



Caractérisation de Fam65b, un nouvel effecteur de FoxO1 dans la régulation de la quiescence

Jeanne Froehlich

► To cite this version:

Jeanne Froehlich. Caractérisation de Fam65b, un nouvel effecteur de FoxO1 dans la régulation de la quiescence. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB075 . tel-01816965

HAL Id: tel-01816965

<https://theses.hal.science/tel-01816965>

Submitted on 15 Jun 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 PARIS DESCARTES

École doctorale - Bio Sorbonne Paris Cité

Equipe E.Donnadieu/C.Randriamampita
« Dynamique des interactions lymphocytaires T »
Département Infection, Immunité, Inflammation
Institut Cochin
22 rue Méchain, 75014 Paris

Caractérisation de Fam65b, un nouvel effecteur de FoxO1 dans la régulation de la quiescence

Par Jeanne FROEHLICH

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Marianne MANGENEY

Présentée et soutenue publiquement le 27 octobre 2016

Devant un jury composé de :

Anne Dejean	Rapporteur
Jacques Nunès	Rapporteur
Karin Sadoul	Examineur
Jacqueline Marvel	Examineur
Geneviève de Saint-Basile	Examineur
Marianne Mangeney	Directrice de thèse
Franck Gesbert	Invité



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Résumé

Le comportement et le devenir des lymphocytes T (LT) est conditionné par l'intégration de nombreux signaux solubles et cellulaires. Lorsque les LT ne sont pas stimulés, les facteurs de transcription FoxO orchestrent un réseau moléculaire important participant au maintien de la quiescence et à la capacité migratoire des LT. Longtemps considéré comme un état par défaut, le maintien des LT dans cet état quiescent est hautement régulé par un ensemble de signaux parmi lesquels la signalisation *via* le récepteur à l'interleukine 7 (IL7) et le récepteur à l'antigène (TCR) activé par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chargées avec des peptides du soi. Étonnamment, ces mêmes signaux sont nécessaires pour induire l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. L'inhibition de la prolifération des LT est donc un mécanisme actif qui peut être levé par des signaux externes. Le mécanisme moléculaire permettant le maintien de cet état quiescent reste très peu décrit.

Mon projet de thèse a consisté à étudier les conséquences fonctionnelles de l'expression de Fam65b, une nouvelle cible transcriptionnelle de FoxO, sur la prolifération. Au cours de mon travail, j'ai montré que dans des cellules transformées, ayant donc perdu la capacité de réguler leur prolifération, l'expression forcée de Fam65b perturbe la mise en place du fuseau mitotique, induisant un arrêt en phase G₂/M et la mort des cellules. Au cours de ce processus, Fam65b agit avec deux partenaires connus pour leur implication dans le cycle cellulaire, l'histone déacétylase 6 (HDAC6) et la protéine d'échafaudage 14-3-3.

J'ai également pu établir que, dans les LT primaires humains, Fam65b est un facteur de quiescence. En effet, l'engagement du TCR induit une diminution d'expression de Fam65b et le maintien de son expression bloque la prolifération des LT, suggérant que l'inhibition de son expression est un pré-requis à la prolifération. Inversement, l'inhibition de l'expression de Fam65b dans des LT naïfs diminue leur seuil d'activation. L'ensemble de ces résultats désigne donc Fam65b comme une nouvelle cible pour le contrôle de la prolifération des cellules primaires et transformées.

Nous avons également développé au laboratoire un modèle murin invalidé pour Fam65b dans le lignage T afin d'étudier son rôle dans un modèle plus intégré. J'ai pu initier l'analyse du phénotype de ces souris en l'absence de toute stimulation.

L'ensemble de ces travaux, en complément de ceux précédemment obtenus au laboratoire, laissent apparaître Fam65b comme un nouvel effecteur de FoxO capable d'interagir avec divers partenaires afin de contrôler conjointement des fonctions cellulaires majeures.

Abstract

T cell fate is conditioned by the integration of many soluble and cellular signals. When T cells are not stimulated, FoxO transcription factors orchestrate an important molecular network involved in maintaining the quiescent state and migratory ability of the cells. Considered as a "default" state, it is now known that maintenance of T cell quiescence is a process highly regulated by a set of signals including IL7 signaling and sustained contact with MHC molecules presenting self-peptides. Surprisingly, these same signals are required to induce entry of cells into the cell cycle. Inhibition of T cell proliferation is an active mechanism that can be lifted by external signals. The molecular mechanism maintaining this quiescent state is poorly described.

My thesis project was studying the functional consequences of Fam65b expression, a new transcriptional target of FoxO, on proliferation. I showed that, in transformed cells, that have lost the ability to regulate their proliferation, forced expression of Fam65b disrupts the establishment of the mitotic spindle, inducing an arrest in G₂/M phase and cell death. During this process, Fam65b acts with two partners, known to be involved in the cell cycle process, the histone deacetylase HDAC6 and the 14-3-3 protein scaffold.

