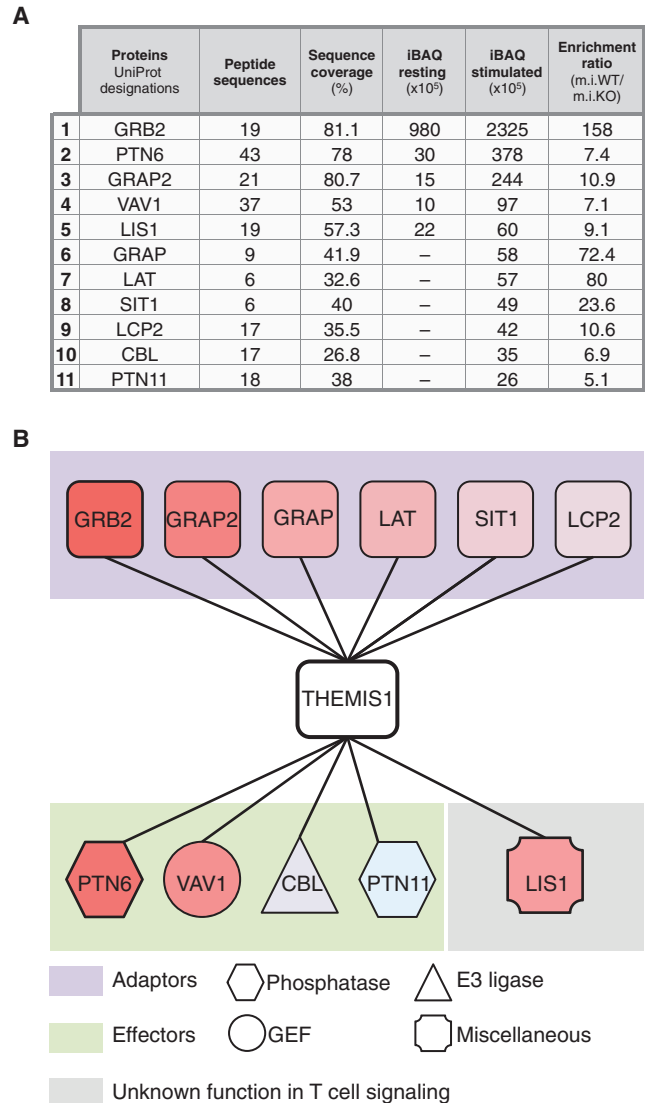


Fig. 2. Mass spectrometric analysis of the Themis1 interactome in thymocytes. (A) Table representing the main interactors of Themis1 in resting (unstimulated) thymocytes and in pervanadate-treated (stimulated) thymocytes from C57BL/6 mice. Proteins were filtered and sorted on the basis of the enrichment ratio (m.i., mean intensity) and the mean iBAQ metric as described in Materials and Methods. The complete list of proteins identified by proteomic analysis of Themis1-immunopurified samples is provided in table S1. WT, wild type; KO, knockout. (B) Schematic of those proteins that preferentially interact with Themis1 in stimulated thymocytes. Layouts indicate the classification of these proteins according to their signaling function (purple layout: adaptor proteins; green layout: effector proteins; gray layout: unknown function in T cell signaling). Keys indicate protein classification according to molecular function (phosphatase, GEF, and E3 ubiquitin ligase). Data are representative of three independent experiments.

protein), the cytosolic adaptors Grap (GRB2-related adaptor protein) and SLP-76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kD; also known as Lcp2), the E3 ubiquitin ligase c-Cbl, and the tyrosine phosphatase SHP-2 (also known as PTN11). Analysis of the iBAQ values indicated that the

interaction between Themis1 and SHP-2 (iBAQ = 26×10^5) was not as preponderant as those between Themis1 and other effector proteins, such as SHP-1 (iBAQ = 378×10^5) and Vav1 (iBAQ = 97×10^5). Note that PLC- γ 1, which was previously reported to interact with Themis1 in thymocytes, was detected in our current analysis with a statistically significant enrichment ratio in immunoprecipitated samples, but with only a low intensity value (iBAQ = 4×10^5), and thus was not selected in the list of major Themis1-interacting proteins (table S1).

Themis1 enhances Vav1 activity in thymocytes

Our analysis of the Themis1 interactome identified SHP-1 and Vav1 as the two predominant effector proteins that bound to Themis1 in thymocytes. Vav1 is a known positive regulator of TCR signaling that promotes guanosine diphosphate (GDP) to guanosine triphosphate (GTP) exchange on Rho family GTPase proteins (that is, it has GEF activity) and may also serve as an adaptor protein to stabilize the recruitment of PLC- γ 1 to the transmembrane adaptor protein LAT after TCR engagement (19). Knock-in mice expressing a GEF-deficient form of Vav1 exhibit a block in T cell development at the DP to SP transition, which is similar to the phenotype of *Themis1*^{-/-} mice (20). We therefore suspected that the impaired T cell development observed in *Themis1*^{-/-} mice might result, in part, from a defect in Vav1 GEF activity.

To first confirm the results obtained by our MS analysis, we used Western blotting to analyze the interaction between Themis1 and Vav1 in thymocytes stimulated with TCR cross-linking antibody complexes. Although Themis1 was coimmunoprecipitated with Vav1 from resting cells, the extent of the interaction between Themis1 and Vav1 was enhanced after TCR cross-linking (fig. S2A). Transfection of human embryonic kidney (HEK) 293T cells with complementary DNA encoding tagged versions of Themis1 and Vav1 showed that Vav1 coimmunoprecipitated with Themis1 only when cells were treated with pervanadate (fig. S2B). The coimmunoprecipitation of Vav1 with Themis1 was only mildly reduced when the PRR of Themis1, which is required for its interaction with Grb2, was deleted, indicating that Grb2 was not required for the interaction between Vav1 and Themis1 (fig. S2B).

We previously showed that the phosphorylation of Vav1 is impaired in *Themis1*^{-/-} CD4 SP thymocytes (9); however, two studies suggested that Themis1 acts primarily as an attenuator of TCR signaling when thymocytes are stimulated by low-affinity antigens (10, 11). The phosphorylation of Vav1 and its downstream substrates was not examined in these studies. To recapitulate with cross-linking antibodies what was previously reported with antigenic peptides, we incubated thymocytes with either low (3 μ g/ml) or high (30 μ g/ml) concentrations of preformed complexes of anti-CD3 and anti-CD4 antibodies to induce either weak or strong TCR stimulation. Consistent with previous reports that used antigenic peptides, we found that ERK phosphorylation was increased in *Themis1*^{-/-} thymocytes under weak stimulatory conditions, but was comparable to that in *Themis1*^{+/+} controls when strong stimuli were used to induce TCR signaling (Fig. 3A, top). The phosphorylation of SHP-1 was reduced in *Themis1*^{-/-} thymocytes whether low or high concentrations of antibodies were used. The phosphorylation of Vav1 was decreased in *Themis1*^{-/-} thymocytes when either weak or strong stimulation occurred (Fig. 3A). In comparison, the phosphorylation of Lck, ZAP-70 (ζ chain-associated protein kinase of 70 kD), LAT, and SLP-76, a cytosolic adaptor that associates with Vav1 (21), was similar in *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} thymocytes regardless of the strength of stimulus (Fig. 3A and fig. S3).

To demonstrate that Themis1 enhanced Vav1 activation during positive selection, we next analyzed the phosphorylation of Vav1 by intracytoplasmic staining in pre- and postselection DP thymocytes from *Themis1*^{-/-} AND-TCR transgenic mice. We observed that postselection wild-type DP

thymocytes had increased amounts of phosphorylated Vav1 compared to those of preselection wild-type DP thymocytes (Fig. 3B). Confirming the data obtained from experiments with TCR cross-linking antibodies, we found that Vav1 was less phosphorylated in *Themis1*^{-/-} postselection DP thymocytes than in *Themis1*^{+/+} postselection DP thymocytes (Fig. 3B).

The phosphorylation of Tyr¹⁷⁴ and Tyr¹⁶⁰ of Vav1 relieves its catalytic Dbl homology domain from its autoinhibitory conformation and causes Vav1 to promote GDP to GTP exchange on the small GTPase Rac1 (22). The GTP-bound form of Rac1 then stimulates signaling that leads to the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 (23, 24). To investigate the effect of Themis1 on signaling events downstream of Vav1, we analyzed the extent of phosphorylation of p38 and the abundance of Rac1-GTP generated after TCR cross-linking. The amount of phosphorylated p38 was reduced in *Themis1*^{-/-} thymocytes compared to that in *Themis1*^{+/+} thymocytes when either low or high concentrations of antibody complexes were used (Fig. 3A). The amount of Rac1-GTP generated was also reduced in *Themis1*^{-/-} thymocytes compared to that in *Themis1*^{+/+} control thymocytes when cells were stimulated with a high concentration of antibody complexes (Fig. 3C). Together, these data suggest that Themis1 enhances Vav1 activity in thymocytes.

The abundance of Grb2 protein is reduced in *Themis1*^{-/-} thymocytes

We next investigated the mechanism by which Themis1 stimulates Vav1 activity in thymocytes. TCR cross-linking stimulates the translocation of Vav1 to the submembranous area and results in its recruitment to the transmembrane adaptor protein LAT where it becomes phosphorylated and activated by ZAP-70 (25). Because Themis1 interacts with both Vav1 and LAT after TCR engagement, we examined the possibility that Themis1 was important to enhance the recruitment of Vav1 to LAT. Similar amounts of Vav1 were coimmunoprecipitated with LAT from *Themis1*^{-/-} and *Themis1*^{+/+} thymocytes at the earliest time point of stimulation with cross-linking antibodies (Fig. 4A); however, the recruitment of Vav1 to LAT was impaired in *Themis1*^{-/-} thymocytes when the cells were stimulated for longer periods of time (Fig. 4A). In comparison, the recruitment to LAT of the enzyme PLC- γ 1, which poorly interacts with Themis1 in thymocytes, appeared to be similar in *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} thymocytes (Fig. 4A).

A possible explanation for this observation is that Themis1 directly interacts with Vav1 after its recruitment to LAT and that it contributes to the enrichment of Vav1 proteins in LAT signaling complexes. Alternatively, Themis1 might be required to stabilize the interaction between Vav1 and cytosolic adaptors, such as Grb2 and SLP-76, which mediate the binding of Vav1 to LAT (26–31). Therefore, we examined whether Themis1 regulated the interaction between Vav1 and these two adaptor proteins. Western blotting analysis showed that the amount of Grb2 that coimmunoprecipitated with Vav1 was decreased in *Themis1*^{-/-} thymocytes compared to that in *Themis1*^{+/+} cells, regardless of whether the cells were stimulated with preformed antibody complexes (Fig. 4B). Similar amounts of phosphorylated SLP-76 were coimmunoprecipitated with Vav1 under the identical stimulation conditions, supporting a selective effect of Themis1 on the formation of Grb2-Vav1 signaling complexes (Fig. 4B). Furthermore, analysis of *Themis1*^{-/-} thymocyte extracts revealed that the total cellular abundance of Grb2 was reduced relative to that in *Themis1*^{+/+} thymocytes (Fig. 4B, right panel). Quantification of Grb2 protein abundance in whole-cell lysates revealed that it was reduced by about twofold in *Themis1*^{-/-} thymocytes and was comparable to the amount of Grb2 protein in *Grb2*^{+/-} thymocytes (Fig. 4C). Further analysis by flow cytometry showed that Grb2 abundance was reduced similarly in DP and SP thymocytes from *Themis1*^{-/-} mice (Fig. 4D), suggesting that the reduction in Grb2 abundance in

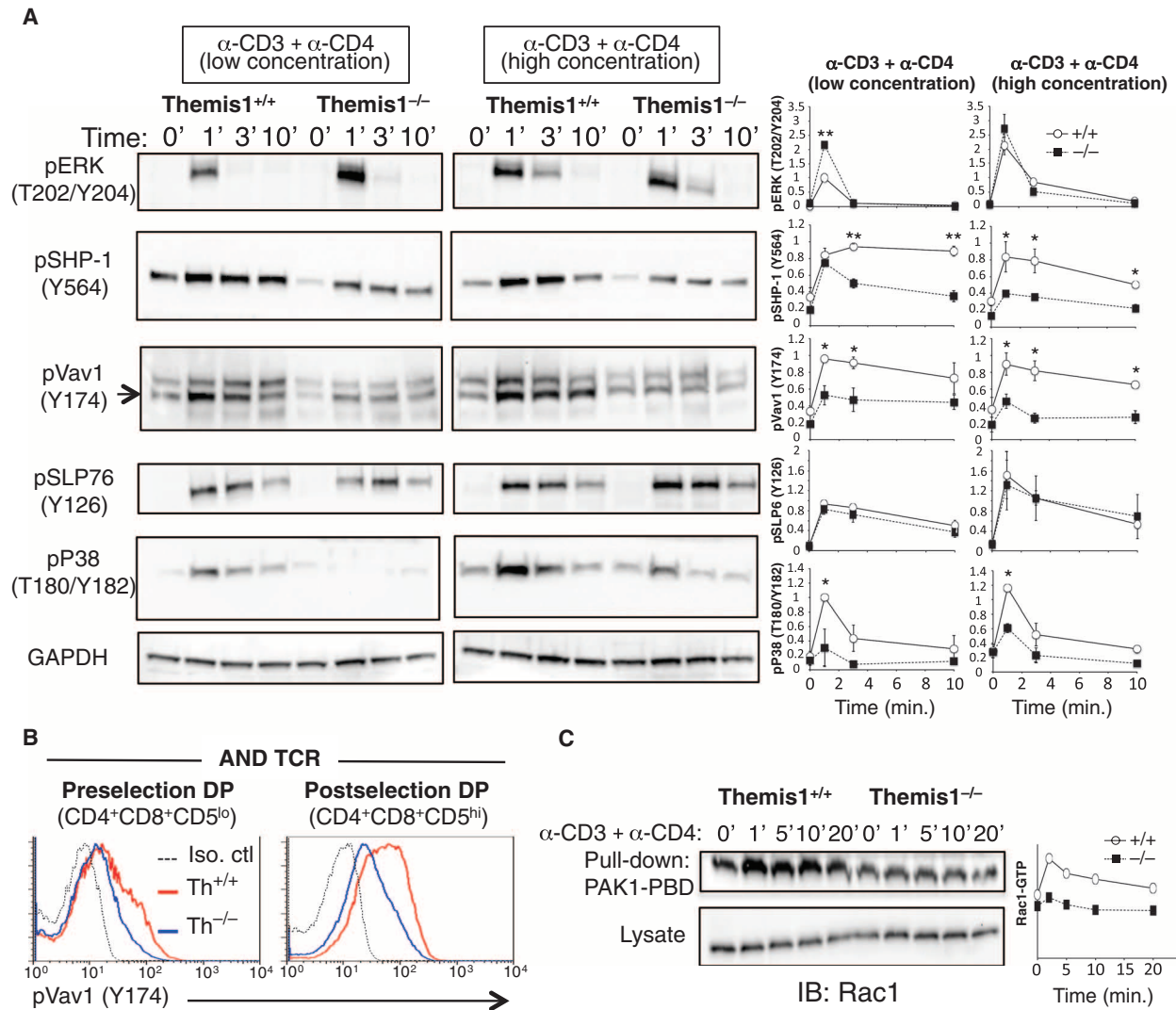


Fig. 3. Themis1 enhances Vav1 activity in thymocytes. (A) Left: Thymocytes from *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} mice were stimulated with low (3 μ g/ml) or high (30 μ g/ml) concentrations of preformed anti-CD3 and anti-CD4 antibody complexes for the indicated times. Total cytoplasmic extracts of the cells were then analyzed by Western blotting with antibodies against phosphorylated forms of ERK, SHP-1, Vav1, SLP-76, and p38 MAPK. Right: Graphs show the relative abundances of the indicated phosphorylated proteins as determined by calculating the ratios of the intensities of the bands corresponding to the phosphorylated proteins to those corresponding to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), the loading control. The y axes represent means \pm SD of the relative values calculated after normalization to the highest value in the low-dose condition. Data are from four independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 by two-tailed, unpaired *t* test. (B) Analysis of Vav1

Themis1^{-/-} thymocytes relative to that in *Themis1*^{+/+} thymocytes was not a result of reduced numbers of SP thymocytes in *Themis1*^{-/-} mice. The amounts of Grb2 that were coimmunoprecipitated with other known Grb2 binding partners, such as c-Cbl and Sos1, were also reduced in *Themis1*^{-/-} thymocytes compared to those in wild-type controls (fig. S4). Moreover,

phosphorylation by intracytoplasmic staining of thymocytes from AND-TCR transgenic mice that were either sufficient (Th^{+/+}) or deficient (Th^{-/-}) in Themis1. Histograms represent Vav1 phosphorylation on Tyr¹⁷⁴ (Y174) in gated preselection (CD5^{lo}) and postselection (CD5^{hi}) DP thymocytes. Data are representative of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. (C) Left: Thymocytes from *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} mice were stimulated with high-dose anti-CD3 (α -CD3) and anti-CD4 (α -CD4) antibodies (30 μ g/ml) for the indicated times. Cells were then lysed and subjected to Rac1-GTP pull-downs with a GST-PAK1-RBD fusion protein. Pull-downs and total cytoplasmic lysates were then analyzed by Western blotting (IB) with an anti-Rac1 antibody. Western blots are representative of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. Right: Graphs show the ratios of Rac1-GTP to total Rac1. Data are representative of three independent experiments.

and similar to what we previously observed for Vav1, the recruitment of Grb2 to LAT was normal at early time points after TCR stimulation but was progressively impaired in *Themis1*^{-/-} thymocytes at later time points (Fig. 4A). To test whether the partial reduction in Grb2 abundance in *Themis1*^{-/-} thymocytes accounted for the impaired activity of Vav1 in

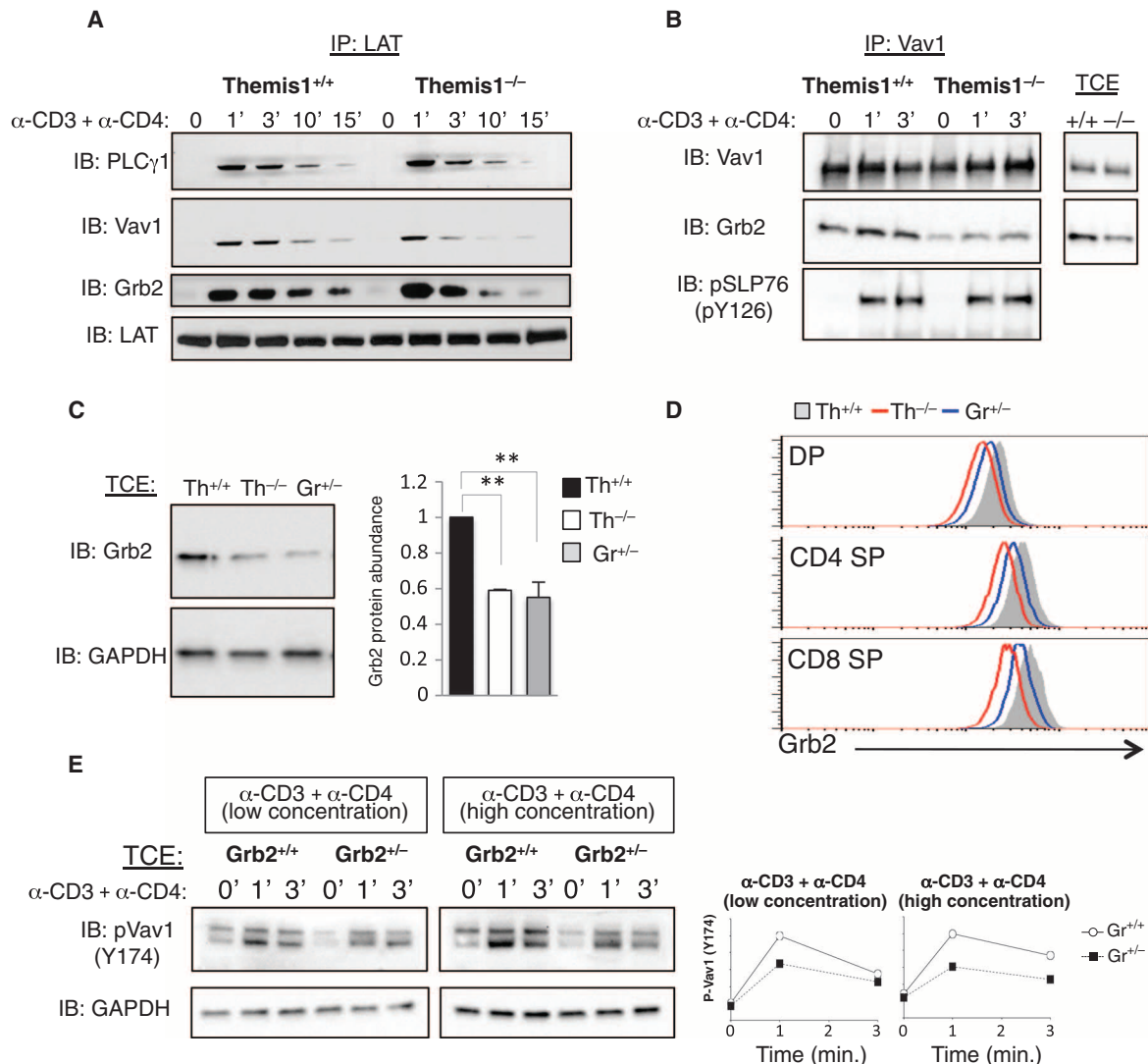


Fig. 4. Grb2 protein abundance is reduced in *Themis1^{-/-}* thymocytes. (A and B) Thymocytes from *Themis1^{+/+}* and *Themis1^{-/-}* mice were stimulated with premixed high-dose anti-CD3 (α -CD3) and anti-CD4 (α -CD4) antibodies (30 μ g/ml) for the indicated times. Samples were then subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies specific for LAT (A) or Vav1 (B) and then analyzed by Western blotting with antibodies specific for the indicated proteins. Western blots are from one experiment and are representative of three independent experiments. (B) Total cytoplasmic extracts (TCE) from each sample were analyzed by Western blotting with antibodies against Vav1 or Grb2. (C) Left: Total cytoplasmic extracts of thymocytes from *Themis1^{+/+}* ($Th^{+/+}$), *Themis1^{-/-}* ($Th^{-/-}$), and *Grb2^{+/-}* ($Gr^{+/-}$) mice were analyzed by Western blotting with anti-Grb2 and anti-GAPDH antibodies. Right: Densitometric analysis of the ratio of Grb2 band intensities to GAPDH band intensities normalized to the ratio in WT control thymocytes,

these cells, we compared the extent of Vav1 phosphorylation in *Grb2^{+/+}* and *Grb2^{+/-}* thymocytes stimulated with low or high concentrations of preformed antibody complexes. Supporting this idea, Western blotting analysis showed that Vav1 phosphorylation was also reduced in *Grb2^{+/-}* thymocytes under both stimulatory conditions (Fig. 4E).

which was set at 1. Data are means \pm SD of four independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. $**P < 0.01$ by two-tailed, unpaired *t* test. (D) Flow cytometric analysis of Grb2 abundance in DP, CD4 SP, and CD8 SP thymocyte subsets from *Themis1^{+/+}* ($Th^{+/+}$), *Themis1^{-/-}* ($Th^{-/-}$), and *Grb2^{+/-}* ($Gr^{+/-}$) mice. Data are representative of three independent experiments. (E) Left: Thymocytes from *Grb2^{+/+}* and *Grb2^{+/-}* mice were stimulated with low (3 μ g/ml) or high (30 μ g/ml) concentrations of preformed anti-CD3 and anti-CD4 antibody complexes for the indicated times. Total cytoplasmic extracts of the cells were then analyzed by Western blotting with antibody against pVav1. Right: Graphs show the relative abundance of pVav1, as determined from a ratio of the intensity of the pVav1 bands to those of the bands corresponding to the GAPDH loading control. Western blots and densitometry are from a single experiment and are representative of three independent experiments.