I have also been able to establish that in human primary T cell, Fam65b is a quiescence factor. Indeed, the TCR stimulation induces a reduction of Fam65b expression and maintaining its expression blocks the proliferation of T cells, suggesting that inhibition of Fam65b expression is a prerequisite for proliferation. Conversely, inhibition of Fam65b expression in naive T cells reduces their activation threshold. Altogether these results show that Fam65b is a new target for the control of the proliferation of primary and transformed cells.

We have also developed, in the laboratory, a mouse model invalidated for Fam65b in T cell lineage. I initiated the phenotype analysis of these mice in the absence of any stimulation.

This work, in addition to the previous results obtained in the laboratory, reveal that Fam65b is a new effector of FoxO factors, able to interact with various partners to jointly control major cellular functions.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chacun des membres de mon jury : merci à Anne Dejean, Franck Gesbert, Jacqueline Marvel, Jacques Nunès, Karin Sadoul et Geneviève de Saint-Basile pour l'analyse de mon travail et d'avoir accepté de participer à ma soutenance.

Merci à Marianne, ma directrice de thèse, de m'avoir accueillie sur ce projet, pas toujours évident, sans quoi cette formidable expérience n'aurait pas pu avoir lieu.

Merci à Jérôme pour tes conseils, pour ta contribution au projet, pour ces repas partagés les midis.

Merci à Georges pour ta disponibilité et tes nombreux conseils sur le projet. Merci pour tes blagues et analyses diététiques aux repas du midi.

Merci à Alain d'avoir été aussi accessible, pour la bonne ambiance que tu distilles et tes appels « séminaire » mémorables.

Merci à Clotilde de m'avoir fait découvrir et permis de participer à l'action Apprentis Chercheurs. Ce fut une expérience enrichissante à laquelle j'ai eu plaisir à prendre part.

Merci à Emmanuel pour ta disponibilité et tes blagues du vendredi soir.

Merci à Alex, la meilleure voisine de bureau, pour tous ces moments Pinterest, pour le partage de ton amour pour la cuisine et ce congrès à Vienne. Ton accent portugais nous a manqué cette année. Bon courage pour la fin de ta thèse, le meilleur est à venir.

Merci à Maxime pour ces presque cinq ans de partage de bureau, pour ton écoute à toute épreuve. Merci pour tous ces fous rires partagés, je repars avec un stock de bons souvenirs. Merci d'avoir animé avec moi ce super atelier ADN lors de la fête de la science. Il sera difficile de trouver un remplaçant à la hauteur.

Un jour il faut qu'on repartage un bureau tous les trois.

Merci à Marie pour tous ces bons gâteaux que tu nous as ramenés à chaque repas de Noël et ce co-voiturage Paris-Normandie bien sympathique.

Quelque soit l'endroit où j'irai, vous aurez, Max et toi, toujours une place réservée pour vos vacances.

Merci à Nicolas de nous avoir initié à de nouvelles cultures vestimentaire et culinaire si originales. Merci d'avoir encadré avec moi les apprentis chercheurs.

Merci à Fabienne pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton écoute. Merci pour toutes ces discussions légères, pour ton aide pratique dans les manip au quotidien.

Merci à Laura d'avoir partagé ce projet avec moi et de m'avoir conseillée sur les manip. Merci pour ton idée de week-end post-doc en Normandie bien sympathique à refaire sans hésiter.

Merci à Chloé de m'avoir intégrée à la blague de Mr Lotarie et pour toutes tes bonnes idées de sortie. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ton petit bout de chou.

Merci à Delphine pour tes visites au labo et ce pique-nique au parc Montsouris.

Merci à Quitterie de m'avoir accueillie à bras ouverts sur ce projet. Merci d'avoir partagé avec nous tes talents de chanteuse pendant les manip, j'ai pu réviser mes classiques.

Merci à Shamir pour tes talents d'acteur et cette scène mémorable du café salé. J'espère que tout se passe bien au pays des caribous.

Merci à Clara pour ta bonne humeur communicative durant ces quelques mois passés en ta compagnie. Bon courage pour cette année de master et ta future thèse.

Merci à Lisa pour ces quelques mois passés ensemble. J'espère que tu réussiras à t'épanouir dans ton nouveau job.

Merci à Margaux, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Merci d'avoir assuré les manip pour la révision du papier. J'espère que tu trouveras bientôt un nouveau labo où t'épanouir.

Merci à Marion et Adam d'avoir contribué à cette ambiance chaleureuse qui règne entre étudiants.

On se donne rendez-vous dans quelques années car les prochains c'est vous!!

Merci à Jean d'avoir été un voisin de bureau si sympathique et souriant. Je te souhaite bon courage pour la fin de tes études.

Merci à Elisa de nous avoir enseigné l'art de faire des pâtes. Merci pour ton sourire.

Merci à Houcine d'avoir été notre détecteur de virus officiel. Merci d'avoir

compensé nos lacunes en mots croisés du midi, de nous avoir fait rire avec tes blagues et autre imitation de pigeon (très réussie d'ailleurs).

Vielen Dank an Julia für diesen süßen deutschen Akzent im Labor zu bringen.

Merci à Rachida et Lene de nous permettre de manipuler en sécurité d'avoir réorganisé nos frigos et congélos, je ne suis plus la seule à savoir où sont rangées les affaires maintenant.

Merci à Sara et Chahrazade pour ces quelques mois passés ensemble. Parce qu'un passage compte bien plus qu'on ne l'imagine.

Merci à Nadège pour tous ces chocolats et autres petites attentions cachés dans nos bureaux. Merci pour tes conseils et ton côté maternel avec les « jeunes » du labo.

Merci à Vincent d'avoir toujours répondu présent à chaque fois que je débarquais dans ton bureau. Merci pour tes suggestions et tes questions.

Merci à Céline pour ta disponibilité et tes précieux conseils en bioch. J'ai beaucoup apprécié apprendre à tes côtés.

Merci à vous tous d'avoir fait de ce labo du 3e étage une deuxième maison.

Merci à tous ceux avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer au cours de ces quelques années passées à Cochin. Merci à Bruno, Agnès et Philippe de m'avoir ouvert la porte de vos laboratoires, merci pour tous vos conseils qui m'ont beaucoup apporté. Merci à Aurélie de m'avoir guidée dans mes premiers pas de manip souris et pour ta pédagogie. Merci à Florence et Loïc de m'avoir permis de participer à votre papier.

Merci à Audrey, Stéphanie, Aurélie et François pour toutes nos parties de cartes et ce week-end passé tous ensemble. Désolée de ne pas avoir pu venir plus souvent. C'est toujours un plaisir de vous retrouver.

Merci à Cédric pour nos 16 ans d'amitié sans faille (et oui déjà!), pour toutes ces années de classe partagées depuis le collège jusqu'à la fac, pour nos parties de bataille navale et j'en passe. Merci d'être toujours présent dans ma vie même si nous avons pris des chemins différents.

Merci à Antoine pour tous ces bons moments partagés, en cours ou à Cochin. Merci d'avoir contribué à faire de ces années de Master les plus belles de ma scolarité. Ces soirées devant le cytomètre à partager nos mésaventures laborantines vont me manquer.

Merci à Mathilde et Sandrine pour votre gentillesse et bon courage pour la suite.

Merci à Jean-Pierre, tu as d'abord été un professeur génial, tu es devenu au fil de ces années un ami extraordinaire, une personne sur qui je peux toujours compter. Merci d'avoir toujours gardé ta porte ouverte pour moi quand j'en avais besoin, ce fut une vraie bouffée d'oxygène. J'espère qu'on aura l'occasion de se recroiser à l'avenir.

Pour finir, je tiens à remercier tout particulièrement ma famille sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Vous avez toujours été présents à mes côtés et su trouver les mots pour me reconforter et m'encourager. Je vous remercie pour votre curiosité, votre ouverture d'esprit et votre générosité. J'en suis drôlement fière. Cette thèse vous est dédiée.

Table des matières

Table des figures	17
Liste des tableaux	18
Liste des abréviations	19
I Introduction	21
Avant-propos : La notion de quiescence	23
La quiescence un état hautement régulé	23
Définition et caractéristiques des cellules quiescentes	23
Les mécanismes de survie	29
La dérégulation du cycle cellulaire, exemple des cellules transformées . .	33
1 De la quiescence à la réponse immune	37
1.1 Les caractéristiques des LT quiescents	37
1.1.1 Un ou des états quiescents pour les LT ?	37
1.1.2 Les signaux de survie	40
1.1.3 Le métabolisme	42
1.2 La transition de la quiescence à la prolifération	44
1.2.1 Une question de cinétique	44
1.2.2 Une question de seuil d'activation	47
1.3 La prolifération lymphocytaire T	50
1.3.1 Phase d'activation et d'expansion	50
1.3.2 Phase de contraction	53
1.3.3 Différenciation en LT mémoires	54
2 Les molécules de signalisation importantes dans le cadre de notre étude	57
2.1 Les facteurs de transcription FoxO	57
2.1.1 La régulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs FoxO	58
2.1.2 La régulation des propriétés cellulaires par les facteurs FoxO	61
2.2 Les protéines 14-3-3	67
2.2.1 Fonctionnement général	67
2.2.2 Fonctions cellulaires régulées	69