***Themis1^{-/-}* thymocytes exhibit increased turnover of Grb2 protein**

To investigate the mechanisms leading to the reduction in Grb2 protein abundance in *Themis1^{-/-}* thymocytes, we first quantified *Grb2* mRNA by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. *Grb2* mRNA

amounts were similar in *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} thymocytes, indicating that the reduction in Grb2 protein abundance in *Themis1*^{-/-} thymocytes was likely a result of posttranscriptional effects (Fig. 5A). The direct interaction between Themis1 and Grb2 suggested the possibility that Themis1 might regulate Grb2 protein stability and turnover in thymocytes. To investigate this possibility, we incubated thymocytes from *Themis1*^{+/+} or *Themis1*^{-/-} mice with cycloheximide for 18 hours to interrupt protein synthesis and then measured Grb2 protein abundance by

intracellular staining and flow cytometry. Whereas the amount of Grb2 protein was reduced by about 10% in cycloheximide-treated *Themis1*^{+/+} thymocytes, it was reduced by 30% in *Themis1*^{-/-} thymocytes (Fig. 5B), which suggests that Grb2 turnover was accelerated in *Themis1*^{-/-} thymocytes. Next, we treated thymocytes with MG132 for 18 hours to inhibit proteasome-mediated protein degradation. Under these conditions, Grb2 abundance in *Themis1*^{-/-} thymocytes increased from 60 to 80% of that in control *Themis1*^{+/+} thymocytes, demonstrating that blockade of proteasome-mediated protein degradation partially restored Grb2 abundance in *Themis1*^{-/-} thymocytes (Fig. 5C). Because ubiquitylation plays a major role in targeting proteins for proteasome-mediated degradation, we evaluated the amount of ubiquitylated Grb2 in *Themis1*^{-/-} thymocytes by Western blotting analysis. Under conditions in which similar amounts of Grb2 were immunoprecipitated from thymocyte lysates, the amount of ubiquitylated Grb2 was increased in *Themis1*^{-/-} thymocytes compared to that in wild-type controls (Fig. 5D). Because c-Cbl was identified by our MS analysis as being among the preferential binding partners of Themis1 in thymocytes, we suspected that c-Cbl might regulate Grb2 degradation and that Themis1 might inhibit this process. However, we found that Grb2 protein amounts were unaffected in *c-Cbl*^{-/-} thymocytes (fig. S5A). In addition, we found that the TCR-stimulated phosphorylation of c-Cbl was similar in *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} thymocytes (fig. S5B).

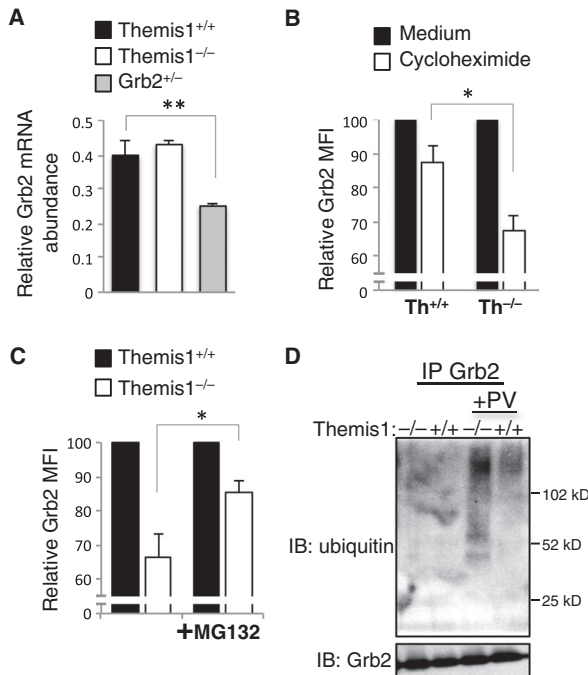


Fig. 5. Grb2 protein turnover is increased in *Themis1*^{-/-} thymocytes. (A) RT-PCR analysis of *Grb2* mRNA abundance in total thymocytes from *Themis1*^{+/+}, *Themis1*^{-/-}, and *Grb2*^{+/-} mice. Data are means ± SD of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. (B) Thymocytes from *Themis1*^{+/+} (*Th*^{+/+}) and *Themis1*^{-/-} (*Th*^{-/-}) mice were left untreated (black bars) or were treated (white bars) for 16 to 18 hours with cycloheximide (10 μg/ml). Grb2 protein abundance was then analyzed by flow cytometry after intracytoplasmic staining of the cells with anti-Grb2 antibodies. Bar graphs show relative mean fluorescence intensities (MFIs) of Grb2 in treated cells as a percentage of the MFI of Grb2 in untreated cells, which was set at 100%. Data are means ± SD of three mice of each genotype. (C) Thymocytes from *Themis1*^{+/+} (black bars) and *Themis1*^{-/-} mice (white bars) were left untreated or were treated with 1 mM MG132 for 16 to 18 hours. Grb2 protein abundance was analyzed by flow cytometry after intracytoplasmic staining of cells with anti-Grb2 antibodies. Bar graphs show the relative MFIs of Grb2 in treated cells as a percentage of the MFI of Grb2 in *Themis1*^{+/+} thymocytes, which was set at 100%. Data are means ± SD of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. (D) Thymocytes from *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} mice were preincubated with MG132 and left untreated or treated with pervanadate (PV) for 5 min at 37°C. Grb2 was then immunoprecipitated from cellular extracts as described in Materials and Methods. Samples were analyzed by Western blotting with anti-ubiquitin and anti-Grb2 antibodies. Western blots are representative of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. Data in (A) to (C) were analyzed by two-tailed unpaired *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

Increased Grb2 abundance and Vav1 phosphorylation in *Themis1*-tg mice correlate with enhanced positive selection of CD4 SP T cells

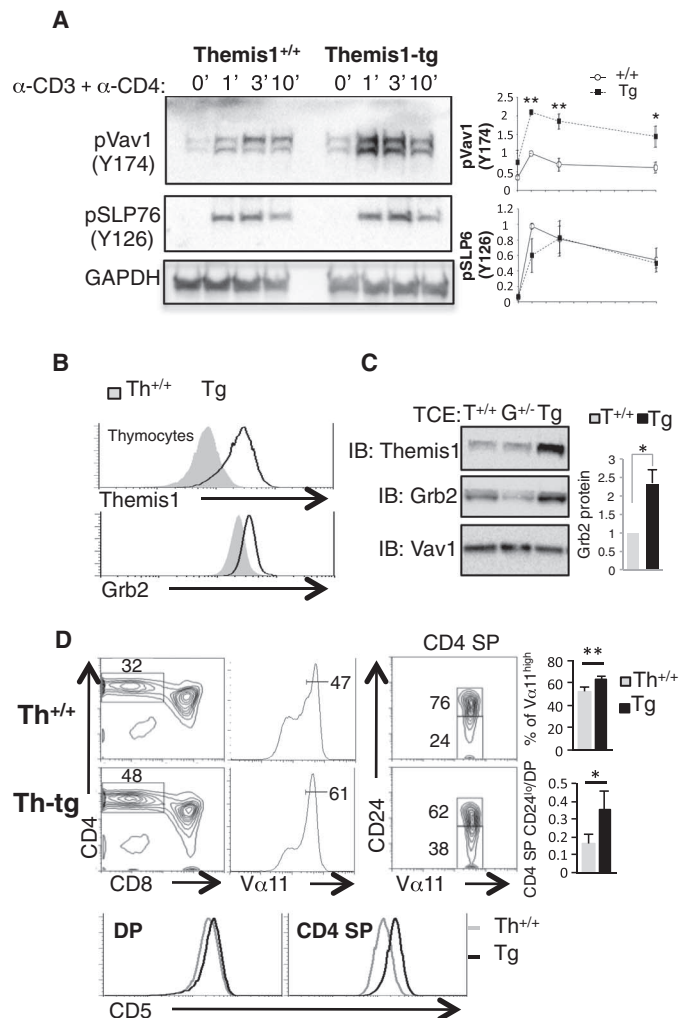
The strength of TCR signaling was increased in vivo when Themis1 was overexpressed (*Themis1*-tg) in AND TCR transgenic thymocytes (Fig. 1A). We therefore examined the consequences of Themis1 overexpression on Vav1 phosphorylation and Grb2 protein abundance. The extent of Vav1 phosphorylation induced by low (Fig. 6A) or high (fig. S6A) concentrations of preformed anti-CD3 and anti-CD4 antibody complexes was increased in thymocytes in which Themis1 was overexpressed. Western blotting and flow cytometric analyses showed that Grb2 abundance was increased by about twofold in *Themis1*-tg thymocytes compared to that in *Themis1*^{+/+} controls (Fig. 6, B and C). In addition, the extent of the interaction between Grb2 and Vav1 and LAT was increased in *Themis1*-tg thymocytes compared to that in *Themis1*^{+/+} controls (fig. S6B).

We next analyzed the consequences of Themis1 overexpression on T cell development. The percentages and numbers of CD4 and CD8 SP thymocytes were unaffected in *Themis1*-tg mice compared to that in littermate controls (fig. S7A). However, in *Themis1*-tg mice that also expressed the MHC class II-restricted AND transgenic TCR, the percentages of CD4 SP thymocytes and *Vα1*^{high} thymocytes were increased relative to those in non-*Themis1*-tg controls (Fig. 6D). The percentage of mature CD24^{lo} CD4 SP thymocytes was increased in AND-*Themis1*-tg mice, which is indicative of increased positive selection (Fig. 6D). In addition, the numbers of DP thymocytes, and, to a lesser extent, of CD4 SP thymocytes, were reduced in AND-TCR-*Themis1*-tg mice compared to those in non-*Themis1*-tg controls (fig. S7B), suggesting that the enhanced TCR signaling in *Themis1*-tg thymocytes may also partly convert positive selection signals into negative selection signals. The cell surface expression of CD5, a signaling marker that correlates with TCR signal intensity (32), was also increased on DP and SP thymocytes in AND-*Themis1*-tg mice (Fig. 6D), consistent with results obtained from Nur77-GFP transgenic mice (Fig. 1A).

Overexpression of Themis1 enhances TCR signaling and rescues positive selection in *Grb2*^{+/-} mice

Consistent with a previous report (33), the phosphorylation of Vav1 and p38 was reduced in TCR-stimulated *Grb2*^{+/-} thymocytes compared to

Fig. 6. Transgenic expression of Themis1 in thymocytes increases Grb2 protein abundance and improves positive selection. (A) Left: Thymocytes from Themis1 WT (Themis1^{+/+}) and Themis1 transgenic (Themis1-tg) mice were stimulated with preformed anti-CD3 and anti-CD4 antibody complexes (3 μ g/ml) for the indicated times. Total cytoplasmic extracts were then analyzed by Western blotting with antibodies against pVav1 and pSLP76. GAPDH was used as a loading control. Right: Graphs show the relative abundances of the phosphorylated proteins as determined from a ratio of the intensity of the bands of phosphorylated proteins to those of GAPDH. The y axes represent means \pm SD of the relative values calculated after normalization to the highest value in Themis1^{+/+} thymocytes. Data are from three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. * P < 0.05, ** P < 0.01 by two-tailed, unpaired t test. Western blots are from one experiment and are representative of three independent experiments. (B) Flow cytometric analysis of Grb2 and Themis1 in total thymocytes from Themis1 transgenic mice (Tg) or littermate controls (WT). Data are representative of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. (C) Left: Western blotting analysis of the relative amounts of Themis1, Grb2, and Vav1 in total thymocytes from Themis1 transgenic mice (Tg), WT littermate controls (T^{+/+}), and *Grb2*^{+/-} (*Gr*^{+/-}) mice. Right: Bar graphs show the mean ratio \pm SD of Grb2 band intensity values to Vav1 band intensity values, normalized to the ratio in T^{+/+} control thymocytes, which was set at 1. Data are means \pm SD of three mice of each genotype. ‡ P < 0.05 by two-tailed, unpaired t test. (D) Flow cytometric analysis of positive selection in AND Themis1 transgenic mice (Th-tg). Left: Contour plots represent the CD4 versus CD8 staining profiles of thymocytes from Themis1-tg mice and WT littermate controls (Th^{+/+}) expressing the AND TCR. Histograms represent AND TCR surface staining with anti-V α 11 antibodies. Right: CD24 versus V α 11 staining profiles of CD4 SP thymocytes from Themis1-tg and littermate control mice expressing the AND TCR. Numbers indicate the percentage of cells in the gated population. Right: Bar graphs show the mean percentages of V α 11^{hi} cells (top) and the mean ratio of mature CD4 SP (CD24^{lo}) thymocytes to total DP thymocytes (bottom) in Themis1-tg and littermate control (WT) mice. Data are means \pm SD of nine mice of each genotype. Five independent experiments were performed. * P < 0.05, ** P < 0.01 by two-tailed, unpaired t test. Bottom: Cell surface staining of CD5 on gated DP and CD4 SP thymocyte subsets from Themis1-tg (Tg) and littermate control (Th^{+/+}) mice. Data are representative of three independent experiments.



that in *Grb2*^{+/+} thymocytes (Fig. 4E). Because the overexpression of Themis1 in thymocytes resulted in increased Grb2 abundance and enhanced Vav1 phosphorylation in response to TCR engagement, we next examined whether overexpression of Themis1 could restore the amount of Grb2 and rescue the TCR signaling defects in *Grb2*^{+/-} thymocytes. Western blotting analysis revealed that transgene-mediated overexpression of Themis1 increased the abundance of Grb2 in *Grb2*^{+/-} thymocytes to amounts that were comparable to those in *Grb2*^{+/+} thymocytes (Fig. 7A). Moreover, phosphorylation of Vav1 and p38 in response to TCR engagement was restored when Themis1 was overexpressed in *Grb2*^{+/-} thymocytes (Fig. 7B). Activation-induced phosphorylation of ERK was similar in *Grb2*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} thymocytes irrespective of whether the Themis1 transgene was expressed (Fig. 7B).

We next examined whether Themis1 overexpression in *Grb2*^{+/-} mice restored the defect in T cell development that occurs in these mice. Conditional deletion of *Grb2* in thymocytes impairs T cell development at the DP to SP transition and induces a block in positive selection that resembles what is observed in *Themis1*^{-/-} mice (34). A previous report demonstrated that negative selection is impaired in *Grb2*^{+/-} mice but

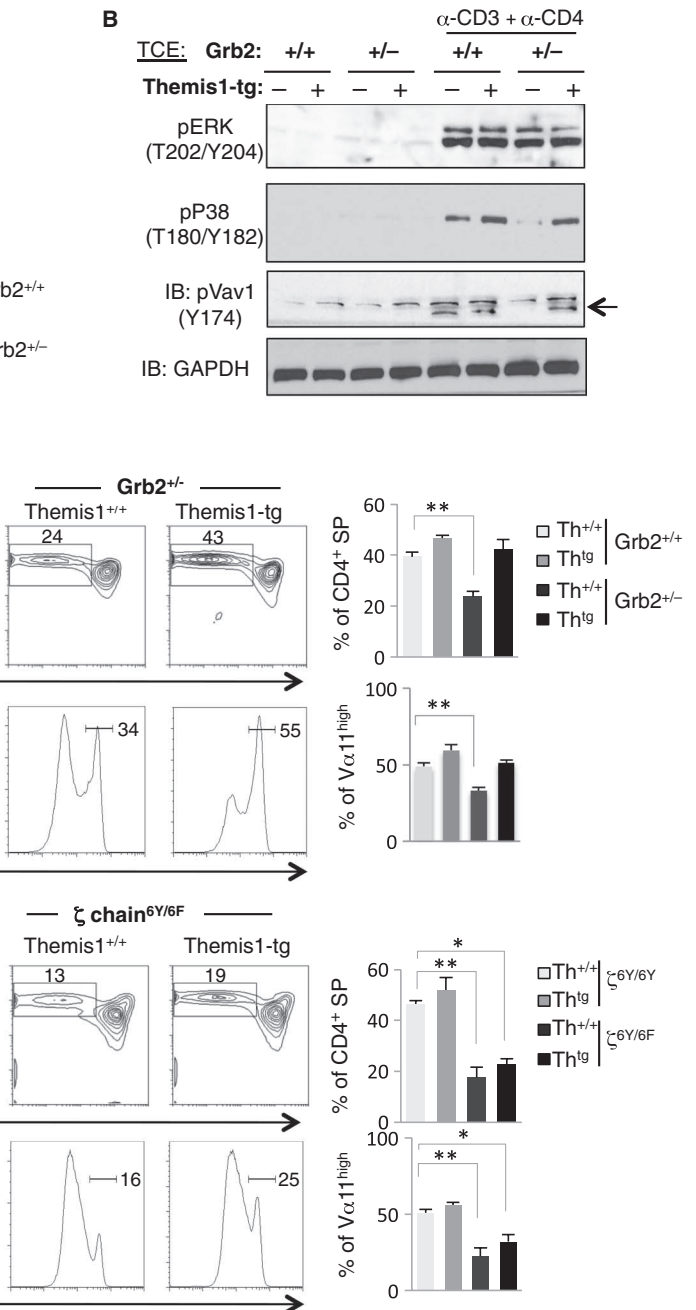
that positive selection is not affected (33). In that study, the authors used the MHC class I-restricted H-Y TCR transgenic and the MHC class II-restricted DO.11 TCR transgenic mice to evaluate positive selection. In contrast to these observations, we found that the proportions of CD4 SP thymocytes and V α 11^{high} thymocytes were reduced by 40 to 50% in AND-*Grb2*^{+/-} mice compared to that in AND-*Grb2*^{+/+} mice (Fig. 7C and fig. S8A). Positive selection was also impaired, although to a lesser extent, in OT-2-*Grb2*^{+/-} mice (fig. S8B). Note that Themis1 overexpression corrected the defect in positive selection caused by Grb2 haploinsufficiency as demonstrated by the restoration of normal proportions of CD4 SP and either V α 11^{high} (for AND) or V α 2^{high} (for OT-2) T cells in the thymus (Fig. 7C and fig. S8, A and B).