2.3	L'histone déacétylase HDAC6	71
2.3.1	Fonctionnement général	71
2.3.2	Fonctions cellulaires régulées	72
2.4	La Rho-GTPase RhoA	75
2.4.1	Fonctionnement général	75
2.4.2	Fonctions cellulaires régulées	76
3	Présentation du projet	79
II	Résultats	83
4	Fam65b inhibe la prolifération cellulaire <i>in vitro</i>	85
4.1	Fam65b inhibe la prolifération des cellules leucémiques T humaines	85
4.2	Fam65b altère la formation du fuseau mitotique	86
4.3	Le complexe Fam65b-HDAC6-14-3-3 induit l'arrêt de la prolifération	89
4.3.1	L'inhibition de la prolifération est indépendante de RhoA . .	90
4.3.2	L'inhibition de la prolifération nécessite la phosphorylation de Fam65b	91
4.3.3	L'inhibition de la prolifération est médiée par l'interaction de Fam65b et 14-3-3	93
4.3.4	L'inhibition de HDAC6 induit un arrêt de la prolifération . .	94
4.3.5	L'effet anti-prolifération de Fam65b passe par l'inhibition de HDAC6	95
4.3.6	La phosphorylation de Fam65b est nécessaire pour la formation du complexe Fam65b/14-3-3/HDAC6	96
4.4	L'état de phosphorylation de Fam65b modifie sa localisation subcellulaire	97
4.5	Fam65b contrôle la prolifération des cellules T	98
5	Etude du rôle de Fam65b dans un modèle de souris Fam65b^{ko}	105
5.1	Etablissement d'un modèle murin d'invalidation de Fam65b	105
5.2	L'activité des partenaires de Fam65b est modifiée dans les LT des souris Fam65b ^{ko}	106
5.2.1	L'activité de RhoA est augmentée dans les LT Fam65b ^{ko} . .	106
5.2.2	L'activité de HDAC6 est augmentée dans les LT Fam65b ^{ko} .	107
5.3	Vérification du rôle de Fam65b sur la prolifération de LT murins <i>in</i> <i>vitro</i>	108
5.4	Phénotype des souris Fam65b ^{ko} à l'état de base	109
5.4.1	Evaluation de la cellularité	109
5.4.2	L'expression des marqueurs CD62L et CD44 est modifiée . .	113
5.4.3	La production d'Ig n'est pas modifiée dans le modèle Fam65b ^{ko}	115

III	Discussion	117
	Fam65b, un facteur de quiescence	119
	L'induction de l'expression de Fam65b dans des cellules transformées, un exemple de signal contradictoire	120
	Fam65b est impliqué dans la régulation de structures mécano-transductrices	121
	Aspects moléculaires	122
	Un phénotype moléculaire fort sans conséquence majeure <i>in vivo</i> ? .	123
	Régulation de l'expression des marqueurs CD62L et CD44	124
	Fam65b joue sur la prolifération et la migration	125
	Conclusion générale	126
IV	Matériels et Méthodes	127
	Culture cellulaire	129
	Constructions et inhibiteurs pharmacologiques	129
	Souris Fam65B ^{ko}	130
	Isolement des LT à partir des organes lymphoïdes de souris	130
	Transfection des cellules	131
	Extraction ARN et qRT-PCR	131
	Cytométrie en flux	132
	Microscopie	133
	Biochimie	134
	Tri des PBT et Western Blot	135
	Statistiques	135
	Bibliographie	137
	Annexes	167
A	Article 1 : Fam65b controls the proliferation of transformed and primary T cells	169
B	Article 2 : Evidence that HIV-1 restriction factor SAMHD1 facilitates differentiation of myeloid THP-1 cells	185

Table des figures

Figure 1	Représentation schématique de la quiescence dans le contexte du cycle cellulaire	24
Figure 2	Réversibilité de l'état G_0 du cycle cellulaire	25
Figure 3	Acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de la progression en phase G_1	27
Figure 4	Modèle pour l'engagement du cycle cellulaire et la transition G_0 - G_1	28
Figure 5	Implication des ROS dans la quiescence des cellules souches et leur auto-renouvellement	30
Figure 6	Régulation de la balance énergétique au sein d'une cellule . .	31
Figure 7	Le cycle de quiescence	32
Figure 1.1	La survie, la prolifération homéostatique et l'activation des sous populations de LT dépendent de différents signaux	40
Figure 1.2	Modifications transitoires du métabolisme des LT au cours d'une réponse immune	43
Figure 1.3	Rôle central de pRb dans la progression du cycle cellulaire .	46
Figure 1.4	Représentation schématique de la régulation du signal TCR par Lck	48
Figure 2.1	Principales modifications post-traductionnelles régulant l'activité des facteurs de transcription FoxO	60
Figure 2.2	Mécanismes de régulation de la transcription par les facteurs FoxO	61
Figure 2.3	Modes d'interaction des protéines 14-3-3 et de leurs cibles . .	68
Figure 2.4	Régulation de la progression dans le cycle cellulaire par les protéines 14-3-3	69
Figure 2.5	Synchronisation de l'assemblage et du désassemblage du cil primaire avec le cycle cellulaire	73
Figure 2.6	Rôle des Rho-GTPases et de leurs régulateurs dans le développement et la fonction des LT	77
Figure 3.1	Représentation schématique des différentes isoformes de la protéine Fam65b	80
Figure 4.1	L'expression de Fam65b inhibe la prolifération en perturbant la mitose	86

Figure 4.2 Le blocage du cycle cellulaire induit par Fam65b n'est pas restreint aux lymphocytes	87
Figure 4.3 L'expression de Fam65b dans des cellules en division perturbe les étapes de la mitose	88
Figure 4.4 L'expression de Fam65b déstabilise la formation du fuseau mitotique	89
Figure 4.5 L'effet anti-prolifératif de Fam65b n'est pas dû à son inhibition de l'activité de RhoA	90
Figure 4.6 Résultats du crible double hybride montrant une interaction entre Fam65b et 14-3-3	91
Figure 4.7 Liste des protéines interagissant avec Fam65b	92
Figure 4.8 Fam65b est phosphorylée dans les cellules Jurkat transfectées	93
Figure 4.9 L'effet anti-prolifératif de Fam65b est induit par son interaction avec 14-3-3	94
Figure 4.10 L'inhibition de HDAC6 bloque la progression du cycle cellulaire en phase G ₂ /M	95
Figure 4.11 L'inhibition de l'activité déacétylase de HDAC6 par Fam65b est nécessaire à son effet anti-prolifératif	96
Figure 4.12 La propriété anti-proliférative de Fam65b résulte de sa capacité à interférer avec HDAC6 et 14-3-3	97
Figure 4.13 L'état de phosphorylation de Fam65b influence sa localisation subcellulaire	98
Figure 4.14 L'expression de Fam65b diminue au cours de l'activation . .	99
Figure 4.15 L'expression de Fam65b est inversement corrélée avec la prolifération des lymphocytes T activés	100
Figure 4.16 L'inhibition de la prolifération par Fam65b ne joue pas sur la signalisation précoce	101
Figure 4.17 L'inhibition de Fam65b favorise la prolifération des LT . . .	102
Figure 4.18 L'expression de Fam65b régule le seuil d'activation des LT .	103
Figure 4.19 Fam65b participe aux capacités fonctionnelles des LT mémoires	103
Figure 5.1 Modèle de souris Fam65b ^{ko} dans le lignage T	106
Figure 5.2 Les LT Fam65b ^{ko} ont une plus forte activité de RhoA	107
Figure 5.3 Les LT Fam65b ^{ko} issus des ganglions n'expriment plus de tubuline acétylée	108
Figure 5.4 Les LT Fam65b ^{ko} ont un seuil d'activation diminué	109
Figure 5.5 Evaluation de la cellularité des différents organes lymphoïdes	110
Figure 5.6 Evaluation du nombre de LT dans les différents organes lymphoïdes	110
Figure 5.7 Evaluation de la proportion des différentes sous-populations de LT dans les différents organes lymphoïdes	111
Figure 5.8 Evaluation de l'auto-activation des LT dans les différents organes lymphoïdes	112
Figure 5.9 Evaluation de la composition cellulaire du sang des souris . .	113
Figure 5.10 Profil d'expression de CD44 et CD62L sur les LT	114

Figure 5.11 Les niveaux de transcription de CD44 et CD62L sont identiques	115
Figure 5.12 La quantité d'immunoglobulines sécrétées dans le sérum n'est pas différente	116
Figure 5.13 Mécanisme de régulation du cil primaire par Fam65b	121
Figure 5.14 Mécanismes moléculaires d'inhibition de la migration et de la prolifération par Fam65b	123

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Marqueurs des sous-populations de LT mémoires	39
Tableau 1.2	Signaux cytokiniques induisant la différenciation spécifique des LT CD4 ⁺ naïfs	52

Liste des abréviations

AMPK	AMP-activated kinase
Ac	anticorps
Ag	antigène
Bcl	B-cell lymphoma
CSK	C-ter Src Kinase
DC	cellules dendritiques
APC	cellules présentatrices d'antigène
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CDK	cyclin dependant kinase
CDKi	cyclin dependant kinase inhibitor
CTLA-4	cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
Dok	downstream of tyrosine kinase
ROS	espèces réactives de l'oxygène
FoxO	Forkhead box O
GABP	GA-binding protein
Rb	gène du rétinoblastome
GAP	GTPase activating protein
GIMAP	GTPase of the immunity-associated protein family
GEF	guanine exchange factor
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	guanosine diphosphate
GTP	guanosine triphosphate
HSP	heat shock protein
HDAC	histone déacétylase
IKK	I κ B kinase
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN	interféron
ILX	interleukine X
KD	knock down
KO	knock out
KLF	krüppel like factor
LKB1	liver kinase B1
LFA-1	lymphocyte function associated antigen 1
LT	lymphocyte T
LT _H 17	lymphocyte T helper 17
LTreg	lymphocyte T régulateur
LTem	lymphocytes T effecteurs mémoires
LTcm	lymphocytes T mémoires centraux
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus
mTOR	mammalian target of rapamycin
MPECs	memory precursor effector cells
PTEN	phosphatase and tensin homologue