To determine whether Themis1 overexpression restored T cell development in mice that exhibit a TCR signaling defect that is not linked to Grb2 signaling complexes, we crossed AND-Themis1-tg mice with knock-in mice that express a mutant CD3 ζ chain protein that lacks signaling capability (ζ ^{6E/6F}). We previously reported that TCR signaling is attenuated in homozygous ζ ^{6E/6F} mice, which exhibit a block in positive selection at the DP stage. AND- ζ ^{6Y/6F} mice, which have one copy of wild-type ζ ^{6Y} and one copy

Fig. 7. Transgenic expression of Themis1 in *Grb2*^{+/-} mice restores TCR signaling and positive selection. (A) Top: Total cytoplasmic extracts of thymocytes from *Grb2*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} mice that either expressed (+) or did not express (-) the Themis1 transgene (Themis1-tg) were analyzed by Western blotting with anti-Grb2 and anti-GAPDH antibodies. **Bottom:** Bar graphs show the mean ratio of Grb2 intensity values to GAPDH intensity values normalized to the ratio in WT control thymocytes, which was set at 1. Data are means ± SD of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. **(B)** Thymocytes from *Grb2*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} mice that either expressed (+) or did not express (-) the Themis1 transgene (Themis1-tg) were stimulated with preformed anti-CD3 and anti-CD4 antibody complexes (30 μg/ml) for the indicated times. Total cytoplasmic extracts were analyzed by Western blotting with antibodies against the indicated phosphorylated proteins. Western blots are representative of three independent experiments. **(C)** Flow cytometric analysis of positive selection in AND-*Grb2*^{+/+} and in AND-*Grb2*^{+/-} mice that did or did not express the Themis1 transgene (Themis1-tg). Contour plots represent CD4 versus CD8 staining profiles of thymocytes from mice of the indicated genotypes. Histograms represent the cell surface staining of the AND TCR on total thymocytes with anti-Vα11 antibodies. Numbers indicate the percentages of cells in the gated populations. Right: Bar graphs show the mean percentages of CD4 SP thymocytes (top) and Vα11^{high} thymocytes (bottom) from mice of the indicated genotypes. Data are means ± SD of five mice (for *Themis1*^{+/+} and *Grb2*^{+/-}) or three mice (for Themis1-tg and Themis1-tg/*Grb2*^{+/-}). **(D)** Flow cytometric analysis of positive selection in AND ζ ^{6Y/6Y} and AND ζ ^{6Y/6F} mice that did or did not express the Themis1 transgene (Themis1-tg). Contour plots represent CD4 versus CD8 staining profiles of thymocytes from the in-

dicated genotypes. Histograms represent AND TCR cell surface staining with anti-Vα11 antibodies on total thymocytes. Numbers indicate the percentages of cells in the gated populations. Right: Bar graphs show the mean percentages of CD4 SP thymocytes (top) and Vα11^{high} thymocytes (bottom) from mice of the indicated genotypes. Data are means ± SD of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. Data in (A), (C), and (D) were analyzed by two-tailed, unpaired *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

of mutant ζ ^{6F}, displayed a less severe, but statistically significant, defect in positive selection (Fig. 7D and fig. S8C). The percentages of CD4 SP thymocytes and Vα11^{high} thymocytes were reduced by about 70% in AND- ζ ^{6Y/6F}



mic compared to those in AND- ζ ^{6Y/6Y} control mice (Fig. 7D). Consistent with a positive effect on TCR signaling, Themis1 overexpression in AND-Themis1 transgenic ζ ^{6F/6Y} mice increased the percentages of CD4 SP thymocytes and

$V\alpha 11^{\text{high}}$ thymocytes (Fig. 7D); however, *Themis1* overexpression did not restore positive selection in $\zeta^{6F/6Y}$ mice to the same extent as that observed in $\zeta^{6Y/6Y}$ mice, suggesting that the positive effect of *Themis1* on TCR signaling is restricted to *Grb2* signaling complexes and does not compensate for the broad signaling defects caused by impaired TCR signaling potential (Fig. 7D and fig. S8C).

Themis1 hemideficiency exacerbates the defects in positive selection and TCR signaling in *Grb2*^{+/-} mice

To further demonstrate that *Themis1* enhances *Grb2*-mediated signaling during positive selection, we next used a reverse strategy and examined whether *Themis1* hemideficiency (*Themis1*^{+/-}) exacerbates the defect in TCR signaling and positive selection that is observed in *Grb2*^{+/-} mice. The proportions of CD4 SP and $V\alpha 11^{\text{hi}}$ thymocytes were decreased by 40 and 20%, respectively, in AND-*Themis1*^{+/-} mice, an effect that was comparable to the defects observed in AND-*Grb2*^{+/-} mice (Fig. 8A and fig. S8D). Note that positive selection was further impaired in AND-TCR transgenic mice that were hemizygous (+/-) for both *Grb2* and *Themis1*, which displayed 70 and 60% decreases in the percentages of CD4 SP and $V\alpha 11^{\text{high}}$ thymocytes, respectively, relative to those in AND *Themis1*^{+/+} *Grb2*^{+/+} mice (Fig. 8A and fig. S8D). We also observed that the cell surface abundance of CD5 was reduced on *Themis1*^{+/-} *Grb2*^{+/-} thymocytes, but not on single heterozygote *Themis1*^{+/-} thymocytes or *Grb2*^{+/-} thymocytes, indicating that the combined reduction in *Themis1* and *Grb2* expression had a cooperative effect on TCR signaling and positive selection (Fig. 8B). Finally, hemideficiency in both *Grb2* and *Themis1* resulted in a further reduction

in *Grb2* cell surface abundance in thymocytes compared to that in thymocytes hemideficient in *Grb2* or *Themis1* alone (Fig. 8B).

DISCUSSION

Initial studies reporting the identification and characterization of *Themis1* included extensive analyses of T cell development in *Themis1*-deficient mice but failed to precisely identify the molecular function of this protein (2–6). Despite the absence of strong biochemical evidence, it was presumed that *Themis1* likely functions as a positive regulator of TCR signaling because several defects in *Themis1*^{-/-} mice, such as a marked impairment of both positive and negative selection, were consistent with a deficiency in TCR signaling (2–6). It was subsequently shown that *Themis1* interacts with Vav1 and that Vav1 phosphorylation is reduced in *Themis1*^{-/-} thymocytes, results that also implied a positive role for *Themis1* in TCR signaling (9). Nevertheless, two reports suggested that *Themis1* acts primarily, if not exclusively, as an attenuator of TCR signaling, in part through the recruitment of the phosphatase SHP-1 to LAT, and these studies further proposed that *Themis1* is required to prevent the induction of strong TCR signals in response to engagement by low-affinity antigens (10, 11). Although this model can explain the block in positive selection in *Themis1*^{-/-} mice, it does not fully explain the mechanism by which *Themis1* also presumably regulates signaling during negative selection and CD4⁺ T cell lineage commitment. In addition, other studies have shown that positive selection is not converted to negative selection in the absence of SHP-1 (12–15), which suggests that *Themis1* has additional effects on TCR signaling beyond the regulation of SHP-1.

To gain further insight into the molecular function of *Themis1*, we performed a quantitative proteomic analysis of the interactome of *Themis1* in thymocytes. Analysis of this interactome showed that *Themis1* preferentially interacted with proteins that function in TCR signaling, supporting a primary role for this protein in TCR signaling complexes. Among these proteins, we found that *Themis1* interacted with several cytosolic adaptors, such as *Grb2*, GADS, SLP-76, and Grap, but that *Grb2* was by far the most abundant protein in this interactome. This finding suggests that *Themis1* might be preferentially recruited into TCR signaling complexes through *Grb2*. Confirming previous studies, we found that *Themis1* interacted with the transmembrane adaptor protein LAT in pervanadate-treated thymocytes. *Themis1* also interacts with SIT1, a transmembrane adaptor protein that inhibits TCR signaling through the phosphatase SHP-2 (35, 36). One possibility suggested by these data is that *Themis1* is recruited to both LAT and SIT and that it promotes either positive or negative signals depending on the transmembrane adaptors to which it is recruited.

The quantitative analysis of the *Themis1* interactome revealed that the phosphatase SHP-1, but not SHP-2, is a predominant interacting partner of *Themis1* in thymocytes. *Themis1* attenuates the phosphorylation of

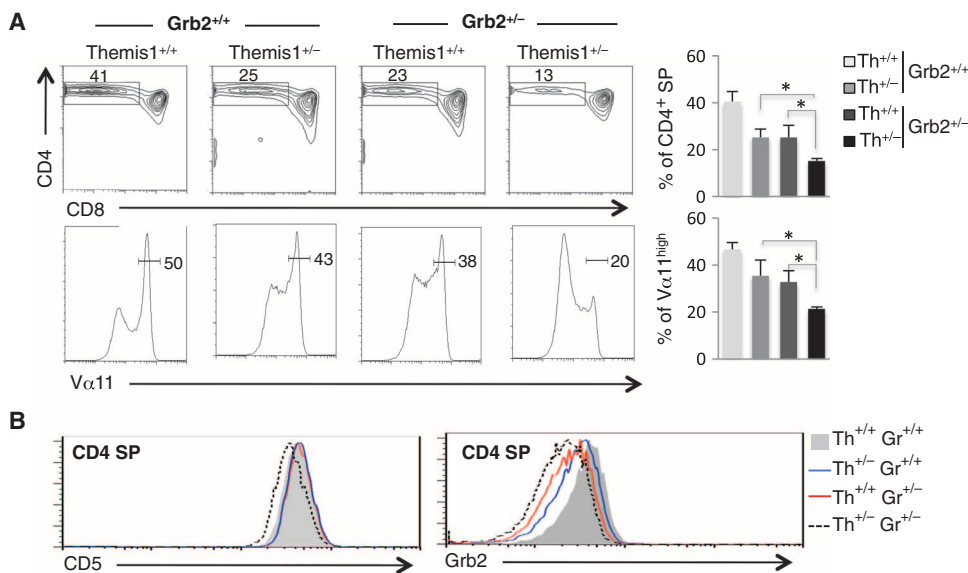


Fig. 8. *Themis1* hemideficiency exacerbates the defects in positive selection and TCR signaling in *Grb2*^{+/-} mice. (A) Flow cytometric analysis of positive selection in AND-*Grb2*^{+/+} and in AND-*Grb2*^{+/-} mice that were either WT (*Themis1*^{+/+}) or heterozygous (*Themis1*^{+/-}) for *Themis1*. Contour plots represent CD4 versus CD8 staining profiles of thymocytes from mice of the indicated genotypes. Histograms show the cell surface staining of the AND TCR on thymocytes with anti- $V\alpha 11$ antibody. Numbers indicate the percentages of cells in the gated populations. Right: Bar graphs show the mean percentages of CD4 SP thymocytes (top) and $V\alpha 11^{\text{high}}$ thymocytes (bottom) from mice of the indicated genotypes. Data are means \pm SD of five mice (for *Grb2*^{+/+} *Themis1*^{+/+} and *Grb2*^{+/-} *Themis1*^{+/+}) or three mice (for *Grb2*^{+/+} *Themis1*^{+/-} and *Grb2*^{+/-} *Themis1*^{+/-}). * $P < 0.05$ by two-tailed, unpaired *t* test. (B) Histograms show the cell surface staining of CD5 and the relative amounts of *Grb2* in CD4 SP thymocytes from mice of the indicated genotypes. Data are representative of three independent experiments.

Lck, LAT, and ERK, mostly through its role in facilitating the recruitment of SHP-1 to TCR signaling complexes (10). This effect was most clearly demonstrated when the TCR was engaged by low-affinity, but not high-affinity, antigens, conditions that mimic positive selection. Confirming these results, we found that Themis1 enhanced the phosphorylation of SHP-1 and attenuated ERK phosphorylation when low, but not high, concentrations of TCR cross-linking antibody were used to stimulate thymocytes. However, we failed to detect any increased phosphorylation of more TCR-proximal signaling proteins, such as Lck, ZAP-70, and LAT, which suggests that stimulation with low concentrations of antibodies could not fully recapitulate what was previously observed when the TCR was engaged by tetramers bound to low-affinity antigens in the absence of costimulation. The molecular events that mediate ERK activation can be driven by hysteretic regulatory effects, and it is therefore assumed that minor changes in TCR-proximal signals can have a major effect on ERK activity (37, 38). It is therefore possible that TCR cross-linking with low concentrations of antibodies might not be sensitive enough to detect effects on early regulators of TCR signaling, but could still reveal the consequences on downstream proteins, such as ERK, that exhibit a digital mode of activation.

Our MS analysis also revealed that the Rho family GEF Vav1 constituted one of the predominant binding partners of Themis1 in thymocytes. Consistent with our previous results (9), we found that Themis1 enhanced Vav1 activity under both weak and strong stimulatory conditions. The phosphorylation of p38, which is dependent on Vav1 activity (23), was also reduced in *Themis1*^{-/-} thymocytes compared to that in wild-type cells. This suggests that Themis1 has more than one function in TCR signaling and that the balance between the positive and negative effects of Themis1 on TCR signaling may be dependent on the extent (or intensity) of TCR engagement. Our findings suggest that Themis1 functions mostly as a positive regulator of TCR signaling with respect to its effect on Vav1 when selection processes are mediated by relatively high-affinity ligands. This interpretation would explain why negative selection, a process that is induced after the strong interaction of TCR with self-pMHCs, is impaired in *Themis1*^{-/-} mice (2, 5). Our results further suggest that the strength of TCR signaling is reduced in *Themis1*^{-/-} mice when positive selection is driven by a single transgene-encoded TCR (AND), a TCR that reportedly binds with relatively high affinity to self-pMHCs (1). Thus, the positive effect of Themis1 on the effector function of Vav1 might also be important to facilitate positive selection. Consistent with this idea, we found that the phosphorylation of Vav1 was reduced *in vivo* in postselection DP thymocytes from AND-*Themis1*^{-/-} mice as compared to that in *Themis1*^{+/+} controls, and that the overexpression of Themis1 in *Grb2*^{+/-} mice restored both Vav1 phosphorylation and positive selection driven by the AND TCR.

Our results demonstrated that the abundance of Grb2 was reduced in *Themis1*^{-/-} thymocytes to an extent comparable to that in *Grb2*^{+/-} thymocytes. Vav1 phosphorylation was also decreased in *Grb2*^{+/-} thymocytes, which suggests that the reduced abundance of Grb2 in *Themis1*^{-/-} thymocytes could account, at least in part, for the impaired phosphorylation of Vav1 in these cells in response to TCR engagement. Grb2 binds through its SH2 domain to phosphorylated tyrosine residues on LAT (28) and through its C-terminal SH3 domain to a PRR within Vav1 (26). Themis1 may therefore facilitate the recruitment of Vav1 to LAT and its subsequent phosphorylation by the tyrosine kinase ZAP-70. Accordingly, we showed that the recruitment of Vav1 to LAT was impaired in *Themis1*^{-/-} thymocytes. A previous study of peripheral CD4⁺ T cells showed that the recruitment of Vav1 to TCR signaling complexes was mostly mediated by the binding of SLP-76 to the Vav1 SH2 domain through Tyr¹¹² and Tyr¹²⁶ of SLP-76 (39). In that study, deletion of the Vav1 SH2 domain prevented

the recruitment of Vav1 to the immunological synapse and its subsequent phosphorylation. Here, we showed that loss of Themis1 did not affect the ability of Vav1 to interact with phosphorylated forms of SLP-76 after TCR engagement, which suggests that the impaired recruitment of Vav1 to LAT in *Themis1*^{-/-} thymocytes resulted from the reduced Grb2 abundance in these cells, and that distinct mechanisms may control the recruitment of Vav1 into TCR signaling complexes in peripheral T cells and thymocytes.

Previous MS-based studies of the Grb2 interactome in distinct cell types have reported the interaction of Grb2 with proteins involved in ubiquitin-mediated degradation processes, such as c-Cbl, Cbl-b, TSG101, and SOCS1; however, whether these enzymes regulate Grb2 turnover has not been examined so far (40, 41). Because c-Cbl was identified by our MS analysis among preferential binding partners of Themis1 in thymocytes, we suspected that c-Cbl might regulate Grb2 degradation and that Themis1 might inhibit this process. However, we found that Grb2 protein amounts were unaffected in *c-Cbl*^{-/-} thymocytes and that the interaction between c-Cbl and Grb2 was decreased rather than increased in *Themis1*^{-/-} thymocytes compared to that in wild-type thymocytes. Although we cannot exclude the possibility that Cbl-b compensates for the loss of c-Cbl, this seems unlikely given that the abundance of Cbl-b in thymocytes is relatively low compared to that in peripheral T cells and that c-Cbl deficiency alone has a major effect on TCR abundance and signaling (42). In-depth analysis of the Themis1 interactome identified the deubiquitylating enzyme USP9X as a potential interactor of Themis1 in thymocytes (table S1). USP9X is part of the TCR signaling machinery and enhances TCR-proximal signaling events, such as the phosphorylation of LAT and Vav1 (43). One hypothesis, therefore, is that Themis1 prevents Grb2 degradation by interacting with a deubiquitylase that targets Grb2. Further experiments with USP9X-deficient T cells will be required to determine whether USP9X is involved in this process.

In contrast to previous studies with DO.11 TCR transgenic models, we found that positive selection driven by the AND or OT-2 TCR was partially attenuated in *Grb2*^{+/-} mice. Because Grb2 abundance was similarly reduced in *Themis1*^{-/-} and *Grb2*^{+/-} thymocytes, this suggests that at least part of the defect in positive selection observed in *Themis1*^{-/-} mice could be attributed to the reduced abundance of Grb2. However, the modest effect of Grb2 hemideficiency on T cell development in comparison to the marked defect observed in *Themis1*^{-/-} mice implies that Themis1 regulates other T cell signaling processes independently of its effect on Grb2 protein stability. We showed here that the interaction between Themis1 and Vav1 did not require the binding of Grb2 to Themis1, which suggests that Themis1 might be important to recruit Vav1 directly into TCR signaling complexes. Another possibility is that Themis1 has a direct role in stimulating the enzymatic function of Vav1. Mice deficient in Vav1 GEF activity exhibit a phenotype similar to that of *Themis1*^{-/-} mice, with a marked block at the DP to SP transition, which contrasts with the phenotype of *Vav1*^{-/-} mice that exhibit an almost complete block at the β -selection checkpoint (20). Mice deficient in Vav1 GEF activity also exhibit a defect in Rac1-GTP production similar to what we observed in *Themis1*^{-/-} mice. Furthermore, our MS analysis revealed that Themis1 interacted predominantly with the microtubule-associated protein Lis1, a direct binding partner of Rac1, which can stabilize the GTP-bound forms of small GTP-binding proteins (G proteins) in neurons (44). An interesting hypothesis is that Themis1 functions as part of a cooperative signaling complex that includes Grb2, Vav1, and Lis1 and controls the generation and the stability of active small G proteins, which in turn transmit signals that are essential for positive and negative selection.

In conclusion, our results identify a positive function for Themis1 in TCR signaling during T cell development and identify a primary role for Themis1 in promoting Grb2 stability and Vav1 effector function. These findings are concordant with a report demonstrating an epistatic effect of

Themis1 and *Vav1* genes on the suppressive function of regulatory T cells and the development of inflammatory bowel disease (45). In view of investigations that support a negative role for *Themis1* in TCR signaling, our study suggests that *Themis1* might have a more complex function during T cell development, perhaps transmitting either positive or negative signals depending on the affinity of the TCR for self-pMHCs, the contribution of co-receptor signaling, and the intensities of the elicited TCR-proximal signals. The identification of new *Themis1* partners, such as *Lis1*, which is mostly known as a regulator of dynein anchoring to microtubules in neurons, suggests that *Themis1* may have additional functions in T cells that are not directly related to its role in TCR-proximal signaling.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Nur77-GFP reporter mice were provided by K. Hogquist (University of Minnesota, Minneapolis, MN). *c-Cbl*^{-/-} mice were provided by J. Chiang (National Cancer Institute, Bethesda, MD). *Themis1*^{-/-} (5), *Themis1*-tg (9), *Grb2*^{+/-} (33), TCR ζ ^{6Y/6Y} (46), and TCR ζ ^{6F/6F} (46) mice were described previously. The AND and OT-2-TCR transgenic mice were obtained from Taconic Farms. The *Bim*^{-/-} mice were obtained from the Jackson Laboratory. In some experiments, *Themis1*^{-/-} and *Themis1*-tg mice expressing the AND TCR were crossed to *Grb2*^{+/-} mice to generate either AND-TCR-*Themis1*^{+/-}-*Grb2*^{+/-} or AND-TCR-*Themis1*-tg-*Grb2*^{+/-} mice. *Themis1*^{-/-} mice were also crossed with *Bim*^{-/-} mice to generate *Themis1*^{-/-} *Bim*^{-/-} mice. Animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health.

Antibodies and flow cytometry

Sources for antibodies and reagents used in this study include the following: anti-Grb2 (C-23), anti-PLC- γ 1 (1249), anti-Vav1 (C-14), anti-ubiquitin (P4D1), and anti-c-Cbl (A9), which were from Santa Cruz Biotechnology; anti-LAT (11B.12), anti-Sos1, and anti-Rac1, which were from Millipore; anti-pVav1(Y174), which was obtained from Abcam; and anti-pERK (T202/Y204), anti-pp38 (T180/Y182), and anti-pSHP-1 (Y564), which were obtained from Cell Signaling Technology. Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin was purchased from Life Technologies. Anti-*Themis1* rabbit antibodies were previously described (5). Thymocytes were incubated for 16 hours with cycloheximide (20 μ g/ml, Sigma) or 1 μ M MG132 (EMD Biosciences). Biotin- and fluorochrome-conjugated antibodies against CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8 α , CD24, CD25, CD44, and V α 11 were purchased from BD Biosciences. Single-cell suspensions from the thymus, spleen, or lymph nodes were incubated in phosphate-buffered saline, 0.5% bovine serum albumin, and 0.01% NaN₃ containing the appropriate antibodies. Cell detection was performed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences), and data analysis was performed with FlowJo software (Tree Star Inc.).

Thymocyte stimulation and immunoprecipitation

For MS analysis, 2×10^8 thymocytes from *Themis1*^{+/+} or *Themis1*^{-/-} mice were left untreated or were treated with 100 nM pervanadate for 5 min at 37°C. The treatment was stopped on ice, and cells were immediately centrifuged and resuspended in 2 ml of ice-cold lysis buffer [10 mM tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton, 2 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 1 mM EDTA, and protease inhibitor cocktail tablet (Roche)] and incubated for 20 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 18,000g for 15 min at 4°C, and *Themis1* was subjected to immunoprecipitation from cleared lysates for 2 hours at 4°C with 30 μ l of protein A-Sepharose

resin coated with 12 μ g of polyclonal rabbit anti-*Themis1* antibodies. The resin was washed three times and incubated for 15 min at room temperature in 200 μ l of elution buffer [50 mM tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, and *Themis1* antigenic peptide (200 μ g/ml)]. Samples were further processed for proteomic analysis on a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific) as described in the Supplementary Materials. To analyze TCR signaling, thymocytes were collected and rested for 2 hours in RPMI medium at 37°C at a density of 5×10^6 cells/ml. Thymocytes were resuspended at a density of 10^7 cells per 50 μ l and incubated at 37°C for 10 min before being stimulated. Antibody complexes were prepared at a 2 \times concentration before being used to stimulate cells at 37°C for 10 min with biotin-conjugated anti-CD3 and anti-CD4 antibodies mixed with equal concentrations of streptavidin. Thymocytes were stimulated with 50 μ l of antibody complexes (6 or 60 μ g/ml) for the times indicated in the figure legends. Cell lysates were prepared as described earlier. Further details about immunoprecipitations can be found in the Supplementary Materials.