PI3K	phosphatidilinositol-3 kinase
Point R	point de restriction
PD-1	Programmed Death-1
pRb	protéine du rétinoblastome
ROR γ t	RAR-related orphan receptor γ t
TCR	récepteur à l'antigène
ILXR	récepteur à l'interleukine X
SKP2	S-phase kinase associated protein 2
SGK	serum/glucocorticoid regulated kinase
SHP1	SH2 domain containing protein-tyrosine phosphatase
SLECs	Short-lived effector cells
SIRT	Sirtuin
TGF β	transforming growth factor β
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRAF6	tumor necrosis factor receptor activating factor 6
WT	wild type

Première partie

Introduction

Avant-propos

La notion de quiescence

La quiescence un état hautement régulé

Pendant longtemps le concept de quiescence cellulaire a été défini comme un état inactif de non prolifération ; les cellules étant en phase G_0 du cycle cellulaire par défaut, à cause de conditions défavorables à la poursuite du cycle. Cette phase correspondait donc à un état irréversible en dehors du cycle cellulaire, phénomène illustré par la description des cellules complètement différenciées comme les neurones ou plus récemment par les cellules sénescences. La description d'une autre forme de phase G_0 , appelée état quiescent et caractérisée par la capacité des cellules à reprendre le cours de leur cycle cellulaire en réponse à des stimuli physiologiques, a permis de faire évoluer la définition de ce concept (Cheung and Rando, 2013).

Définition et caractéristiques des cellules quiescentes

Les premières études sur le cycle cellulaire ont permis de postuler l'existence d'un état quiescent. En effet, des expériences de marquage radioactif de l'ADN, réalisées en 1951 par Howard et Pelc, ont mis en évidence qu'au sein d'une population cellulaire toutes les cellules ne prolifèrent pas au même rythme révélant la présence de cellules non prolifératives dont la prolifération peut être induite par des stimuli extrinsèques. Durant plusieurs années la caractérisation de cet état fut débattue tantôt décrit comme une phase G_1 prolongée tantôt comme une phase indépendante.

C'est en 1974, avec la description d'un point de restriction en phase G_1 par Pardee, que l'état quiescent est considéré comme une phase indépendante (Pardee, 1974). En effet, ce point de restriction ou point R correspond à une étape cruciale dans la poursuite du déroulement du cycle cellulaire. Plus précisément, avant ce point R, la décision d'entrer en quiescence ou de poursuivre le cycle est dépendante d'une balance de signaux extracellulaires promoteurs et inhibiteurs reçus par la cellule. Une fois ce point de restriction passé, ces signaux extrinsèques ne sont plus nécessaires à la cellule

qui poursuit alors irrémédiablement son cycle et entame donc une synthèse accrue de protéines en vue de produire deux cellules filles identiques. Les travaux de Zetterberg et Larsson en 1985 ont ensuite démontré que, dans toutes les phases du cycle, une déprivation de sérum induit une inhibition de la production de protéines conduisant la plupart des cellules à stopper leur cycle et induire l'apoptose. Seules les cellules en phase G_1 précoce, qui n'ont donc pas passé le point R, sont capables de sortir du cycle cellulaire et d'atteindre un état quiescent. Ainsi, la variabilité observée dans la vitesse de division des cellules serait due au temps nécessaire à chaque cellule pour passer ce point de restriction en G_1 (Zetterberg and Larsson, 1985) (Figure 1).