Analysis of MS data

Raw MS data files were processed with MaxQuant software (version 1.5.0) for database search with the Andromeda search engine and for quantitative analysis (see the Supplementary Materials for details on the MaxQuant parameter settings and for the processing of quantitative data). Potential *Themis1* interactors were selected on the basis of an enrichment ratio of >5 between immunopurified samples from *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} cells and $P < 0.05$ (by Student's *t* test) over triplicate biological experiments. Of the potential candidates, we retained as bona fide binding partners those that were identified in the *Themis1*^{+/+} immunopurified samples with strong mass spectrometric evidence (number of unique identified peptides > 2) and high abundance based on the intensity of the MS signal. The iBAQ metric, which corresponds to the sum of all of the peptide intensities divided by the number of observable peptides from a given protein (47), was used to estimate absolute protein abundance, and a minimal iBAQ threshold of 20×10^5 was thus applied to filter low-abundant proteins from the list of potential partners. Additionally, to define the *Themis1* interactome, we also eliminated candidates that had strong intensity signals in the control *Themis1*^{-/-} samples (mean iBAQ > 20×10^5), which were more likely to correspond to the nonspecific binding of abundant cellular proteins in the immunopurified samples. The remaining candidate interactors were sorted on the basis of their calculated iBAQ value in the *Themis1*^{+/+} immunopurified samples, which reflected their absolute abundance in the sample and the strength of their interaction with the *Themis1* bait. The complete unfiltered list of proteins identified in the immunopurified samples is provided in table S1. The MS proteomics data were deposited to the ProteomeXchange consortium through the Proteomics Identifications (PRIDE) partner repository with the data set identifier PXD004072.

Rac1 activation assay

Thymocytes from *Themis1*^{+/+} and *Themis1*^{-/-} mice were collected and rested for 2 hours in RPMI medium at 37°C at a density of 5×10^6 cells/ml. Cells were resuspended at 3×10^7 cells per 100 μ l, preincubated at 37°C for 10 min, and then left untreated or treated with an equal volume of a premixed 2 \times cocktail of biotinylated anti-CD3 and anti-CD4 antibodies and streptavidin (100 μ l) for the times indicated in the figure legends. Cells were lysed directly in excess lysis buffer (900 μ l) for 20 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 18,000g for 15 min at 4°C. Cleared lysates were subjected to pull-down with 10 μ l of PAK1-GST agarose beads with rotation for 1 hour at 4°C. An aliquot of cleared lysates was saved for whole-cell lysate analysis. Beads were washed three times with ice-cold lysis buffer. Proteins were eluted from the beads by heating them to 70°C for 10 min in Laemmli buffer. Proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel

electrophoresis (PAGE), subsequently transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, and analyzed by Western blotting to detect Rac1.

Western blotting analysis and band quantification

Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes according to standard protocols. Membranes were blocked with 5% milk in tris-buffered saline containing Tween for 1 hour at room temperature before being incubated with primary antibodies at 4°C overnight. After washing, membranes were incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Subsequently, membranes were incubated with enhanced chemoluminescence solution for 5 min in the dark, and luminescence was captured with a Bio-Rad XRS+ imager. Images were analyzed, and band intensities were quantitated with Bio-Rad ImageLab software. Numbers from quantitated bands were normalized for loading differences with GAPDH as a control. In Fig. 3A, the intensity values at each time point were normalized to the highest intensity value obtained for wild-type thymocytes in the “low-dose” condition (which was set at 1) for each individual experiment.

RT-PCR analysis

For gene expression studies, total cellular RNA was isolated with a PicoPure RNA Isolation kit (Arcturus). RNA samples (100 ng each) were reverse-transcribed with the SuperScript First-Strand Synthesis system (Invitrogen) and were assayed by RT-PCR. Transcripts were quantified with a Roche LightCycler 480. Duplicates were run for each sample in a 96-well plate, and *Actb* served as the endogenous reference gene. The relative quantification method was used, with the ratio of the mRNA abundance of the gene of interest normalized to the abundance of *Actb* mRNA and with the average of the control thymocyte samples serving as the calibrator value. The specificity of the products was confirmed by melting curves and electrophoresis.

Statistical analysis

Statistical comparisons were performed with an *F* test to verify equal variance of the populations, which was followed by an unpaired two-tailed *t* test. The *P* values are indicated in the figure legends.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencesignaling.org/cgi/content/full/9/428/ra51/DC1

Materials and Methods

Fig. S1. Themis1 enhances TCR signaling during thymic selection.

Fig. S2. Analysis of the interaction between Themis1 and Vav1 in thymocytes and HEK 293T cells.

Fig. S3. *Themis1*^{-/-} thymocytes exhibit normal phosphorylation of Lck, ZAP-70, and LAT after cross-linking of the TCR with low or high concentrations of antibody complexes.

Fig. S4. The amount of Grb2 that coimmunoprecipitates with c-Cbl and Sos1 is reduced in thymocytes from *Themis1*^{-/-} mice.

Fig. S5. Loss of c-Cbl does not affect Grb2 protein abundance in thymocytes.

Fig. S6. Analysis of TCR signaling and Grb2 coimmunoprecipitation with Vav1 and LAT in Themis1 transgenic thymocytes.

Fig. S7. Effect of Themis1 overexpression on T cell development.

Fig. S8. Transgenic expression of Themis1 in *Grb2*^{+/+} mice restores positive selection in TCR transgenic mice.

Table S1. List of proteins identified by proteomic analysis of Themis1-immunopurified samples.

REFERENCES AND NOTES

- J. N. Mandl, J. P. Monteiro, N. Vriskoop, R. N. Germain, T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity* **38**, 263–274 (2013).
- G. Fu, S. Vallée, V. Rybakina, M. V. McGuire, J. Ampudia, C. Brockmeyer, M. Salek, P. R. Fallen, J. A. H. Hoerter, A. Munshi, Y. H. Huang, J. Hu, H. S. Fox, K. Sauer, O. Acuto, N. R. J. Gascoigne, Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat. Immunol.* **10**, 848–856 (2009).
- A. L. Johnson, L. Aravind, N. Shulzhenko, A. Morgun, S.-Y. Choi, T. L. Crockford, T. Lambe, H. Domaschek, E. M. Kucharska, L. Zheng, C. G. Vinuesa, M. J. Lenardo, C. C. Goodnow, R. J. Cornall, R. H. Schwartz, *Themis* is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat. Immunol.* **10**, 831–839 (2009).
- K. Kakugawa, T. Yasuda, I. Miura, A. Kobayashi, H. Fukiage, R. Satoh, M. Matsuda, H. Koseki, S. Wakana, H. Kawamoto, H. Yoshida, A novel gene essential for the development of single positive thymocytes. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5128–5135 (2009).
- R. Lesoume, S. Uehara, J. Lee, K.-D. Song, L. Li, J. Pinkhasov, Y. Zhang, N.-P. Weng, K. F. Wildt, L. Wang, R. Bosselut, P. E. Love, Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat. Immunol.* **10**, 840–847 (2009).
- M. S. Patrick, H. Oda, K. Hayakawa, Y. Sato, K. Eshima, T. Kirikae, S.-i. Iemura, M. Shirai, T. Abe, T. Natsume, T. Sasazuki, H. Suzuki, Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 16345–16350 (2009).
- W. Paster, C. Brockmeyer, G. Fu, P. C. Simister, B. de Wet, A. Martinez-Riaño, J. A. H. Hoerter, S. M. Feller, C. Wülfing, N. R. J. Gascoigne, O. Acuto, GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J. Immunol.* **190**, 3749–3756 (2013).
- C. Brockmeyer, W. Paster, D. Pepper, C. P. Tan, D. C. Trudgian, S. McGowan, G. Fu, N. R. J. Gascoigne, O. Acuto, M. Salek, T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *J. Biol. Chem.* **286**, 7535–7547 (2011).
- R. Lesoume, E. Zvezdova, K.-D. Song, D. El-Khoury, S. Uehara, V. A. Barr, L. E. Samelson, P. E. Love, Interchangeability of Themis1 and Themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J. Immunol.* **189**, 1154–1161 (2012).
- G. Fu, J. Casas, S. Rigaud, V. Rybakina, F. Lambalez, J. Brzostek, J. A. H. Hoerter, W. Paster, O. Acuto, H. Cheroutre, K. Sauer, N. R. J. Gascoigne, Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* **504**, 441–445 (2013).
- W. Paster, A. M. Bruger, K. Katsch, C. Grégoire, R. Roncagalli, G. Fu, N. R. J. Gascoigne, K. Nika, A. Cohnen, S. M. Feller, P. C. Simister, K. C. Molder, S.-P. Cordoba, O. Dushek, B. Malissen, O. Acuto, A THEMIS:SHP1 complex promotes T-cell survival. *EMBO J.* **34**, 393–409 (2015).
- K. G. Johnson, F. G. LeRoy, L. K. Borysiewicz, R. J. Matthews, TCR signaling thresholds regulating T cell development and activation are dependent upon SHP-1. *J. Immunol.* **162**, 3802–3813 (1999).
- D. R. Plas, C. B. Williams, G. J. Kersh, L. S. White, J. M. White, S. Paust, T. Ulyanova, P. M. Allen, M. L. Thomas, Cutting edge: The tyrosine phosphatase SHP-1 regulates thymocyte positive selection. *J. Immunol.* **162**, 5680–5684 (1999).
- J. Zhang, A.-K. Somani, D. Yuen, Y. Yang, P. E. Love, K. A. Siminovich, Involvement of the SHP-1 tyrosine phosphatase in regulation of T cell selection. *J. Immunol.* **163**, 3012–3021 (1999).
- C. C. Fowler, L. I. Pao, J. N. Blattman, P. D. Greenberg, SHP-1 in T cells limits the production of CD8 effector cells without impacting the formation of long-lived central memory cells. *J. Immunol.* **185**, 3256–3267 (2010).
- A. E. Moran, K. L. Holzappel, Y. Xing, N. R. Cunningham, J. S. Maltzman, J. Punt, K. A. Hogquist, T cell receptor signal strength in T_{reg} and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **208**, 1279–1289 (2011).
- R. M. Siegel, M. Katsumata, T. Miyashita, D. C. Louie, M. I. Greene, J. C. Reed, Inhibition of thymocyte apoptosis and negative antigenic selection in *bcl-2* transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7003–7007 (1992).
- O. Williams, T. Norton, M. Halligey, D. Kioussis, H. J. M. Brady, The action of Bax and bcl-2 on T cell selection. *J. Exp. Med.* **188**, 1125–1133 (1998).
- L. F. Reynolds, L. A. Smyth, T. Norton, N. Freshney, J. Downward, D. Kioussis, V. L. J. Tybulewicz, Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-γ1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J. Exp. Med.* **195**, 1103–1114 (2002).
- A. Saveliev, L. Vanes, O. Ksionda, J. Rapley, S. J. Smerdon, K. Rittinger, V. L. J. Tybulewicz, Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in T cell development and activation. *Sci. Signal.* **2**, ra83 (2009).
- J. Wu, D. G. Motto, G. A. Koretzky, A. Weiss, Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* **4**, 593–602 (1996).
- B. Aghazadeh, W. E. Lowry, X.-Y. Huang, M. K. Rosen, Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* **102**, 625–633 (2000).
- S. P. Hehner, T. G. Hofmann, O. Dienz, W. Dröge, M. L. Schmitz, Tyrosine-phosphorylated Vav1 as a point of integration for T-cell receptor- and CD28-mediated activation of JNK, p38, and interleukin-2 transcription. *J. Biol. Chem.* **275**, 18160–18171 (2000).
- K. V. Salojin, J. Zhang, T. L. Delovitch, TCR and CD28 are coupled via ZAP-70 to the activation of the Vav/Rac-1/PAK-1/p38 MAPK signaling pathway. *J. Immunol.* **163**, 844–853 (1999).

25. M. Deckert, S. Tartare-Deckert, C. Couture, T. Mustelin, A. Altman, Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* **5**, 591–604 (1996).
26. M. Nishida, K. Nagata, Y. Hachimori, M. Horiuchi, K. Ogura, V. Mandiyan, J. Schlessinger, F. Inagaki, Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains. *EMBO J.* **20**, 2995–3007 (2001).
27. Z.-S. Ye, D. Baltimore, Binding of Vav to Grb2 through dimerization of Src homology 3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12629–12633 (1994).
28. W. Zhang, R. P. Triple, M. Zhu, S. K. Liu, C. J. McGlade, L. E. Samelson, Association of Grb2, Gads, and phospholipase C- γ 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 23355–23361 (2000).
29. N. Fang, G. A. Koretzky, SLP-76 and Vav function in separate, but overlapping pathways to augment interleukin-2 promoter activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 16206–16212 (1999).
30. H. Asada, N. Ishii, Y. Sasaki, K. Endo, H. Kasai, N. Tanaka, T. Takeshita, S. Tsuchiya, T. Konno, K. Sugamura, Grf40, A novel Grb2 family member, is involved in T cell signaling through interaction with SLP-76 and LAT. *J. Exp. Med.* **189**, 1383–1390 (1999).
31. S. K. Liu, N. Fang, G. A. Koretzky, C. J. McGlade, The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr. Biol.* **9**, 67–75 (1999).
32. H. S. Azzam, A. Grinberg, K. Lui, H. Shen, E. W. Shores, P. E. Love, CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* **188**, 2301–2311 (1998).
33. Q. Gong, A. M. Cheng, A. M. Akk, J. Alberola-Ila, G. Gong, T. Pawson, A. C. Chan, Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat. Immunol.* **2**, 29–36 (2001).
34. I. K. Jang, J. Zhang, Y. J. Chiang, H. K. Kole, D. G. Cronshaw, Y. Zou, H. Gu, Grb2 functions at the top of the T-cell antigen receptor-induced tyrosine kinase cascade to control thymic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 10620–10625 (2010).
35. K.-I. Pfrepper, A. Marie-Cardine, L. Simeoni, Y. Kuramitsu, A. Leo, J. Spicka, I. Hilgert, J. Scherer, B. Schraven, Structural and functional dissection of the cytoplasmic domain of the transmembrane adaptor protein SIT (SHP2-interacting transmembrane adaptor protein). *Eur. J. Immunol.* **31**, 1825–1836 (2001).
36. L. Simeoni, V. Posevitz, U. Kölsch, I. Meinert, E. Bruyns, K. Pfeffer, D. Reinhold, B. Schraven, The transmembrane adapter protein SIT regulates thymic development and peripheral T-cell functions. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7557–7568 (2005).
37. A. K. Chakraborty, J. Das, J. Zikherman, M. Yang, C. C. Govern, M. Ho, A. Weiss, J. Roose, Molecular origin and functional consequences of digital signaling and hysteresis during Ras activation in lymphocytes. *Sci. Signal.* **2**, pt2 (2009).
38. J. Das, M. Ho, J. Zikherman, C. Govern, M. Yang, A. Weiss, A. K. Chakraborty, J. P. Roose, Digital signaling and hysteresis characterize ras activation in lymphoid cells. *Cell* **136**, 337–351 (2009).
39. O. Ksionda, A. Saveliev, R. Köchl, J. Rapley, M. Faroudi, J. E. Smith-Garvin, C. Wülfing, K. Rittinger, T. Carter, V. L. J. Tybulewicz, Mechanism and function of Vav1 localisation in TCR signalling. *J. Cell Sci.* **125**, 5302–5314 (2012).
40. N. Bisson, D. A. James, G. Ivosev, S. A. Tate, R. Bonner, L. Taylor, T. Pawson, Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor. *Nat. Biotechnol.* **29**, 653–658 (2011).
41. K. Neumann, T. Oellerich, H. Urlaub, J. Wienands, The B-lymphoid Grb2 interaction code. *Immunol. Rev.* **232**, 135–149 (2009).
42. M. Naramura, H. K. Kole, R.-J. Hu, H. Gu, Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15547–15552 (1998).
43. E. Naik, J. D. Webster, J. DeVoss, J. Liu, R. Suriben, V. M. Dixit, Regulation of proximal T cell receptor signaling and tolerance induction by deubiquitinase Usp9X. *J. Exp. Med.* **211**, 1947–1955 (2014).
44. S. S. Kholmanskikh, H. B. Koeller, A. Wynshaw-Boris, T. Gomez, P. C. Letourneau, M. E. Ross, Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nat. Neurosci.* **9**, 50–57 (2005).
45. C. Pedros, G. Gaud, I. Bernard, S. Kassem, M. Chabod, D. Lagrange, O. Andréoletti, A. S. Dejean, R. Lesourne, G. J. Fournié, A. Saoudi, An epistatic interaction between *Themis1* and *Vav1* modulates regulatory T cell function and inflammatory bowel disease development. *J. Immunol.* **195**, 1608–1616 (2015).
46. S. Hwang, K.-D. Song, R. Lesourne, J. Lee, J. Pinkhasov, L. Li, D. El-Khoury, P. E. Love, Reduced TCR signaling potential impairs negative selection but does not result in auto-immune disease. *J. Exp. Med.* **209**, 1781–1795 (2012).
47. B. Schwanhäusser, D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen, M. Selbach, Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).

Acknowledgments: We thank K. Hogquist and J. Chiang for providing the Nur77-GFP transgenic mice and the *cbl^{-/-}* mice, respectively; the Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan flow cytometry facility and the INSERM UMS006-CREFFRE animal care facility; A. Saoudi for critical reading of the manuscript; and A. Mitra for the statistical analysis. **Funding:** This work was supported by INSERM and Sanofi (Avenir grant to R.L.); the Intramural Research Program of the Eunice Kennedy Shriver, National Institute of Child Health and Human Development; the Fondation pour la Recherche sur la Sclérose en Plaque (ARSEP); a Marie Curie International Reintegration Grant (R.L.); the French Ministry of Higher Education and Research (PhD fellowships for A.G., G.B., and J.A.); the Région Midi-Pyrénées; the Fonds Européens de Développement Régional, FEDER; the Toulouse métropole; and the French Ministry of Research with the Investissement d’Avenir Infrastructures Nationales en Biologie et Santé program (ProFI, Proteomics French Infrastructure project, ANR-10-INBS-08). **Author contributions:** E.Z. and J.L. performed flow cytometric analysis; J.M. and S.C. performed biochemistry; A.G., M.M., L.R., and J.F. performed experiments for MS; L.L. performed RT-PCR analysis; G.B. performed flow cytometric analysis of T cells in *Bim^{-/-}Themis1^{-/-}* mice; J.A. performed experiments for revision of the manuscript; M.M. and A.G.d.P. performed analysis of MS data; A.G.d.P. and O.B.-S. supervised MS experiments; P.E.L. and R.L. designed the research and analyzed data; and R.L. wrote the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** The MS proteomics data were deposited to the ProteomeXchange consortium through the PRIDE partner repository with the data set identifier PXD004072. The NIH requires materials transfer agreements for the distribution of the mouse lines generated for this study.

Submitted 4 August 2015
Accepted 29 April 2016
Final Publication 17 May 2016
10.1126/scisignal.aad1576

Citation: E. Zvezdova, J. Mikołajczak, A. Garreau, M. Marcellin, L. Rigal, J. Lee, S. Choi, G. Blaize, J. Argenty, J. Familiades, L. Li, A. Gonzalez de Peredo, O. Burlet-Schiltz, P. E. Love, R. Lesourne, *Themis1* enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Sci. Signal.* **9**, ra51 (2016).

Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability

Ekaterina Zvezdova, Judith Mikolajczak, Anne Garreau, Marlène Marcellin, Lise Rigal, Jan Lee, Seeyoung Choi, Gaëtan Blaize, Jérémy Argenty, Julien Familiades, Liqi Li, Anne Gonzalez de Peredo, Odile Burret-Schiltz, Paul E. Love and Renaud Lesourne (May 17, 2016)

Science Signaling **9** (428), ra51. [doi: 10.1126/scisignal.aad1576]

The following resources related to this article are available online at <http://stke.sciencemag.org>. This information is current as of May 19, 2016.

- Article Tools** Visit the online version of this article to access the personalization and article tools:
<http://stke.sciencemag.org/content/9/428/ra51>
- Supplemental Materials** "*Supplementary Materials*"
<http://stke.sciencemag.org/content/suppl/2016/05/13/9.428.ra51.DC1>
- Related Content** The editors suggest related resources on *Science's* sites:
<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/8/399/ra103.full>
<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/6/301/ra99.full>
<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/6/297/pe33.full>
<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/6/297/ra92.full>
<http://science.sciencemag.org/content/sci/336/6077/91.full>
- References** This article cites 47 articles, 31 of which you can access for free at:
<http://stke.sciencemag.org/content/9/428/ra51#BIBL>
- Permissions** Obtain information about reproducing this article:
<http://www.sciencemag.org/about/permissions.dtl>

DISCUSSION

Durant mon projet de thèse nous avons démontré que l'expression de Themis est fortement régulée par des déubiquitinases au cours du développement des lymphocytes T. Nous avons montré que Themis interagit avec deux d'entre elles, USP9X et USP19. Nous avons principalement centré notre étude sur USP9X qui avait été décrit comme un régulateur positif de la signalisation déclenchée par les TCR. Des études moléculaires et génétiques nous ont permis de montrer que Themis est déubiquitiné par USP9X suite à l'engagement des TCR. L'analyse des modalités d'interaction entre Themis et USP9X a révélé qu'USP9X interagit directement avec le domaine CABIT N-terminal de Themis. L'adaptateur moléculaire Grb2 est nécessaire au recrutement du complexe Themis/USP9X à LAT et entraîne ainsi la déubiquitination de Themis (Figure 17). L'étude de souris déficientes pour USP9X et Grb2 montre que ces deux protéines contribuent à stabiliser l'expression de Themis au cours de la sélection positive des lymphocytes T.

1 Caractérisation et fonction moléculaire de l'ubiquitination de Themis

1.1 Caractérisation des types de chaînes d'ubiquitines se liant à Themis et analyse des acides aminés de Themis impliqués dans ces liaisons

Notre travail révèle que Themis est ubiquitiné dans les thymocytes fraîchement isolés du thymus. En utilisant des anticorps capables de reconnaître spécifiquement certains types de chaînes d'ubiquitines et en utilisant des plasmides codant pour des ubiquitines mutées, nous avons montré que Themis est principalement ubiquitiné par des chaînes K48 dans les thymocytes et les cellules Jurkat. Des analyses complémentaires par spectrométrie de masse dans des cellules Jurkat suggèrent que Themis pourrait également se lier à des chaînes K11, mais ces résultats n'ont pas été confirmés par utilisation de plasmides mutés sur la lysine 11 de l'ubiquitine. Des approches biochimiques et génétiques indiquent que les chaînes de type K48 sont le type de chaîne le plus abondamment exprimé dans les cellules (Peng et al., 2003). La liaison de ces chaînes sur les substrats entraîne essentiellement leur dégradation par le protéasome (Pickart, 1997). Les chaînes de type K11 sont moins exprimées dans les

cellules mais favorisent également la dégradation des protéines. Les études sur les autres types de chaînes atypiques montrent qu'elles possèdent d'autres fonctions comme la régulation des interactions protéiques ou la régulation de l'activité d'enzymes (Swatek and Komander, 2016). Nous avons démontré que Themis ne lie pas de chaînes atypiques de type K33 ou K29. Ces données démontrent que Themis est ubiquitiné par des chaînes K48 qui vont cibler sa dégradation par le protéasome.

Nous avons cherché à identifier les acides aminés de Themis liant les chaînes K48 (annexe 1). La forme humaine de Themis possède 46 lysines susceptibles d'être ubiquitinées. Nous avons réalisé des expériences de spectrométrie de masse qui nous ont permis d'identifier les peptides de Themis ubiquitinés provenant d'extraits cellulaires de cellules Jurkat. Les résultats de ces analyses suggèrent que la lysine K208 de Themis se lie à des chaînes d'ubiquitines. Cependant, la mutation de ce résidu par mutagenèse dirigée n'affecte pas l'ubiquitination de Themis dans les cellules Jurkat (annexe 1). Une étude caractérisant l'ubiquitinome des cellules Jurkat suggère que Themis pourrait être ubiquitiné sur un grand nombre de ses lysines. Les auteurs de cette étude ont séquencé toutes les protéines endogènes de cellules Jurkat et montré ainsi que 21 lysines sur Themis se lient à des chaînes d'ubiquitines. Parmi ces 21 lysines, 7 sont systématiquement retrouvées dans les trois réplicats expérimentaux réalisés dans cette étude (Udeshi et al., 2013). Néanmoins, la mutation des lysines 124, 208 et 239 qui ont été le plus abondamment séquencées, n'affecte pas l'ubiquitination de Themis dans les cellules Jurkat (annexe 1). Il est donc possible que Themis soit ubiquitiné sur un grand nombre de lysines, rendant ainsi l'identification de ces résidus difficile. Ce type de multi-ubiquitination n'est pas spécifique de Themis et a déjà été décrit pour d'autres protéines dégradées par le protéasome via des chaînes K48 (Mattioli and Sixma, 2014).

1.2 Rôle des ligases dans l'ubiquitination de Themis

Mon travail visait principalement à caractériser les mécanismes affectant la déubiquitination de Themis. Les enzymes nécessaires à l'ubiquitination de Themis sont pour l'instant inconnues. Nos études par spectrométrie de masse de l'interactome de Themis montrent que Themis interagit avec c-Cbl, une E3 ubiquitine ligase exprimée spécifiquement dans les

lymphocytes T (article 2). Le rôle de cette enzyme dans la régulation négative des voies de signalisation des TCR a été bien décrit. c-Cbl ubiquitine de nombreux substrats comme la chaîne ζ du TCR (Wang et al., 2001), Lck, Zap70, Slp76, Vav, PLC- γ 1 et Grb2 (Thien and Langdon, 2005), entraînant leur dégradation ou altérant leur accessibilité à d'autres molécules. Ces résultats suggèrent que Themis pourrait être un substrat de cette ligase. Néanmoins, dans des souris c-Cbl^{-/-} nous n'observons pas de variation de l'expression de Themis par rapport à des souris contrôles (annexe 2). Ces résultats suggèrent que d'autres E3 ubiquitines ligases entraînent l'ubiquitination de Themis. L'analyse de l'interactome de Themis dans les thymocytes indique qu'une autre ligase, Nedd4, interagit avec Themis avec une intensité d'interaction très faible. L'ubiquitination étant un événement transitoire, il est possible que l'interaction de Themis avec cette ligase ne soit pas suffisamment persistante pour que nous puissions efficacement confirmer cette interaction. Il a été démontré dans des souris Nedd4^{-/-} que les lymphocytes T prolifèrent moins et sécrètent moins d'interleukine-2 (Yang et al., 2008). Il serait par conséquent intéressant d'analyser les conséquences de la délétion de cette ligase sur l'expression et l'ubiquitination de Themis.

1.3 Rôle d'USP9X dans la régulation négative de l'ubiquitination de Themis

Nous avons montré que les quantités de Themis ubiquitiné dans les thymocytes diminuent après engagement des TCR par des anticorps anti-CD3 et anti-CD4. Cette diminution est fortement atténuée dans des thymocytes issus de souris déficientes pour la déubiquitinase USP9X, suggérant que cette enzyme clive les chaînes K48 liées à Themis et stabilise cette protéine après l'engagement des TCR. En accord avec cette possibilité, nous avons observé une diminution de l'expression de Themis dans des cellules DP USP9X^{-/-} qui est exacerbée dans les cellules SP sélectionnées positivement. Nous avons cherché à démontrer qu'USP9X agit directement sur Themis en réalisant des tests de déubiquitination *in vitro* dans lesquels des formes ubiquitinées de Themis, immunoprécipitées à partir d'extrait cellulaire de cellules Jurkat, sont mises en présence de protéines USP9X recombinantes. Cependant, l'utilisation des protéines USP9X dans ces expériences n'entraîne pas de diminution de l'ubiquitination de Themis (annexe 3). Il nous a été difficile de contrôler les conditions expérimentales de ces expériences car nous n'avons pas réussi à identifier de protéines permettant de contrôler positivement l'efficacité de ce test.

Il est donc possible qu'USP9X régule indirectement l'ubiquitination de Themis en agissant par exemple sur l'intensité des signaux déclenchés par les TCR. Cette hypothèse nous semble peu probable car nous avons montré que des protéines recombinantes USP9X et Themis co-immunoprécipitent dans des tests « sans cellules ». Des analyses par mutagenèse dirigée montrent de plus que le domaine CABIT N-terminal de Themis est nécessaire à cette interaction. Ces résultats suggèrent donc qu'USP9X exerce un effet direct sur l'ubiquitination de Themis et stabilise cette protéine en clivant les chaînes d'ubiquitines qui lui sont associées.

Des fonctions similaires d'USP9X ont été observées dans plusieurs autres types cellulaires. USP9X clive les chaînes K48 liées à la β -catenin appartenant à la voie Wnt, pour stabiliser son expression et entrainer la survie et la prolifération de cellules de gliome (Yang et al., 2016). USP9X stabilise également l'expression de l'Angiomotin appartenant à la voie Hippo, une voie de signalisation clef pour l'inhibition de la tumorigénèse (Thanh Nguyen et al., 2016). Dans une autre étude, USP9X participe à l'activation de la voie Notch en stabilisant l'expression de TRB3 (Tribbles homolog 3) et de l'E3 ligase MIB1 (Mind Bomb 1), entrainant la survie de cellules issues d'épanchement pleural de patients atteints d'un cancer du sein (Izrailit et al., 2016). Ces données sont en accords avec l'hypothèse qu'USP9X clive directement les chaînes d'ubiquitines liées à Themis afin de stabiliser son expression.

Dans les lymphocytes T, il a d'abord été démontré avec des souris et avec des lignées de lymphocytes T (Jurkat) qu'USP9X diminue l'ubiquitination de Bcl-10 durant l'engagement des TCR afin de stabiliser son expression et réguler positivement la voie NF- κ B (Park et al., 2013). Cette démonstration a été contredite par une autre étude avec des souris dans lesquelles le gène codant pour USP9X a été excisé spécifiquement dans les lymphocytes T ou les cellules hématopoïétiques. Suite à l'engagement des TCR, ils n'ont pas observé de défaut de la voie NF- κ B dans les thymocytes de souris USP9X^{-/-} mais un défaut de la phosphorylation d'autres molécules des TCR comme PLC- γ 1, LAT (Naik et al., 2014), démontrant qu'USP9X régule positivement les voies de signalisation des TCR. Une étude plus récente a démontré qu'USP9X clive les ubiquitines liées à Zap-70 afin d'inhiber son accumulation dans les endosomes précoces, favorisant son activation et son interaction avec ses substrats pour

induire les cascades de signalisation des TCR (Naik and Dixit, 2016). Ces résultats suggèrent qu'USP9X possède différents substrats dans les lymphocytes T et qu'une de ses fonctions serait de stabiliser l'expression de Themis pour réguler positivement les voies des TCR.

1.4 Ubiquitination de Themis après engagement des TCR : modèle moléculaire

Nos résultats montrent que l'engagement des TCR conduit à la déubiquitination de Themis par USP9X. Un travail récent a montré que l'agrégation des TCR par des anticorps entraîne le recrutement d'USP9X à LAT et sa phosphorylation sur une sérine (S1600) nécessaire à son activité catalytique (Naik and Dixit, 2016). Nous avons fait l'hypothèse que l'adaptateur Grb2 puisse être important pour le recrutement d'USP9X à LAT et consécutivement à son activation. Nous avons montré que Grb2 co-immunoprécipite avec USP9X dans les thymocytes et que cette interaction est fortement diminuée dans les thymocytes Themis^{-/-}. En accord avec nos résultats précédents montrant la capacité d'USP9X à se lier directement à Themis, ces résultats suggèrent qu'USP9X et Grb2 interagissent ensemble par l'intermédiaire de Themis. Nous avons ensuite montré que des formes phosphorylées de LAT étaient moins co-immunoprécipitées avec USP9X dans les thymocytes Grb2^{+/-} par rapport à des thymocytes contrôles. Une interprétation de ces résultats est que Grb2 et Themis agissent comme des adaptateurs permettant de recruter USP9X à LAT. Une autre hypothèse non exclusive pourrait être que Grb2 soit important pour la phosphorylation de LAT et régule ainsi indirectement le recrutement du complexe USP9X/Themis. Dans tous les cas, la diminution du recrutement d'USP9X à LAT devrait conduire à une diminution de l'activité catalytique d'USP9X qui n'est plus susceptible d'être phosphorylé efficacement sur sa sérine S1600. Nous essayons actuellement de nous procurer les anticorps capables de reconnaître les formes phosphorylées d'USP9X pour valider ce modèle.

Nous avons fait l'hypothèse que si Grb2 est nécessaire au recrutement du complexe Themis/USP9X à LAT il devrait être nécessaire à l'ubiquitination de Themis et à sa stabilisation. Nos résultats sont en accord avec cette interprétation. Nous avons montré en effet que l'ubiquitination de Themis est augmentée dans les thymocytes Grb2^{+/-} et que son niveau d'expression est parallèlement diminué. Ces résultats sont intéressants car ils mettent en évidence une fonction moléculaire de Grb2 différente de sa simple fonction

d'adaptateur. Grb2 pourrait ainsi être important pour stabiliser certaines protéines de signalisation en facilitant le recrutement de DUB dans les complexes de signalisation. Il faut noter néanmoins que les niveaux d'expression d'autres protéines connues comme étant des partenaires de Grb2, Cbl et Vav1 par exemple, ne sont pas diminués dans les thymocytes Grb2^{+/-} suggérant un effet relativement spécifique de Grb2 sur Themis.

1.5 Conséquences moléculaires de la régulation de Themis par USP9X

La conséquence de la diminution de Themis sur les événements de signalisation déclenchés par les TCR est un débat controversé. Bien qu'il ait été d'abord suggéré que Themis agisse comme un régulateur positif des voies de signalisation des TCR, deux articles ont proposé que Themis atténue les voies de signalisation en entraînant le recrutement de la phosphatase SHP-1 à LAT durant la stimulation des TCR avec des ligands de faible affinité afin de prévenir la sélection négative des lymphocytes T (Fu et al., 2013 ; Paster et al., 2015). Cependant, le développement des lymphocytes T n'est pas affecté dans les souris déficientes pour SHP-1 ou exprimant des formes « dominantes négatives » de cette phosphatase, ne récapitulant pas le phénotype des souris Themis^{-/-} (Carter et al., 1999 ; Johnson et al., 2013). Ces résultats suggèrent que d'autres phosphatases, comme la phosphatase SHP-2, pourrait avoir des effets redondants avec SHP-1. Une étude de notre équipe, à laquelle j'ai collaboré, et une autre étude actuellement sous presse dans Nature Immunology démontrent que Themis régule positivement les voies des TCR en bloquant les fonctions inhibitrices de SHP-1.

1.5.1 Themis régule positivement la signalisation des TCR en stabilisant Grb2 et en régulant positivement la phosphorylation de Vav1

Dans une première étude, nous avons analysé l'effet de la déficience (souris Themis^{-/-}) ou de la surexpression (souris Themis transgéniques) sur l'intensité des signaux délivrés par les TCR pendant la sélection positive des thymocytes. Nous avons croisés pour cela des souris Themis^{-/-} et Themis-Tg à des souris transgéniques exprimant des protéines fluorescentes GFP sous le contrôle du promoteur du gène codant pour la protéine Nur-77. Ces souris sont utilisées comme modèle pour évaluer l'intensité des signaux délivrés par les TCR selon le niveau d'expression de la GFP. Nous avons montré dans cette étude (article 2) que les

niveaux d'expression de la GFP sont corrélés à l'expression de Themis dans les thymocytes en cours de sélection positive, suggérant que Themis agisse comme un régulateur positif de la signalisation des TCR. Nous avons observé de plus que la déficience pour le facteur pro-apoptotic Bim, indispensable à la sélection négative des thymocytes, ne restaure pas le développement des lymphocytes T dans les souris Themis^{-/-}. Ceci suggère donc, contrairement à ce qui était proposé par le groupe de Nicholas Gascoigne, que le défaut de développement des lymphocytes T dans les souris Themis^{-/-} ne résulte pas d'un excès de sélection négative provoqué par une augmentation de la signalisation des TCR.

Nous avons ensuite analysé l'interactome de Themis par spectrométrie de masse et montré que Themis interagit préférentiellement avec Grb2, SHP-1 et la protéine Rho-GTPase Vav1. Nous avons ensuite démontré que Themis régule positivement l'activité catalytique de Vav1 *in vitro* et *in vivo* dans des thymocytes en cours de sélection positive. Ces résultats suggèrent donc que le défaut de développement des lymphocytes T dans les souris Themis^{-/-} résulte d'un défaut d'activation de Vav1. Cette hypothèse est en accord avec un modèle de souris *knock-in* exprimant une forme inactive de Vav1, présentant un blocage entre le stade DP et le stade SP très similaire à celui observé dans les souris Themis^{-/-} (Saveliev et al., 2009). Nous avons démontré que la phosphorylation de Vav1 est diminuée dans les thymocytes Themis^{-/-} engagés dans la sélection positive (article 2). En nous basant sur ces observations, nous présumons par conséquent que la diminution de Themis observée dans les thymocytes USP9X^{-/-} pourrait conduire à une diminution de la phosphorylation de Vav1. En accord avec cette hypothèse, il a été montré récemment que la phosphorylation de Vav1, ainsi que d'autres protéines de signalisation, est diminuée dans les thymocytes déficients pour USP9X (Naik et al., 2014). Il est possible néanmoins, comme le suggère une autre étude, qu'USP9X régule positivement la phosphorylation de Vav1 en régulant l'activité de ZAP-70 (Naik and Dixit, 2016).

Nous avons ensuite recherché dans cette étude les mécanismes par lesquels Themis régule Vav1. Nous avons démontré que Themis est important pour stabiliser l'expression protéique de Grb2 en favorisant sa déubiquitination. Nous avons montré que Themis, Grb2 et Vav1 forment un complexe qui est recruté à LAT durant l'engagement des TCR (article 2). Nous proposons que Themis favorise le recrutement de Vav1 à LAT durant l'engagement des TCR

en stabilisant l'expression de Grb2, facilitant ainsi l'activation de Vav1 par les kinases ZAP-70 (figure 18). Comme Themis et USP9X interagissent nous avons suspecté qu'USP9X puisse jouer un rôle important pour déubiquitiner Grb2 et stabiliser son expression. Nous observons cependant que le niveau d'expression de Grb2 n'est pas diminué dans les souris USP9X^{-/-}, suggérant que d'autres DUB soient impliquées dans la déubiquitination de Grb2. Une d'entre elles pourrait être USP19 dont nous avons montré l'interaction avec Themis dans les thymocytes.

Au cours de cette étude, nous avons enfin analysé les conséquences de la surexpression de Themis dans des souris Grb2^{+/-} qui présentent un défaut de sélection positive. Nous avons pu observer que la surexpression de Themis restaure l'expression de Grb2, la phosphorylation de Vav1 et p38 ainsi que la sélection positive des lymphocytes T (article 2). Ces résultats suggèrent que Themis facilite la sélection positive en stabilisant l'expression de Grb2. Une autre hypothèse, en accord avec mon travail sur l'ubiquitination de Themis, serait que la surexpression de Themis dans les souris Grb2^{+/-} puisse permettre de restaurer le défaut d'expression de Themis observé dans ces souris et restaurer ainsi la sélection positive des lymphocytes T. Cependant, il est important de souligner que les souris Grb2^{+/-} présentent un défaut de sélection positive modeste en comparaison à des souris Themis^{-/-}. Ceci suggère que le défaut de sélection positive dans les souris Themis^{-/-} ne repose pas uniquement sur la diminution de l'expression de Grb2.

1.5.2 Themis régule négativement l'activité phosphatase de SHP-1

Notre équipe a récemment collaboré à une autre étude qui démontre les fonctions moléculaires de Themis dans les thymocytes. Cette nouvelle étude propose que Themis augmente l'intensité des signaux déclenchés par les TCR en inhibant l'activité tyrosine-phosphatase de SHP-1. L'activité phosphatase de SHP-1 est en effet diminuée *in vitro* en présence de protéine Themis recombinantes. L'inhibition de l'activité phosphatase de SHP-1 par Themis dépend principalement des domaines CABIT de Themis qui interagissent directement avec le domaine phosphatase de SHP-1. Les auteurs montrent ensuite que la déficience en SHP-1 (SHP-1^{flox/flox} Lck-Cre) dans les souris Themis^{-/-} restaure le développement normal des lymphocytes T et le nombre de lymphocytes T périphériques.

Ces résultats démontrent que le défaut de développement des lymphocytes T dans les souris Themis^{-/-} résulte d'une activité phosphatase exacerbée de SHP-1. L'analyse approfondie des processus moléculaires impliqués suggère que le domaine CABIT-1 de Themis aurait pour fonction de maintenir ou de faciliter l'oxydation des cystéines catalytiques de SHP-1 par des ROS (reactive oxygen species), inhibant ainsi le processus catalytique de déphosphorylation (Choi et al., papier accepté dans *Nature Immunology*). Les auteurs proposent que Themis représente un nouveau mécanisme qui régule sélectivement la signalisation PTK/PTP (protein tyrosine kinase/protein tyrosin phosphatase) par l'intermédiaire de ses domaines CABIT. Nos résultats démontrent que l'expression de Themis est stabilisée par des DUB au cours du développement des lymphocytes T. Ce mécanisme pourrait ainsi permettre à Themis de promouvoir la signalisation des lymphocytes T en atténuant l'activité phosphatase de SHP-1. Pour valider cette hypothèse, nous chercherons dans les prochaines semaines à analyser si la phosphorylation de SHP-1, un indicateur de son activité phosphatase, est diminuée dans les thymocytes USP9X^{-/-}.