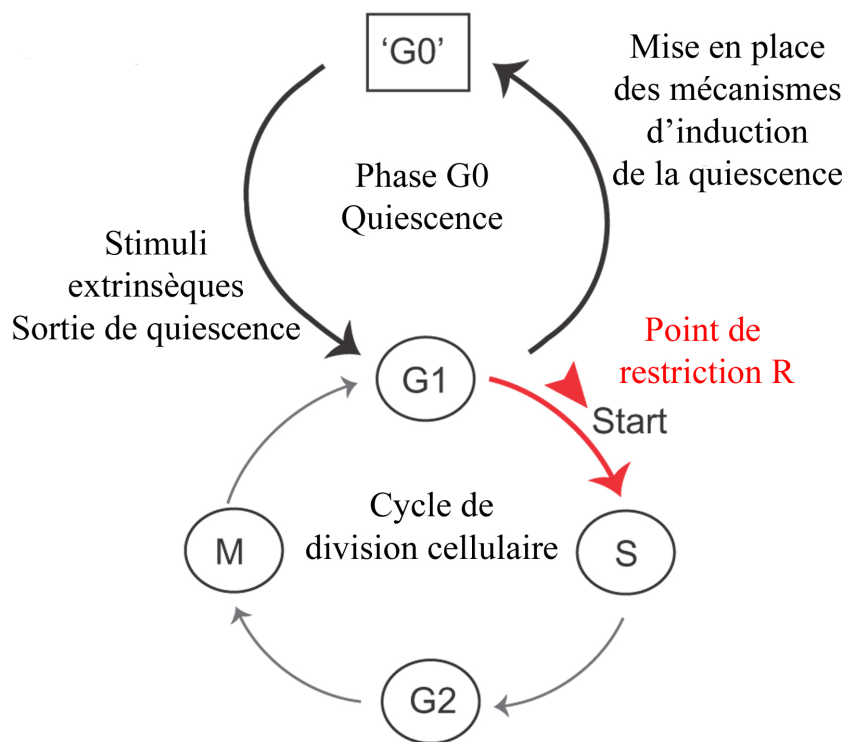


FIGURE 1 – **Représentation schématique de la quiescence dans le contexte du cycle cellulaire** (D'après (Dhawan and Laxman, 2015))

L'induction du programme de quiescence requiert différents signaux extrinsèques. La prise de décision d'entrer en quiescence se produit au début de la phase G_1 au niveau du point R (flèche rouge).

Différents types de phase G_0 peuvent alors être définis. En effet, comme le montre la figure 2, les cellules somatiques peuvent être capables d'entrer dans une phase G_0 réversible, elles sont alors quiescentes comme les cellules souches, ou dans une phase G_0 irréversible, c'est le cas des cellules sénescents et des cellules différenciées.

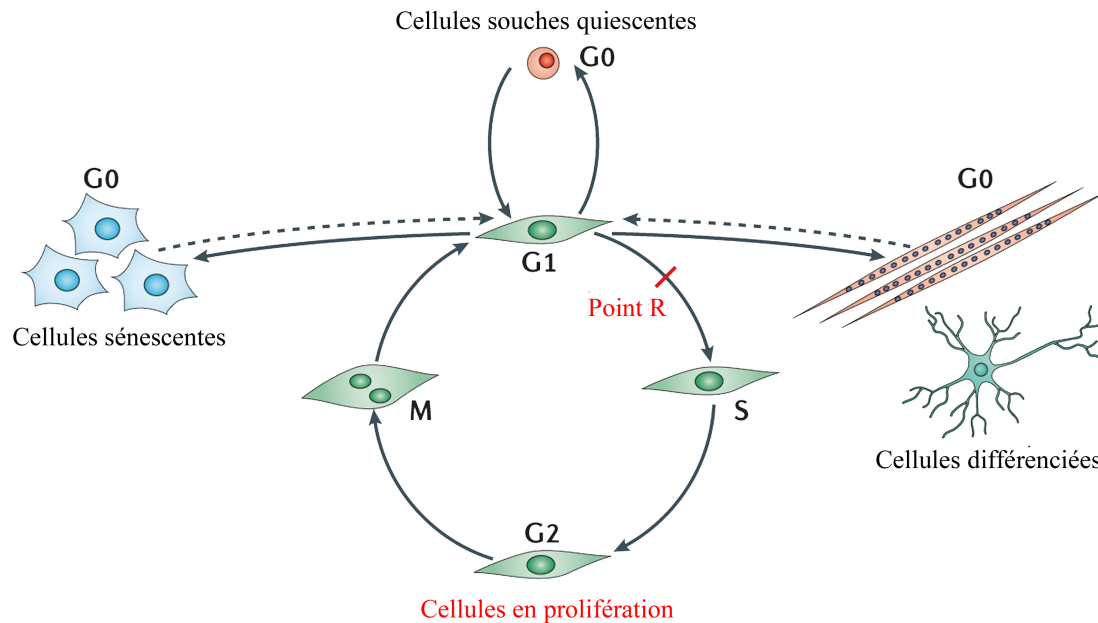


FIGURE 2 – Réversibilité de l'état G_0 du cycle cellulaire (D'après (Cheung and Rando, 2013))

Les cellules somatiques sont capables, avant de passer le point R, de rejoindre différents types de phase G_0 , réversible pour les cellules quiescentes et irréversible pour les cellules différenciées ou sénescences (flèches pleines).

Les cellules quiescentes comme les cellules souches par exemple permettent de régénérer le tissu endommagé en réponse à des stimuli provenant de leur niche environnementale. Les cellules matures différenciées supportent la fonction de l'organe ou du tissu et ne se divisent généralement plus. Les cellules sénescences quant à elles correspondent à des cellules ayant perdu leur capacité de division (Campisi, 2011). Leur description a mis en évidence des effets paradoxaux. Leur accumulation dans les tissus, notamment observée lors du vieillissement, est délétère du fait des facteurs qu'elles sécrètent. Mais l'arrêt de croissance induit par la sénescence pourrait être un mécanisme intéressant pour supprimer le développement de tumeurs (Coppé et al., 2008; Baker et al., 2011). Ce paradoxe peut s'expliquer en considérant que, dans un organisme jeune, la sénescence puisse être un mécanisme de défense en réponse à un stress oncogénique. Mais en contrepartie, avec le vieillissement, leur accumulation révélerait un effet néfaste en créant une inflammation chronique (Baker et al., 2011).