2 Fonction physiologique de l'ubiquitination de Themis

2.1 Rôle d'USP9X dans le développement des lymphocytes T

Comme Themis est une protéine essentielle à la sélection positive et négative des lymphocytes T (Lesourne et al., 2009 ; Fu et al., 2009 ; Johnson et al., 2009), nos résultats suggèrent qu'USP9X pourrait également réguler ces étapes du développement. Le rôle d'USP9X dans ces cellules a été étudié dans des modèles murins dans lesquels le gène codant pour USP9X est excisé dans les cellules hématopoïétiques ou dans les lymphocytes T à partir du stade DP (modèle choisi pour notre étude). Les auteurs proposent qu'USP9X est important pour la sélection négative des thymocytes car les souris USP9X^{-/-} présentent une augmentation du pourcentage de cellules CD4⁺ SP et CD8⁺ SP et une diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim par rapport aux souris contrôles. Ils observent également dans ces souris une lymphopénie et le développement d'une maladie auto-immune de type lupus, suggérant une augmentation du nombre de lymphocytes auto-réactifs (Naik et al., 2014). Themis est également important pour induire la sélection négative des thymocytes. Cependant, les phénotypes observés dans les souris USP9X^{-/-} et

Themis^{-/-} diffèrent puisque le nombre de lymphocytes T SP est diminué dans les souris Themis^{-/-} alors qu'il est augmenté dans les souris USP9X^{-/-}. Le rôle d'USP9X durant les étapes de sélection thymique n'a pas été précisément étudié à l'aide de modèles murins exprimant des TCR transgéniques. Pour étudier le rôle d'USP9X dans la sélection positive, nous avons croisée les souris USP9X^{-/-} avec des souris AND exprimant des TCR transgéniques entraînant une sélection positive massive et clonotypique de lymphocytes SP. Contrairement aux souris AND Themis^{-/-}, le nombre et le pourcentage de cellules SP augmentent légèrement dans les souris AND USP9X^{-/-} (article 1, figure supplémentaire S3). Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de défaut de sélection positive dans les souris AND USP9X^{-/-}.

Une première hypothèse pour expliquer ce résultat est qu'USP9X n'est pas impliqué dans l'étape de sélection positive des lymphocytes T. Cette hypothèse nous paraît cependant peu probable car comme mentionnées plus haut, les études précédentes montre que les événements de signalisation proximaux sont fortement atténués dans les thymocytes USP9X^{-/-}. Il est surprenant par conséquent de constater que la sélection positive n'est pas affectée dans les souris USP9X^{-/-}.

Une deuxième hypothèse est qu'USP9X possède plusieurs substrats dans les thymocytes. Les cibles d'USP9X dans les thymocytes sont peu connues, par contre un grand nombre de cibles ont été identifiées dans d'autres types cellulaires. Il est possible que le défaut de signalisation des TCR observé dans ces souris soit compensé par d'autres effets d'USP9X sur des voies de signalisation différentes. Il a été montré par exemple qu'USP9X stabilise l'expression de la protéine pro-apoptotique ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), favorisant la mort des cellules en activant la voie des MAPK JNK/p38 (Nagai et al., 2009). Ainsi, la déficience en USP9X pourrait avoir des effets opposés sur la sélection positive en diminuant l'intensité de la signalisation des TCR d'une part et en augmentant la survie des thymocytes en cours de sélection d'autre part.

Une troisième hypothèse est que la diminution de l'expression de Themis observée dans les souris USP9X^{-/-} n'est pas suffisamment importante pour entraîner des défauts significatifs de la sélection positive. L'absence de ces défauts dans les souris USP9X^{-/-} pourrait résulter d'une redondance fonctionnelle entre USP9X et d'autres DUB. Nous avons en effet démontré que

Themis interagit avec une autre DUB, USP19. De plus, les résultats de spectrométrie de masse dans les thymocytes indiquent qu'USP19 interagit plus abondamment avec Themis par rapport à USP9X (article 2). Il est possible qu'USP19 et USP9X agissent conjointement pour réguler négativement l'ubiquitination de Themis et promouvoir sa stabilité. Le rôle d'USP19 dans les lymphocytes T n'a pas encore été étudié. Cette protéine clive préférentiellement les chaînes K48 et K63 (Iphöfer et al., 2012), et existe sous deux isoformes, une ancrée au reticulum endoplasmique et une autre, majoritaire, cytosolique (Lee et al., 2014). USP19 a également été décrite comme stabilisant l'expression de protéines telles que c-IAP1 et c-IAP2 qui sont des protéines anti-apoptotiques (Mei et al., 2011) ou l'E3 ubiquitine ligase MARCH6 (Nakamura et al., 2014) dans des modèles de lignées cellulaires. USP19 a donc pour fonction principale de stabiliser l'expression de ses substrats, et agit ainsi de façon similaire à USP9X. Soutenant cette redondance fonctionnelle, nous avons montré que l'expression de Themis est très fortement diminuée dans les thymocytes traités avec un inhibiteur global des DUB alors qu'elle n'est que partiellement affectée dans les thymocytes USP9X^{-/-}.

2.2 Rôle de la déubiquitination de Themis dans le développement des cellules T

Nous avons montré que le niveau d'expression protéique de Themis augmente dans les thymocytes en cours de sélection positive alors que les quantités d'ARNm diminuent de façon concomitante. Nous montrons parallèlement que l'ubiquitination de Themis est diminuée après engagement des TCR. Ces résultats suggèrent que des processus sont mis en jeu au cours de la sélection positive pour stabiliser Themis. La stabilisation de Themis pourrait jouer un rôle essentiel pour promouvoir et surtout pour maintenir dans le temps les signaux délivrés par Themis essentiels à la sélection positive. Plusieurs études suggèrent en effet que la sélection positive des lymphocytes T nécessite des flux de signalisation modérés mais persistants des TCR. Par exemple, une activation soutenue et faible de la phosphorylation d'ERK est associée à la sélection positive des cellules T (Mariathasan et al., 2001; McNeil et al., 2005). Il est ainsi possible que la déubiquitination de Themis suite à l'engagement des TCR au stade DP permette de maintenir l'expression de Themis suffisamment longtemps pour faciliter la sélection positive et augmenter le répertoire TCR des lymphocytes T sélectionnés positivement. La diminution de l'expression des ARNm

codant Themis aux stades SP pourrait être essentielle dans un second temps pour diminuer la sensibilité des lymphocytes T aux stimulations antigéniques périphériques. Il est connu en effet que les seuils de stimulation des lymphocytes T DP sont diminués par rapport aux lymphocytes T périphériques (Davey et al., 1998). Cette différence de sensibilité antigénique entre ces deux populations cellulaires pourrait être importante pour prévenir l'émergence de réactions auto-immunes.

La stabilisation de Themis pourrait également jouer un rôle important lors de l'acquisition du lignage CD4⁺ SP. L'acquisition de ce lignage nécessite une signalisation persistante des TCR alors que l'acquisition du lignage CD8⁺ SP résulte d'une interruption momentanée de la signalisation due à une diminution d'expression des corécepteurs CD8 à la surface des lymphocytes T. Themis joue un rôle important dans le choix de lignage des thymocytes. La proportion et le nombre de cellules CD4⁺ SP est plus fortement diminuée dans des souris Themis^{-/-} par rapport aux cellules CD8⁺ SP. De plus, dans des souris déficientes pour les CMH de classe I, dans lesquelles majoritairement des cellules CD4⁺ SP se développent, on observe une « redirection » des cellules vers le lignage CD8⁺ SP en absence de Themis (Lesourne et al., 2009). Ces résultats suggèrent que Themis est important pour perpétuer les signaux des TCR nécessaires et promouvoir ainsi l'acquisition du lignage CD4⁺ SP. L'engagement des TCR pourrait donc stabiliser l'expression de Themis afin d'induire des signaux positifs maintenus dans le temps favorisant la différenciation en cellules CD4⁺ SP. Les cellules qui n'engageraient pas leurs TCR et qui exprimeraient peu de Themis seraient dirigées vers le lignage CD8⁺ SP. Nous avons analysé les proportions de cellules CD4⁺ SP et CD8⁺ SP dans les souris USP9X^{-/-} mais nous n'avons pas observé d'effet de la délétion d'USP9X sur le choix de lignage (article 1, figure supplémentaire S3).

2.3 Régulation moléculaire de la localisation d'USP9X et Themis durant le développement des lymphocytes T

Nos résultats suggèrent que Grb2 facilite le recrutement du complexe Themis/USP9X à LAT durant la stimulation des TCR afin d'entraîner l'activation d'USP9X et la déubiquitination de Themis. L'activité des déubiquitinases est fortement régulée dans le but de maintenir leur spécificité. En effet, le nombre de déubiquitinases est faible comparé au nombre

d'ubiquitines ligases, suggérant qu'il existe davantage de substrats pour une déubiquitinase que pour une ligase (Coyne and Wing, 2016). Par conséquent, différents mécanismes comme la régulation de la localisation des enzymes permettent de réguler l'activité et la spécificité des déubiquitinases. Durant la stimulation des TCR, la localisation d'USP9X et Themis au niveau de l'adaptateur transmembranaire LAT pourrait réguler spécifiquement l'activité d'USP9X pour stabiliser l'expression de Themis et promouvoir la sélection positive ou le choix du lignage des lymphocytes T. De manière intéressante, il a été montré que durant la stimulation des TCR, la localisation des protéines de signalisation était importante pour favoriser la sélection positive des cellules T. En effet, la stimulation de thymocytes (issus de souris transgéniques exprimant des TCR spécifiques de l'ovalbumine) avec des peptides induisant la sélection négative des cellules entraîne la localisation de Zap-70, Grb2, Sos, RasGRP1, Ras, Raf ou ERK à la membrane plasmique alors que la stimulation des thymocytes avec des peptides induisant la sélection positive des cellules entraîne une diminution de cette localisation. La sélection positive entraîne la localisation des formes phosphorylées d'ERK dans le cytoplasme et les protéines RasGRP1, Ras ou Raf se localisent au niveau de l'appareil de Golgi (Daniels et al., 2006). Une autre étude a décrit que les protéines LAT sont localisées dans des vésicules qui ne fusionnent pas avec la membrane plasmique et qui se localisent près des sites d'activation des TCR (Larghi et al., 2013). Nous pouvons imaginer que durant l'activation des TCR, Themis et USP9X interagissent avec LAT au contact de ces vésicules afin d'entraîner l'activation des voies de signalisation nécessaire à la sélection positive des lymphocytes T.

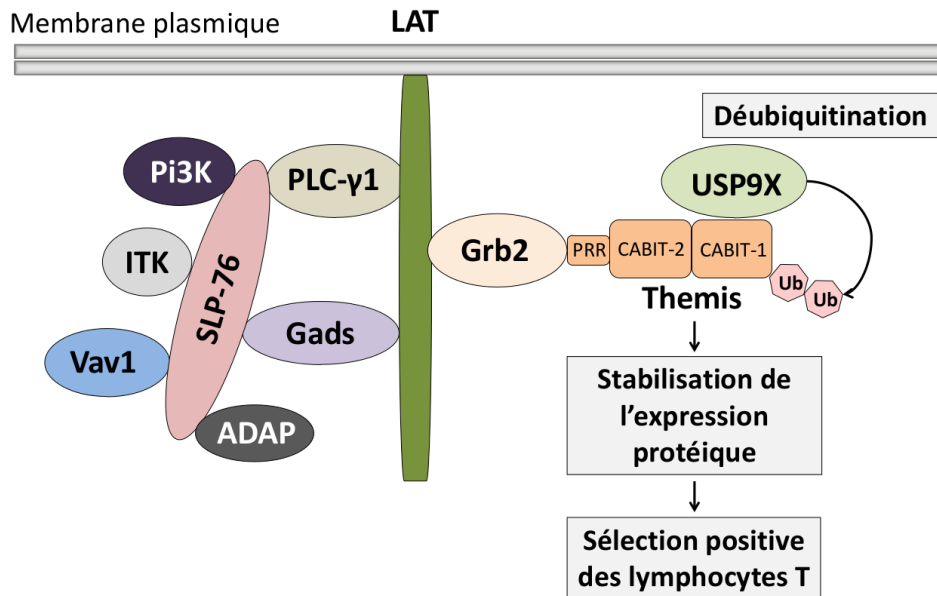


Figure 17 : Modèle de régulation des protéines Themis par les déubiquitines enzymes USP9X

Ce modèle propose qu'USP9X stabilise l'expression de Themis en entrainant sa déubiquitination durant le développement des lymphocytes T. Themis interagirait directement avec USP9X par son domaine CABIT N-terminal et interagirait avec Grb2 grâce à son domaine PRR. L'engagement des TCR augmenterait l'activité d'USP9X suite à son recrutement à l'adaptateur LAT par l'intermédiaire de Grb2 et Themis. Cette DUB déubiquitinerait Themis pour stabiliser son expression et permettre le développement des lymphocytes T.

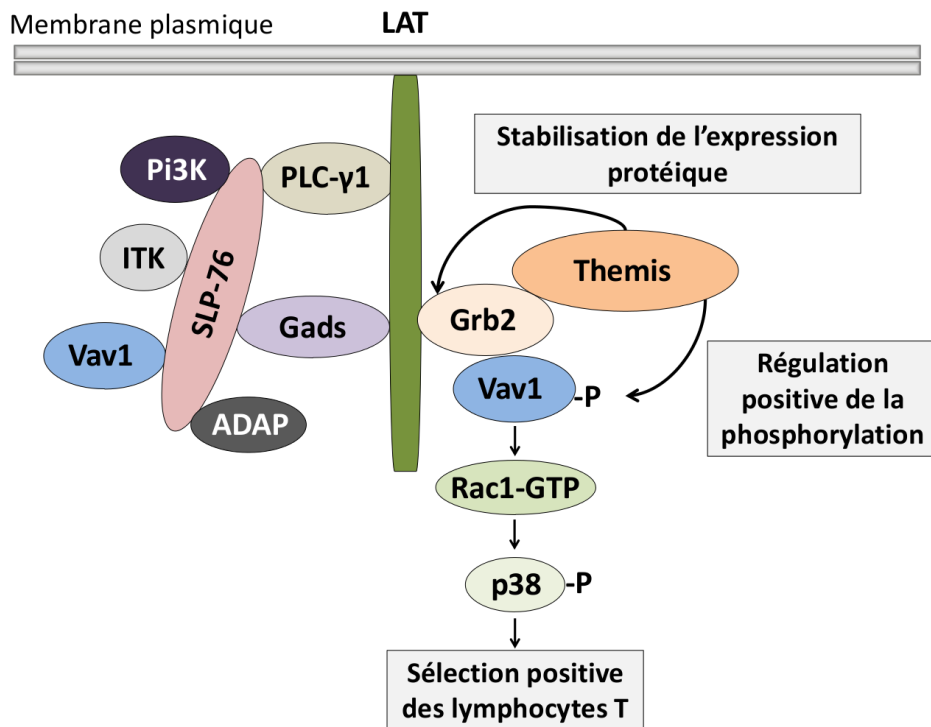


Figure 18 : Modèle de régulation du facteur d'échange Vav1 par les protéines Themis.

Ce modèle suggère que Themis stabilise l'expression protéique de l'adaptateur Grb2, ce qui favorise le recrutement du facteur d'échange Vav1 à LAT durant l'engagement des TCR. Themis régule également positivement la phosphorylation de Vav1 afin d'activer son activité catalytique et entraîner la formation de Rac1-GTP et induire les cascades de signalisation impliquées dans la sélection positive des lymphocytes T comme la phosphorylation de p38 qui est une protéine des MAPK. Les lymphocytes T sont par la suite sélectionnés positivement. *Adapté de « Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability », Zvezdova and Mikolajczak et al., Science signaling, 2016.*

PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Ce projet nous a permis de mieux comprendre la régulation moléculaire des protéines Themis au sein des voies de signalisation des TCR. Nous avons proposé un modèle qui décrit que l'engagement des TCR entraîne la stabilisation de l'expression de Themis par la déubiquitineuse USP9X. Notre hypothèse est que la régulation de l'expression de Themis représenterait un mécanisme qui module l'intensité des signaux déclenchés par les TCR afin de réguler les étapes du développement des lymphocytes T.

Comme Themis est une protéine essentielle à la sélection positive des lymphocytes T, nous pensons qu'USP9X régule également cette étape du développement. Comme mentionné plus haut, nous avons étudié le rôle d'USP9X durant l'étape de sélection positive des cellules T à l'aide de modèles murins exprimant des TCR transgéniques. Cependant, nos expériences montrent que le nombre et le pourcentage de cellules SP augmentent légèrement dans les souris AND USP9X^{-/-}, alors qu'ils diminuent dans les souris AND Themis^{-/-}. Nous pensons que la diminution de l'expression de Themis observée dans les souris USP9X^{-/-} n'est pas suffisamment importante pour entraîner un défaut significatif de la sélection positive. Nous suspectons qu'il existe des phénomènes de compensation et que d'autres DUB telles que USP19 aient des fonctions redondantes à celles d'USP9X. Pour démontrer qu'USP9X régule la sélection positive en contrôlant les niveaux d'expression de Themis, nous sommes en train de croiser des souris AND USP9X^{-/-} avec des souris Themis^{+/-} qui présentent des niveaux d'expression deux fois plus faible que des souris contrôles Themis^{+/+}. Nous espérons que la déficience en USP9X dans les souris Themis^{+/-} conduise à diminuer l'expression de Themis suffisamment pour que la sélection positive soit affectée.

Mon travail suggère qu'USP19 pourrait donc exercer des fonctions parallèles à celle d'USP9X. Nous avons montré que Themis interagit *in vitro* avec USP19. De plus, les résultats de spectrométrie de masse dans les thymocytes indiquent qu'USP19 interagit plus abondamment avec Themis par rapport à USP9X (article 2). Le rôle d'USP19 dans les cellules du système immunitaire n'est pas encore décrit. Il a été cependant montré *in vitro* à partir d'une lignée HEK293 qu'USP19 serait un régulateur négatif de la signalisation des interférons

de type I, important pour l'induction de réponses antivirales (Jin et al., 2016). Une étude récente, utilisant un modèle murin dont le gène codant pour USP19 est invalidé au niveau germinale, a montré que cette enzyme protège de l'atrophie musculaire (Bédard et al., 2015). Pour étudier le rôle d'USP19 dans les lymphocytes T, il serait intéressant de générer des souris dont le gène codant USP19 serait spécifiquement excisé dans les cellules T. Nous pourrions utiliser ce modèle pour analyser les conséquences de la déficience en USP19 sur l'ubiquitination et l'expression de Themis. Plus généralement il serait intéressant d'utiliser ce modèle pour étudier le rôle de cette DUB dans le développement des thymocytes et les réponses des lymphocytes T périphériques.

Notre étude s'inscrit dans les nouvelles connaissances concernant le rôle des déubiquitinasés dans la régulation des protéines de signalisation durant le développement des lymphocytes T. Bien que le rôle des déubiquitinasés dans les cellules du système immunitaire ait été moins étudié que le rôle des E3 ligases, les connaissances concernant ces protéases s'enrichissent. Plus particulièrement, CYLD est la première déubiquitinase à avoir été décrite dans les mécanismes de régulation du développement des lymphocytes T. Il est observé dans les souris $CYLD^{-/-}$, une diminution du pourcentage de cellules SP et de lymphocytes T périphériques. Ils décrivent que CYLD déubiquitine Lck afin de favoriser l'interaction entre cette kinase et Zap-70 et induire les cascades de signalisation des TCR (Reiley et al., 2006). Comme autre exemple, la délétion spécifiquement dans les lymphocytes T de la déubiquitinase USP8 entraîne une diminution de l'expression des $TCR\alpha\beta$, des gènes codant les récepteurs de l'interleukine-7 et une diminution de la maturation des cellules SP (Dufner et al., 2015). Les études sur le rôle d'USP9X dans les lymphocytes T montrent que cette DUB est également importante pour le développement de ces cellules dans le thymus (Naik et al., 2014). Finalement, une étude a identifiée par des approches de spectrométrie de masse, les déubiquitinasés qui sont actives dans les lymphocytes T (Jahan et al., 2015). Ils ont validé leur approche expérimentale en identifiant des déubiquitinasés déjà décrites dans la régulation des voies de signalisation des TCR comme USP9X, CYLD, USP34, USP7 et OTUB1 (Lin et al., 2009; Naik and Dixit, 2016; Poalas et al., 2013; Reiley et al., 2006; van Loosdregt et al., 2013). Ils ont également identifié d'autres déubiquitinasés actives dans les lymphocytes T mais qui n'ont jamais été étudiées dans ces cellules telles que USP12, USP24, USP25, UCH44, USP46, UCHL3 et UCHL5. Ils se sont focalisés sur USP12 car son activité augmentait

après l'engagement des TCR. Leur étude a mis en évidence qu'USP12 stabilise l'expression de LAT pour entraîner le maintien des complexes de signalisation proximaux des TCR (Jahan et al., 2015). Il serait intéressant d'analyser le rôle des autres déubiquitinasés qui n'ont jamais été étudiées dans les cellules T, dans le développement des thymocytes et les réponses des lymphocytes T périphériques. De plus, certaines déubiquitinasés comme USP25, USP46 ou UCHL3 ont déjà été étudiées dans des souris invalidées pour ces enzymes.

BIBLIOGRAPHIE

- Acuto, O., Di Bartolo, V., and Michel, F. (2008). Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nature reviews Immunology* 8, 699-712.
- Aki, D., Zhang, W., and Liu, Y.C. (2015). The E3 ligase Itch in immune regulation and beyond. *Immunol Rev* 266, 6-26.
- Alam, S.M., and Gascoigne, N.R. (1998). Posttranslational regulation of TCR Valpha allelic exclusion during T cell differentiation. *J Immunol* 160, 3883-3890.
- 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, 2953-2961.
- Alcover, A., and Alarcón, B. (2000). Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol* 20, 325-346.
- Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695, 189-207.
- Anderson, M.S., and Su, M.A. (2016). AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. *Nat Rev Immunol* 16, 247-258.
- Appleby, M.W., Gross, J.A., Cooke, M.P., Levin, S.D., Qian, X., and Perlmutter, R.M. (1992). Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59fyn. *Cell* 70, 751-763.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-763.
- Ashton-Rickardt, P.G., Van Kaer, L., Schumacher, T.N., Ploegh, H.L., and Tonegawa, S. (1993). Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8+ T cells in the thymus. *Cell* 73, 1041-1049.
- Baker, R.G., Hsu, C.J., Lee, D., Jordan, M.S., Maltzman, J.S., Hammer, D.A., Baumgart, T., and Koretzky, G.A. (2009). The adapter protein SLP-76 mediates "outside-in" integrin signaling and function in T cells. *Mol Cell Biol* 29, 5578-5589.
- Balagopalan, L., Coussens, N.P., Sherman, E., Samelson, L.E., and Sommers, C.L. (2010). The LAT story: a tale of cooperativity, coordination, and choreography. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a005512.
- Behrends, C., and Harper, J.W. (2011). Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nat Struct Mol Biol* 18, 520-528.
- Bevan, M.J. (1977). In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature* 269, 417-418.
- Bhakta, N.R., Oh, D.Y., and Lewis, R.S. (2005). Calcium oscillations regulate thymocyte motility during positive selection in the three-dimensional thymic environment. *Nat Immunol* 6, 143-151.
- Bhowmick, P., Panca, R., Guharoy, M., and Tompa, P. (2013). Functional diversity and structural disorder in the human ubiquitination pathway. *PLoS One* 8, e65443.

- Billadeau, D.D. (2010). T cell activation at the immunological synapse: vesicles emerge for LATer signaling. *Sci Signal* 3, pe16.
- Brockmeyer, C., Paster, W., Pepper, D., Tan, C.P., Trudgian, D.C., McGowan, S., Fu, G., Gascoigne, N.R., Acuto, O., and Salek, M. (2011). T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *J Biol Chem* 286, 7535-7547.
- Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guinter, T.I., Yamashita, Y., Sharrow, S.O., and Singer, A. (2000). Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 13, 59-71.
- Bédard, N., Jammoul, S., Moore, T., Wykes, L., Hallauer, P.L., Hastings, K.E., Stretch, C., Baracos, V., Chevalier, S., Plourde, M., *et al.* (2015). Inactivation of the ubiquitin-specific protease 19 deubiquitinating enzyme protects against muscle wasting. *FASEB J* 29, 3889-3898.
- Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., and Wucherpfennig, K.W. (2002). The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111, 967-979.
- Cao, R., Tsukada, Y., and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 20, 845-854.
- Carpenter, A.C., and Bosselut, R. (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nature immunology* 11, 666-673.
- Carter, J.D., Neel, B.G., and Lorenz, U. (1999). The tyrosine phosphatase SHP-1 influences thymocyte selection by setting TCR signaling thresholds. *Int Immunol* 11, 1999-2014.
- Chabod, M., Pedros, C., Lamouroux, L., Colacios, C., Bernard, I., Lagrange, D., Balz-Hara, D., Mosnier, J.F., Laboisse, C., Vergnolle, N., *et al.* (2012). A spontaneous mutation of the rat Themis gene leads to impaired function of regulatory T cells linked to inflammatory bowel disease. *PLoS Genet* 8, e1002461.
- Chen, Z., Barbi, J., Bu, S., Yang, H.Y., Li, Z., Gao, Y., Jinasena, D., Fu, J., Lin, F., Chen, C., *et al.* (2013). The ubiquitin ligase Stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3. *Immunity* 39, 272-285.
- Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., Ferber, S., and Hershko, A. (1980a). Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J Biol Chem* 255, 7525-7528.
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A.L., and Hershko, A. (1980b). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1365-1368.
- Coyne, E.S., and Wing, S.S. (2016). The business of deubiquitination - location, location, location. *F1000Res* 5.
- Daniels, M.A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Holländer, G.A., Gascoigne, N.R., and Palmer, E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444, 724-729.

- Dave, V.P., Allman, D., Keefe, R., Hardy, R.R., and Kappes, D.J. (1998). HD mice: a novel mouse mutant with a specific defect in the generation of CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 8187-8192.
- Davey, G.M., Schober, S.L., Endrizzi, B.T., Dutcher, A.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (1998). Preselection thymocytes are more sensitive to T cell receptor stimulation than mature T cells. *J Exp Med* *188*, 1867-1874.
- DeKoning, J., DiMolfetto, L., Reilly, C., Wei, Q., Havran, W.L., and Lo, D. (1997). Thymic cortical epithelium is sufficient for the development of mature T cells in relB-deficient mice. *J Immunol* *158*, 2558-2566.
- Dubois, P.C., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K.A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G.A., Adány, R., Aromaa, A., *et al.* (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet* *42*, 295-302.
- Dufner, A., Kisser, A., Niendorf, S., Basters, A., Reissig, S., Schönle, A., Aichem, A., Kurz, T., Schlosser, A., Yablonski, D., *et al.* (2015). The ubiquitin-specific protease USP8 is critical for the development and homeostasis of T cells. *Nat Immunol* *16*, 950-960.
- Dzhagalov, I.L., Chen, K.G., Herzmark, P., and Robey, E.A. (2013). Elimination of self-reactive T cells in the thymus: a timeline for negative selection. *PLoS Biol* *11*, e1001566.
- Enzler, T., Chang, X., Facchinetti, V., Melino, G., Karin, M., Su, B., and Gallagher, E. (2009). MEKK1 binds HECT E3 ligase Itch by its amino-terminal RING motif to regulate Th2 cytokine gene expression. *J Immunol* *183*, 3831-3838.
- Finetti, F., Onnis, A., and Baldari, C.T. (2015). Regulation of vesicular traffic at the T cell immune synapse: lessons from the primary cilium. *Traffic* *16*, 241-249.
- Fu, G., Casas, J., Rigaud, S., Rybakina, V., Lambalez, F., Brzostek, J., Hoerter, J.A., Paster, W., Acuto, O., Cheroutre, H., *et al.* (2013). Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* *504*, 441-445.
- Fu, G., Vallee, S., Rybakina, V., McGuire, M.V., Ampudia, J., Brockmeyer, C., Salek, M., Fallen, P.R., Hoerter, J.A., Munshi, A., *et al.* (2009a). Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nature immunology* *10*, 848-856.
- Fu, G., Vallée, S., Rybakina, V., McGuire, M.V., Ampudia, J., Brockmeyer, C., Salek, M., Fallen, P.R., Hoerter, J.A., Munshi, A., *et al.* (2009b). Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat Immunol* *10*, 848-856.
- Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* *200*, 1039-1049.
- Gao, E.K., Lo, D., Cheney, R., Kanagawa, O., and Sprent, J. (1988). Abnormal differentiation of thymocytes in mice treated with cyclosporin A. *Nature* *336*, 176-179.
- Gao, J.X., Zhang, H., Bai, X.F., Wen, J., Zheng, X., Liu, J., Zheng, P., and Liu, Y. (2002). Perinatal blockade of b7-1 and b7-2 inhibits clonal deletion of highly pathogenic autoreactive T cells. *J Exp Med* *195*, 959-971.

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, 209-219.

Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150, 4244-4252.

Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., and Boyse, E.A. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 11-15.

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

GOOD, R.A., DALMASSO, A.P., MARTINEZ, C., ARCHER, O.K., PIERCE, J.C., and PAPERMASTER, B.W. (1962). The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice. *J Exp Med* 116, 773-796.

Grabbe, C., and Dikic, I. (2009). Functional roles of ubiquitin-like domain (ULD) and ubiquitin-binding domain (UBD) containing proteins. *Chem Rev* 109, 1481-1494.

Grawunder, U., and Harfst, E. (2001). How to make ends meet in V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* 13, 186-194.

Groettrup, M., Pelzer, C., Schmidtke, G., and Hofmann, K. (2008). Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem Sci* 33, 230-237.

Groves, T., Katis, P., Madden, Z., Manickam, K., Ramsden, D., Wu, G., and Guidos, C.J. (1995). In vitro maturation of clonal CD4+CD8+ cell lines in response to TCR engagement. *J Immunol* 154, 5011-5022.

Groves, T., Smiley, P., Cooke, M.P., Forbush, K., Perlmutter, R.M., and Guidos, C.J. (1996). Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development. *Immunity* 5, 417-428.

Guo, D., Teng, Q., and Ji, C. (2011). NOTCH and phosphatidylinositol 3-kinase/phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling in T-cell development and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 52, 1200-1210.

Haas, A.L., Warms, J.V., Hershko, A., and Rose, I.A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 257, 2543-2548.

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., and Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5, 461-466.

Hernández-Hoyos, G., Sohn, S.J., Rothenberg, E.V., and Alberola-Ila, J. (2000). Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment. *Immunity* 12, 313-322.

Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., and Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1783-1786.

- Hershko, A., Ciechanover, A., and Rose, I.A. (1979). Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 3107-3110.
- Hettmann, T., and Leiden, J.M. (2000). NF-kappa B is required for the positive selection of CD8+ thymocytes. *J Immunol* *165*, 5004-5010.
- Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2014). The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate 'decisions' and effector function. *Nature immunology* *15*, 815-823.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* *76*, 17-27.
- Houtman, J.C., Yamaguchi, H., Barda-Saad, M., Braiman, A., Bowden, B., Appella, E., Schuck, P., and Samelson, L.E. (2006). Oligomerization of signaling complexes by the multipoint binding of GRB2 to both LAT and SOS1. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 798-805.
- Hu, H., Wang, H., Xiao, Y., Jin, J., Chang, J.H., Zou, Q., Xie, X., Cheng, X., and Sun, S.C. (2016). Otud7b facilitates T cell activation and inflammatory responses by regulating Zap70 ubiquitination. *J Exp Med* *213*, 399-414.
- Hu, M., Li, P., Song, L., Jeffrey, P.D., Chenova, T.A., Wilkinson, K.D., Cohen, R.E., and Shi, Y. (2005). Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J* *24*, 3747-3756.
- Huang, H., Jeon, M.S., Liao, L., Yang, C., Elly, C., Yates, J.R., and Liu, Y.C. (2010). K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity* *33*, 60-70.
- Husnjak, K., and Dikic, I. (2012). Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem* *81*, 291-322.
- Iphöfer, A., Kummer, A., Nimtz, M., Ritter, A., Arnold, T., Frank, R., van den Heuvel, J., Kessler, B.M., Jänsch, L., and Franke, R. (2012). Profiling ubiquitin linkage specificities of deubiquitinating enzymes with branched ubiquitin isopeptide probes. *Chembiochem* *13*, 1416-1420.
- Izrailit, J., Jaiswal, A., Zheng, W., Moran, M.F., and Reedijk, M. (2016). Cellular stress induces TRB3/USP9x-dependent Notch activation in cancer. *Oncogene*.
- Jahan, A.S., Lestra, M., Swee, L.K., Fan, Y., Lamers, M.M., Tafesse, F.G., Theile, C.S., Spooner, E., Bruzzone, R., Ploegh, H.L., *et al.* (2016). Usp12 stabilizes the T-cell receptor complex at the cell surface during signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, E705-714.
- Jang, I.K., Zhang, J., Chiang, Y.J., Kole, H.K., Cronshaw, D.G., Zou, Y., and Gu, H. (2010). Grb2 functions at the top of the T-cell antigen receptor-induced tyrosine kinase cascade to control thymic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 10620-10625.
- Jenkins, M.K., Schwartz, R.H., and Pardoll, D.M. (1988). Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion. *Science* *241*, 1655-1658.
- Jensen, K.D., Su, X., Shin, S., Li, L., Youssef, S., Yamasaki, S., Steinman, L., Saito, T., Locksley, R.M., Davis, M.M., *et al.* (2008). Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-

naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity* 29, 90-100.

Jin, S., Tian, S., Chen, Y., Zhang, C., Xie, W., Xia, X., Cui, J., and Wang, R.F. (2016). USP19 modulates autophagy and antiviral immune responses by deubiquitinating Beclin-1. *EMBO J* 35, 866-880.

Johnson, A.L., Aravind, L., Shulzhenko, N., Morgun, A., Choi, S.Y., Crockford, T.L., Lambe, T., Domaschenz, H., Kucharska, E.M., Zheng, L., *et al.* (2009). Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat Immunol* 10, 831-839.

Johnson, D.J., Pao, L.I., Dhanji, S., Murakami, K., Ohashi, P.S., and Neel, B.G. (2013). Shp1 regulates T cell homeostasis by limiting IL-4 signals. *J Exp Med* 210, 1419-1431.

Juntilla, M.M., Wofford, J.A., Birnbaum, M.J., Rathmell, J.C., and Koretzky, G.A. (2007). Akt1 and Akt2 are required for alphabeta thymocyte survival and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12105-12110.

Kee, Y., Lyon, N., and Huijbregtse, J.M. (2005). The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *EMBO J* 24, 2414-2424.

Kim, K.W., Myers, R.A., Lee, J.H., Igartua, C., Lee, K.E., Kim, Y.H., Kim, E.J., Yoon, D., Lee, J.S., Hirota, T., *et al.* (2015). Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children. *J Allergy Clin Immunol* 136, 678-684.e674.

Kishimoto, H., and Sprent, J. (1999). Several different cell surface molecules control negative selection of medullary thymocytes. *J Exp Med* 190, 65-73.

Kisielow, P., Blüthmann, H., Staerz, U.D., Steinmetz, M., and von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333, 742-746.

Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009a). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 550-563.

Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81, 203-229.

Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J.D., Odenwaelder, P., Wilkinson, K.D., and Barford, D. (2009b). Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep* 10, 466-473.

Kosugi, A., Sakakura, J., Yasuda, K., Ogata, M., and Hamaoka, T. (2001). Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts. *Immunity* 14, 669-680.

Kronenberg, M., and Engel, I. (2007). On the road: progress in finding the unique pathway of invariant NKT cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 19, 186-193.

Lanier, L.L., Spits, H., and Phillips, J.H. (1992). The developmental relationship between NK cells and T cells. *Immunol Today* 13, 392-395.

Larghi, P., Williamson, D.J., Carpier, J.M., Dogniaux, S., Chemin, K., Bohineust, A., Danglot, L., Gaus, K., Galli, T., and Hivroz, C. (2013). VAMP7 controls T cell activation by regulating the recruitment and phosphorylation of vesicular Lat at TCR-activation sites. *Nat Immunol* 14, 723-731.

- Lee, J.G., Kim, W., Gygi, S., and Ye, Y. (2014). Characterization of the deubiquitinating activity of USP19 and its role in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* 289, 3510-3517.
- Lee, K., Nam, K.T., Cho, S.H., Gudapati, P., Hwang, Y., Park, D.S., Potter, R., Chen, J., Volanakis, E., and Boothby, M. (2012). Vital roles of mTOR complex 2 in Notch-driven thymocyte differentiation and leukemia. *J Exp Med* 209, 713-728.
- Legname, G., Seddon, B., Lovatt, M., Tomlinson, P., Sarner, N., Tolaini, M., Williams, K., Norton, T., Kioussis, D., and Zamoyska, R. (2000). Inducible expression of a p56Lck transgene reveals a central role for Lck in the differentiation of CD4 SP thymocytes. *Immunity* 12, 537-546.
- Lesourne, R., Uehara, S., Lee, J., Song, K.D., Li, L., Pinkhasov, J., Zhang, Y., Weng, N.P., Wildt, K.F., Wang, L., *et al.* (2009). Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nature immunology* 10, 840-847.
- Lesourne, R., Zvezdova, E., Song, K.D., El-Khoury, D., Uehara, S., Barr, V.A., Samelson, L.E., and Love, P.E. (2012). Interchangeability of themis1 and themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J Immunol* 189, 1154-1161.
- Lin, H., Yin, L., Reid, J., Wilkinson, K.D., and Wing, S.S. (2001). Divergent N-terminal sequences of a deubiquitinating enzyme modulate substrate specificity. *J Biol Chem* 276, 20357-20363.
- Lin, J.T., Lineberry, N.B., Kattah, M.G., Su, L.L., Utz, P.J., Fathman, C.G., and Wu, L. (2009). Naive CD4 t cell proliferation is controlled by mammalian target of rapamycin regulation of GRAIL expression. *J Immunol* 182, 5919-5928.
- Linette, G.P., Grusby, M.J., Hedrick, S.M., Hansen, T.H., Glimcher, L.H., and Korsmeyer, S.J. (1994). Bcl-2 is upregulated at the CD4+ CD8+ stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control points. *Immunity* 1, 197-205.
- Liu, S.K., Fang, N., Koretzky, G.A., and McGlade, C.J. (1999). The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol* 9, 67-75.
- Liu, X., and Bosselut, R. (2004). Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo. *Nature immunology* 5, 280-288.
- Liu, Y.C. (2004). Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol* 22, 81-127.
- Lopes, N., Sergé, A., Ferrier, P., and Irla, M. (2015). Thymic Crosstalk Coordinates Medulla Organization and T-Cell Tolerance Induction. *Front Immunol* 6, 365.
- Lorenz, U. (2009). SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. *Immunol Rev* 228, 342-359.
- Malissen, B., Gregoire, C., Malissen, M., and Roncagalli, R. (2014). Integrative biology of T cell activation. *Nature immunology* 15, 790-797.
- Malynn, B.A., and Ma, A. (2010). Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity* 33, 843-852.

- Mariathasan, S., Zakarian, A., Bouchard, D., Michie, A.M., Zúñiga-Pflücker, J.C., and Ohashi, P.S. (2001). Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* *167*, 4966-4973.
- Mattioli, F., and Sixma, T.K. (2014). Lysine-targeting specificity in ubiquitin and ubiquitin-like modification pathways. *Nat Struct Mol Biol* *21*, 308-316.
- Matzinger, P., Zamoyska, R., and Waldmann, H. (1984). Self tolerance is H-2-restricted. *Nature* *308*, 738-741.
- McCullough, J., Row, P.E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M.J., and Urbé, S. (2006). Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol* *16*, 160-165.
- McNeil, L.K., Starr, T.K., and Hogquist, K.A. (2005). A requirement for sustained ERK signaling during thymocyte positive selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13574-13579.
- Mei, Y., Hahn, A.A., Hu, S., and Yang, X. (2011). The USP19 deubiquitinase regulates the stability of c-IAP1 and c-IAP2. *J Biol Chem* *286*, 35380-35387.
- Melichar, H.J., Ross, J.O., Herzmark, P., Hogquist, K.A., and Robey, E.A. (2013). Distinct temporal patterns of T cell receptor signaling during positive versus negative selection in situ. *Sci Signal* *6*, ra92.
- Metzger, M.B., Pruneda, J.N., Klevit, R.E., and Weissman, A.M. (2014). RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochim Biophys Acta* *1843*, 47-60.
- Michelle, C., Vourc'h, P., Mignon, L., and Andres, C.R. (2009). What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J Mol Evol* *68*, 616-628.
- Molina, T.J., Kishihara, K., Siderovski, D.P., van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C.J., Hartmann, K.U., and Veillette, A. (1992). Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* *357*, 161-164.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869-877.
- Murata, S., Takahama, Y., and Tanaka, K. (2008). Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr Opin Immunol* *20*, 192-196.
- Murphy, M.A., Schnall, R.G., Venter, D.J., Barnett, L., Bertonecello, I., Thien, C.B., Langdon, W.Y., and Bowtell, D.D. (1998). Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. *Mol Cell Biol* *18*, 4872-4882.
- Nagai, H., Noguchi, T., Homma, K., Katagiri, K., Takeda, K., Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2009). Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death. *Mol Cell* *36*, 805-818.
- Naik, E., and Dixit, V.M. (2016). Usp9X Is Required for Lymphocyte Activation and Homeostasis through Its Control of ZAP70 Ubiquitination and PKC β Kinase Activity. *J Immunol* *196*, 3438-3451.

- Naik, E., Webster, J.D., DeVoss, J., Liu, J., Suriben, R., and Dixit, V.M. (2014). Regulation of proximal T cell receptor signaling and tolerance induction by deubiquitinase Usp9X. *The Journal of experimental medicine* 211, 1947-1955.
- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., and Rudensky, A.Y. (1998). Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280, 450-453.
- Nakamura, N., Harada, K., Kato, M., and Hirose, S. (2014). Ubiquitin-specific protease 19 regulates the stability of the E3 ubiquitin ligase MARCH6. *Exp Cell Res* 328, 207-216.
- Naramura, M., Kole, H.K., Hu, R.J., and Gu, H. (1998). Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15547-15552.
- Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A.C., and Loh, D.Y. (1995). Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376, 435-438.
- Neilson, J.R., Winslow, M.M., Hur, E.M., and Crabtree, G.R. (2004). Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity* 20, 255-266.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773-786.
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K., and Messaoudi, I. (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol* 4, 123-132.
- O'Leary, C.E., Lewis, E.L., and Oliver, P.M. (2015). Ubiquitylation as a Rheostat for TCR Signaling: From Targeted Approaches Toward Global Profiling. *Front Immunol* 6, 618.
- Oh-hora, M. (2009). Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol Rev* 231, 210-224.
- Okada, T., Nitta, T., Kaji, K., Takashima, A., Oda, H., Tamehiro, N., Goto, M., Okamura, T., Patrick, M.S., and Suzuki, H. (2014). Differential function of Themis CABIT domains during T cell development. *PLoS One* 9, e89115.
- Outters, P., Jaeger, S., Zaarour, N., and Ferrier, P. (2015). Long-Range Control of V(D)J Recombination & Allelic Exclusion: Modeling Views. *Adv Immunol* 128, 363-413.
- Palacios, E.H., and Weiss, A. (2007). Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. *J Exp Med* 204, 1703-1715.
- Park, Y., Jin, H.S., and Liu, Y.C. (2013). Regulation of T cell function by the ubiquitin-specific protease USP9X via modulating the Carma1-Bcl10-Malt1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9433-9438.
- Paster, W., Brockmeyer, C., Fu, G., Simister, P.C., de Wet, B., Martinez-Riano, A., Hoerter, J.A., Feller, S.M., Wulfig, C., Gascoigne, N.R., *et al.* (2013a). GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J Immunol* 190, 3749-3756.

- Paster, W., Brockmeyer, C., Fu, G., Simister, P.C., de Wet, B., Martinez-Riaño, A., Hoerter, J.A., Feller, S.M., Wülfing, C., Gascoigne, N.R., *et al.* (2013b). GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J Immunol* *190*, 3749-3756.
- Paster, W., Bruger, A.M., Katsch, K., Grégoire, C., Roncagalli, R., Fu, G., Gascoigne, N.R., Nika, K., Cohnen, A., Feller, S.M., *et al.* (2015). A THEMIS:SHP1 complex promotes T-cell survival. *EMBO J* *34*, 393-409.
- Patrick, M.S., Oda, H., Hayakawa, K., Sato, Y., Eshima, K., Kirikae, T., Iemura, S., Shirai, M., Abe, T., Natsume, T., *et al.* (2009). Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 16345-16350.
- Patterson, C. (2002). A new gun in town: the U box is a ubiquitin ligase domain. *Sci STKE* *2002*, pe4.
- Paz, P.E., Wang, S., Clarke, H., Lu, X., Stokoe, D., and Abo, A. (2001). Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem J* *356*, 461-471.
- Pelzer, C., Kassner, I., Matentzoglou, K., Singh, R.K., Wollscheid, H.P., Scheffner, M., Schmidtke, G., and Groettrup, M. (2007). UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J Biol Chem* *282*, 23010-23014.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* *21*, 921-926.
- Pickart, C.M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J* *11*, 1055-1066.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* *70*, 503-533.
- Pickart, C.M. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell* *116*, 181-190.
- Pintard, L., Willems, A., and Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* *23*, 1681-1687.
- Poalas, K., Hatchi, E.M., Cordeiro, N., Dubois, S.M., Leclair, H.M., Leveau, C., Alexia, C., Gavard, J., Vazquez, A., and Bidère, N. (2013). Negative regulation of NF- κ B signaling in T lymphocytes by the ubiquitin-specific protease USP34. *Cell Commun Signal* *11*, 25.
- Reiley, W.W., Zhang, M., Jin, W., Losiewicz, M., Donohue, K.B., Norbury, C.C., and Sun, S.C. (2006). Regulation of T cell development by the deubiquitinating enzyme CYLD. *Nat Immunol* *7*, 411-417.
- Rhee, I., and Veillette, A. (2012). Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol* *13*, 439-447.
- Rhee, S.G., and Bae, Y.S. (1997). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* *272*, 15045-15048.
- Roa, N.S., Ordoñez-Rueda, D., Chávez-Rios, J.R., Raman, C., García-Zepeda, E.A., Lozano, F., and Soldevila, G. (2013). The carboxy-terminal region of CD5 is required for c-CBL mediated TCR signaling downmodulation in thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *432*, 52-59.

- Ross, J.O., Melichar, H.J., Au-Yeung, B.B., Herzmark, P., Weiss, A., and Robey, E.A. (2014). Distinct phases in the positive selection of CD8⁺ T cells distinguished by intrathymic migration and T-cell receptor signaling patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, E2550-2558.
- Rotin, D., and Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 398-409.
- Row, P.E., Prior, I.A., McCullough, J., Clague, M.J., and Urbé, S. (2006). The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J Biol Chem* *281*, 12618-12624.
- Saito, K., Kigawa, T., Koshiba, S., Sato, K., Matsuo, Y., Sakamoto, A., Takagi, T., Shirouzu, M., Yabuki, T., Nunokawa, E., *et al.* (2004). The CAP-Gly domain of CYLD associates with the proline-rich sequence in NEMO/IKKgamma. *Structure* *12*, 1719-1728.
- 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*, 223-231.
- Saveliev, A., Vanes, L., Ksionda, O., Rapley, J., Smerdon, S.J., Rittinger, K., and Tybulewicz, V.L. (2009). Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in T cell development and activation. *Sci Signal* *2*, ra83.
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S.E., *et al.* (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* *476*, 214-219.
- Scharschmidt, E., Wegener, E., Heissmeyer, V., Rao, A., and Krappmann, D. (2004). Degradation of Bcl10 induced by T-cell activation negatively regulates NF-kappa B signaling. *Mol Cell Biol* *24*, 3860-3873.
- Schatz, D.G., and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* *11*, 251-263.
- Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J.M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* *373*, 81-83.
- Schulze-Luehrmann, J., and Ghosh, S. (2006). Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* *25*, 701-715.
- Seufert, W., and Jentsch, S. (1992). In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J* *11*, 3077-3080.
- Shen, S., Zhu, M., Lau, J., Chuck, M., and Zhang, W. (2009). The essential role of LAT in thymocyte development during transition from the double-positive to single-positive stage. *J Immunol* *182*, 5596-5604.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* *68*, 855-867.
- Singer, A., Adoro, S., and Park, J.H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4⁻ versus CD8⁻ lineage choice. *Nat Rev Immunol* *8*, 788-801.

- Skaug, B., Jiang, X., and Chen, Z.J. (2009). The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* 78, 769-796.
- Spratt, D.E., Walden, H., and Shaw, G.S. (2014). RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem J* 458, 421-437.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* 21, 139-176.
- Stawiecka-Mirota, M., Pokrzywa, W., Morvan, J., Zoladek, T., Haguenaer-Tsapis, R., Urban-Grimal, D., and Morsomme, P. (2007). Targeting of Snap3p to the endosomal pathway depends on its interaction with Rsp5p and multivesicular body sorting on its ubiquitylation. *Traffic* 8, 1280-1296.
- Stefanova, I., Hemmer, B., Vergelli, M., Martin, R., Biddison, W.E., and Germain, R.N. (2003). TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nature immunology* 4, 248-254.
- Stein, P.L., Lee, H.M., Rich, S., and Soriano, P. (1992). pp59fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 70, 741-750.
- Stephen, T.L., Tikhonova, A., Riberdy, J.M., and Laufer, T.M. (2009). The activation threshold of CD4+ T cells is defined by TCR/peptide-MHC class II interactions in the thymic medulla. *J Immunol* 183, 5554-5562.
- Sugawara, T., Moriguchi, T., Nishida, E., and Takahama, Y. (1998). Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* 9, 565-574.
- Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res* 26, 399-422.
- Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T., and Takayanagi, H. (2015). Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* 163, 975-987.
- Takada, K., and Takahama, Y. (2015). Positive-selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells. *Adv Immunol* 125, 87-110.
- Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6, 127-135.
- Taniguchi, T., Tanaka, S., Ishii, A., Watanabe, M., Fujitani, N., Sugeo, A., Gotoh, S., Ohta, T., Hiyoshi, M., Matsuzaki, H., *et al.* (2013). A brain-specific Grb2-associated regulator of extracellular signal-regulated kinase (Erk)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) (GAREM) subtype, GAREM2, contributes to neurite outgrowth of neuroblastoma cells by regulating Erk signaling. *J Biol Chem* 288, 29934-29942.
- Tashiro, K., Tsunematsu, T., Okubo, H., Ohta, T., Sano, E., Yamauchi, E., Taniguchi, H., and Konishi, H. (2009). GAREM, a novel adaptor protein for growth factor receptor-bound protein 2, contributes to cellular transformation through the activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *J Biol Chem* 284, 20206-20214.
- Thanh Nguyen, H., Andrejeva, D., Gupta, R., Choudhary, C., Hong, X., Eichhorn, P.J., Loya, A.C., and Cohen, S.M. (2016). Deubiquitylating enzyme USP9x regulates hippo pathway activity by controlling angiomin protein turnover. *Cell Discov* 2, 16001.

- Thien, C.B., Dagger, S.A., Steer, J.H., Koentgen, F., Jansen, E.S., Scott, C.L., and Langdon, W.Y. (2010). c-Cbl promotes T cell receptor-induced thymocyte apoptosis by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 285, 10969-10981.
- Thien, C.B., and Langdon, W.Y. (1998). c-Cbl: a regulator of T cell receptor-mediated signalling. *Immunol Cell Biol* 76, 473-482.
- Thien, C.B., and Langdon, W.Y. (2005). c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. *Biochem J* 391, 153-166.
- Théard, D., Labarrade, F., Partisani, M., Milanini, J., Sakagami, H., Fon, E.A., Wood, S.A., Franco, M., and Luton, F. (2010). USP9x-mediated deubiquitination of EFA6 regulates de novo tight junction assembly. *EMBO J* 29, 1499-1509.
- Tian, X., Isamiddinova, N.S., Peroutka, R.J., Goldenberg, S.J., Mattern, M.R., Nicholson, B., and Leach, C. (2011). Characterization of selective ubiquitin and ubiquitin-like protease inhibitors using a fluorescence-based multiplex assay format. *Assay Drug Dev Technol* 9, 165-173.
- Udeshi, N.D., Svinkina, T., Mertins, P., Kuhn, E., Mani, D.R., Qiao, J.W., and Carr, S.A. (2013). Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K-ε-GG) antibody enables routine quantification of 10,000s of ubiquitination sites in single proteomics experiments. *Mol Cell Proteomics* 12, 825-831.
- van Loosdregt, J., Fleskens, V., Fu, J., Brenkman, A.B., Bekker, C.P., Pals, C.E., Meerding, J., Berkers, C.R., Barbi, J., Gröne, A., *et al.* (2013). Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases Treg-cell-suppressive capacity. *Immunity* 39, 259-271.
- van Oers, N.S., Lowin-Kropf, B., Finlay, D., Connolly, K., and Weiss, A. (1996). alpha beta T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity* 5, 429-436.
- Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C., and Fushman, D. (2004). Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem* 279, 7055-7063.
- Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., and Bolen, J.B. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55, 301-308.
- Voll, R.E., Jimi, E., Phillips, R.J., Barber, D.F., Rincon, M., Hayday, A.C., Flavell, R.A., and Ghosh, S. (2000). NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity* 13, 677-689.
- von Boehmer, H., Aifantis, I., Gounari, F., Azogui, O., Haughn, L., Apostolou, I., Jaeckel, E., Grassi, F., and Klein, L. (2003). Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev* 191, 62-78.
- von Boehmer, H., Teh, H.S., and Kisielow, P. (1989). The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today* 10, 57-61.
- Vukmanović, S., Granda, A.G., Faas, S.J., Knowles, B.B., and Bevan, M.J. (1992). Positive selection of T-lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line. *Nature* 359, 729-732.
- Walunas, T.L., Sperling, A.I., Khattry, R., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1996). CD28 expression is not essential for positive and negative selection of thymocytes or peripheral T cell tolerance. *J Immunol* 156, 1006-1013.

- Wang, H., Wei, B., Bismuth, G., and Rudd, C.E. (2009). SLP-76-ADAP adaptor module regulates LFA-1 mediated costimulation and T cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 12436-12441.
- Wang, H.Y., Altman, Y., Fang, D., Elly, C., Dai, Y., Shao, Y., and Liu, Y.C. (2001). Cbl promotes ubiquitination of the T cell receptor zeta through an adaptor function of Zap-70. *J Biol Chem* *276*, 26004-26011.
- Wang, L., Wildt, K.F., Zhu, J., Zhang, X., Feigenbaum, L., Tessarollo, L., Paul, W.E., Fowlkes, B.J., and Bosselut, R. (2008). Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4(+) T cells. *Nat Immunol* *9*, 1122-1130.
- Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B.J., Cado, D., and Robey, E. (1997). Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* *88*, 833-843.
- Watanabe, Y., Sasahara, Y., Ramesh, N., Massaad, M.J., Yeng Looi, C., Kumaki, S., Kure, S., Geha, R.S., and Tsuchiya, S. (2013). T-cell receptor ligation causes Wiskott-Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly downregulation. *J Allergy Clin Immunol* *132*, 648-655.e641.
- Wilkinson, K.D. (2004). Ubiquitin: a Nobel protein. *Cell* *119*, 741-745.
- Wilkinson, R.W., Anderson, G., Owen, J.J., and Jenkinson, E.J. (1995). Positive selection of thymocytes involves sustained interactions with the thymic microenvironment. *J Immunol* *155*, 5234-5240.
- Wilson, A., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2001). Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* *194*, 1003-1012.
- Wu, L., Antica, M., Johnson, G.R., Scollay, R., and Shortman, K. (1991). Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* *174*, 1617-1627.
- Xu, M., Skaug, B., Zeng, W., and Chen, Z.J. (2009a). A ubiquitin replacement strategy in human cells reveals distinct mechanisms of IKK activation by TNFalpha and IL-1beta. *Mol Cell* *36*, 302-314.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009b). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* *137*, 133-145.
- Xue, L., Chiang, L., Kang, C., and Winoto, A. (2008). The role of the PI3K-AKT kinase pathway in T-cell development beyond the beta checkpoint. *Eur J Immunol* *38*, 3200-3207.
- Yamaguchi, H., and Hendrickson, W.A. (1996). Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* *384*, 484-489.
- Yang, B., Gay, D.L., MacLeod, M.K., Cao, X., Hala, T., Sweezer, E.M., Kappler, J., Marrack, P., and Oliver, P.M. (2008). Nedd4 augments the adaptive immune response by promoting ubiquitin-mediated degradation of Cbl-b in activated T cells. *Nat Immunol* *9*, 1356-1363.
- Yang, B., Zhang, S., Wang, Z., Yang, C., Ouyang, W., Zhou, F., Zhou, Y., and Xie, C. (2016). Deubiquitinase USP9X deubiquitinates β -catenin and promotes high grade glioma cell growth. *Oncotarget* *7*, 79515-79525.
- Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 755-764.

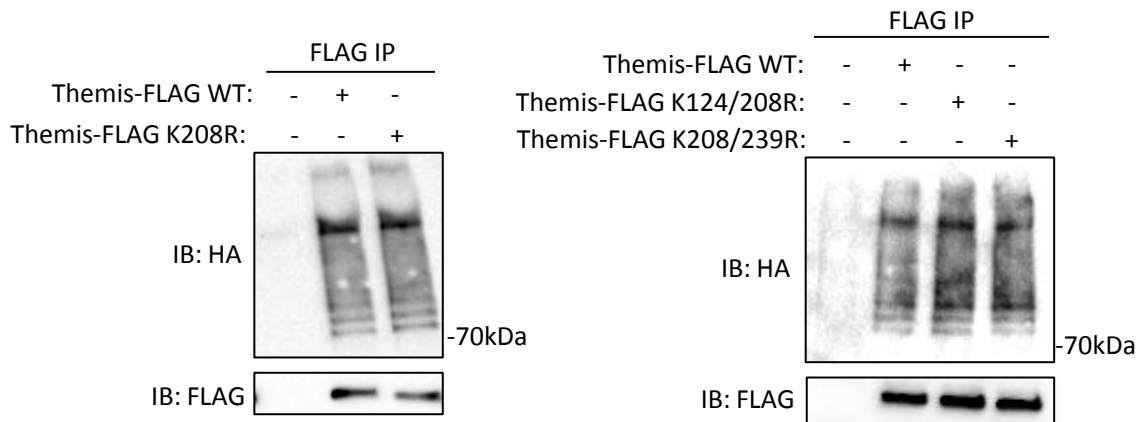
Yu, Q., Erman, B., Bhandoola, A., Sharrow, S.O., and Singer, A. (2003). In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells. *J Exp Med* 197, 475-487.

Zhang, W., Sommers, C.L., Burshtyn, D.N., Stebbins, C.C., DeJarnette, J.B., Triple, R.P., Grinberg, A., Tsay, H.C., Jacobs, H.M., Kessler, C.M., *et al.* (1999). Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* 10, 323-332.

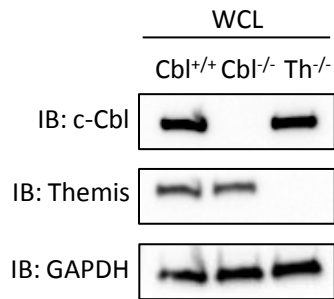
Zou, Q., Jin, J., Hu, H., Li, H.S., Romano, S., Xiao, Y., Nakaya, M., Zhou, X., Cheng, X., Yang, P., *et al.* (2014). USP15 stabilizes MDM2 to mediate cancer-cell survival and inhibit antitumor T cell responses. *Nat Immunol* 15, 562-570.

Zvezdova, E., Lee, J., El-Khoury, D., Barr, V., Akpan, I., Samelson, L., and Love, P.E. (2014). In vivo functional mapping of the conserved protein domains within murine Themis1. *Immunol Cell Biol* 92, 721-728.

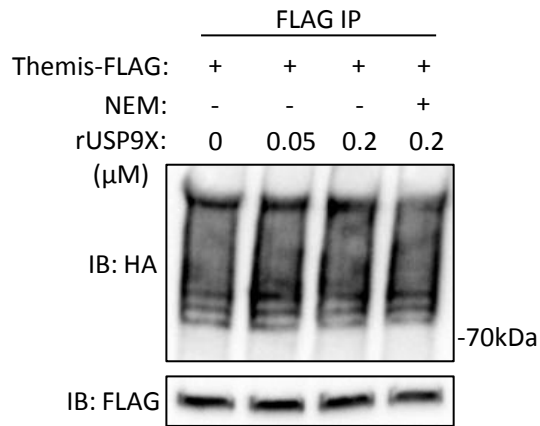
Zvezdova, E., Mikolajczak, J., Garreau, A., Marcellin, M., Rigal, L., Lee, J., Choi, S., Blaize, G., Argenty, J., Familiades, J., *et al.* (2016). Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Science signaling* 9, ra51.



Annex 1: Themis ubiquitination is not decreased after mutations of lysines. Jurkat cells were transfected with plasmids encoding HA-tagged ubiquitin plus plasmids encoding FLAG-tagged Themis wild-type (WT) or mutated on lysines in position 124, 208 or 239 as indicated. Themis was immunoprecipitated from cellular extracts of Jurkat cells and samples were analyzed by Western blotting with indicated antibodies. Western blots are from one experiment and are representative of three independent experiments.



Annex 2: Themis expression is not decreased in c-Cbl^{-/-} mice. Total cytoplasmic extracts of thymocytes from Cbl^{+/+}, Cbl^{-/-} and Themis^{-/-} (Th^{-/-}) mice were analyzed by Western blotting with indicated antibodies. Western blots is from one experiment.



Annex 3: Themis ubiquitylation is not decreased after incubation with recombinant USP9X. Jurkat cells were transfected with plasmids encoding FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding HA-tagged ubiquitin. Themis was immunoprecipitated from cellular extracts of Jurkat cells and samples were incubated 2h with recombinant USP9X in DUB buffer with or without the deubiquitylase inhibitor NEM. Themis ubiquitylation was analyzed by Western blotting with anti-HA antibodies. Western blots are from one experiment and are representative of four independent experiments.

Anne Garreau

Characterization of ubiquitylation processes that regulate Themis protein during T cell development

The protein Themis is a new actor of the T cell receptor (TCR) signaling essential for the positive selection of T cells. The molecular function of Themis has been controversial but recent findings suggest that it acts as positive regulator of TCR signaling. We demonstrated in an initial research that Themis interacts with deubiquitylases and is covalently associated to ubiquitin chains in thymocytes. The aim of my PhD project was to characterize the molecular process that regulates the ubiquitination of Themis and to investigate how these post-translational modifications affect Themis function during T cell development. We demonstrated that Themis mRNA expression is progressively decreased after positive selection whereas Themis protein expression is enhanced at the early stages of positive selection, suggesting that Themis is stabilized by post-translational modifications during positive selection. We demonstrated that USP9X allows the deubiquitination of Themis and its stabilization following TCR engagement. Ours results suggest that USP9X is activated during TCR engagement following its recruitment to proximal signaling complexes through Grb2 and Themis, leading to the deubiquitination and stabilization of Themis expression. We believe that this mechanism is important to sustain Themis expression during positive selection and to promote durable TCR signals required for the efficiency of this process.

Anne Garreau

Caractérisation des processus d'ubiquitination régulant la protéine Themis durant le développement des lymphocytes T

Directeur de thèse : Dr Renaud Lesourne et Dr Abdelhadi Saoudi

Thèse soutenue à Toulouse, le 04 avril 2017

Themis est une protéine de signalisation des récepteurs des lymphocytes T (TCR) essentielle pour la sélection positive des cellules T. La fonction moléculaire de Themis a été controversée mais de récentes études suggèrent qu'il est un régulateur positif des voies de signalisation des TCR. Nous avons montré dans une étude préliminaire que Themis interagit avec des déubiquitinasés et qu'il est ubiquitiné dans les thymocytes. L'objectif de ma thèse était de caractériser les mécanismes moléculaires qui régulent l'ubiquitination de Themis et de déterminer si ces processus affectent la fonction de Themis durant le développement des lymphocytes T. Nous avons montré que si l'expression des ARNm codant pour Themis diminue dans les stades précoces de la sélection positive, son expression protéique est parallèlement augmentée, suggérant une stabilisation de Themis par des modifications post-traductionnelles durant cette étape. Nous avons montré que la déubiquitinase USP9X déubiquitine Themis pour stabiliser son expression durant la stimulation des TCR. L'ensemble de nos résultats proposent qu'USP9X soit activé durant la stimulation des TCR grâce à son recrutement dans les complexes proximaux des TCR par l'intermédiaire de l'adaptateur Grb2 et Themis, entraînant la stabilisation de l'expression de Themis. Nous pensons que ce mécanisme est important pour maintenir l'expression de Themis durant la sélection positive afin de favoriser l'induction d'un signal des TCR soutenu, requis pour l'efficacité de ce processus.

Mots clefs : Lymphocytes T, Ubiquitination, Signalisation des TCR, sélection thymique

Discipline : Immunologie

INSERM UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan
Equipe 10, Bases moléculaires et déterminismes physiologiques de la signalisation dans les
lymphocytes T
Batiment B . 4ème étage
CHU Purpan – BP 3028
31024 Toulouse Cedex 3
France