De récentes études *in vitro* ont montré que, bien qu'étant dans une phase G_0 irréversible, les cellules différenciées et les cellules sénescences ont la capacité de reprendre leur cycle cellulaire lorsque l'expression de suppresseurs de tumeur comme p53 et pRb (protéine du rétinoblastome) est inhibée (Beauséjour et al., 2003; Pajcini et al., 2010). Les mécanismes intrinsèques nécessaires pour cycliser sont donc intacts mais réprimés dans ces cellules (Figure 2 Flèches en pointillés).

In vivo, l'un des exemples illustrant cette caractéristique est celui des hépatocytes matures. Dans des cas d'hépatectomie partielle, ils sont capables d'entrer en cycle cellulaire afin de reconstituer le foie (Fausto, 2004).

Afin de décrire les caractéristiques des cellules quiescentes, nous nous baserons sur l'exemple des cellules souches.

La quiescence des cellules est contrôlée notamment par des mécanismes épigénétiques, transcriptionnels et post-transcriptionnels ainsi que des modifications post-traductionnelles que nous allons maintenant évoquer.

Les modifications épigénétiques, et notamment la méthylation des histones, possèdent un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes (Bernstein et al., 2007; Li et al., 2010). Plus particulièrement, la triméthylation de l'histone H3 sur les lysines 4 et 27 (H3K4me3 et H3K27me3) semble particulièrement déterminante pour conditionner l'état d'ouverture de la chromatine. Si la Lys4 est méthylée la transcription sera favorisée alors que si la Lys27 est méthylée la transcription sera inhibée. Étonnamment, des marques H3K4me3 correspondant à une chromatine ouverte, donc à un état favorable pour la transcription, sont retrouvées au niveau de nombreux gènes dans les cellules quiescentes. Pourtant un faible niveau de transcription est observé dans les cellules quiescentes. Il semble donc peu probable que tous les gènes possédant cette marque soient activement transcrits (Guenther et al., 2007). Cette caractéristique pourrait permettre aux cellules d'identifier les gènes devant être transcrits si un signal d'activation était reçu. Bien que ne se divisant pas, les cellules quiescentes sont donc prêtes à réagir dès réception d'un signal mitotique.

Les cellules quiescentes régulent l'expression de nombreux gènes. Ceux impliqués dans la réplication et la progression du cycle cellulaire codant, par exemple, des cyclines ou encore la survivine sont inhibés (Fukada et al., 2007; Blanpain et al., 2004; Forsberg et al., 2010). Ces molécules contrôlent de nombreux aspects de la progression du cycle cellulaire. Les cyclines sont connues comme d'importants régulateurs de « checkpoints » intervenant lors de la transition entre des phases successives du cycle cellulaire (Pagano et al., 1992; Lauper et al., 1998; Pines and Hunter, 1989). La survivine, quant à elle, est impliquée dans la régulation de la dynamique des microtubules pendant la phase de mitose (Li et al., 1998). On retrouve également une diminution de l'expression de gènes liés au fonctionnement des mitochondries indiquant une activité métabolique réduite dans ces cellules. Inversement d'autres gènes sont, quant à eux, plus exprimés comme ceux impliqués dans la transcription des inhibiteurs de cycle tels que les facteurs FoxO.

Le phénomène de quiescence peut également être régulé par le jeu de modifications post-transcriptionnelles faisant intervenir, par exemple, des ARN

non codants comme les micro-ARN (Cheung et al., 2012; Arnold et al., 2011).

La quiescence peut également être régulée par des modifications post-traductionnelles. La progression dans le cycle cellulaire est dépendante de l'activité de complexes formés par des cyclines et des kinases (CDK). L'expression des CDK est relativement constante au cours du cycle cellulaire. Ceci suppose donc une régulation de leur activité kinase par différents mécanismes. L'un d'eux fait intervenir une modification conformationnelle grâce à leur liaison aux cyclines dont l'expression est périodique au cours du cycle cellulaire. L'activité des complexes cycline/CDK peut également être contrebalancée par celle des CDK inhibiteurs (CDKi) (Figure 3). Il existe deux grandes classes de CDKi : la famille INK4 et la famille KIP/CIP dont les membres les plus connus sont p21^{cip} et p27^{kip1}. L'activité anti-proliférative des inhibiteurs INK4 est due en partie à leur liaison avec les complexes CDK4 et CDK6 ce qui empêche la séquestration de p21^{cip} et p27^{kip1} par ces mêmes complexes (Steinman, 2002).

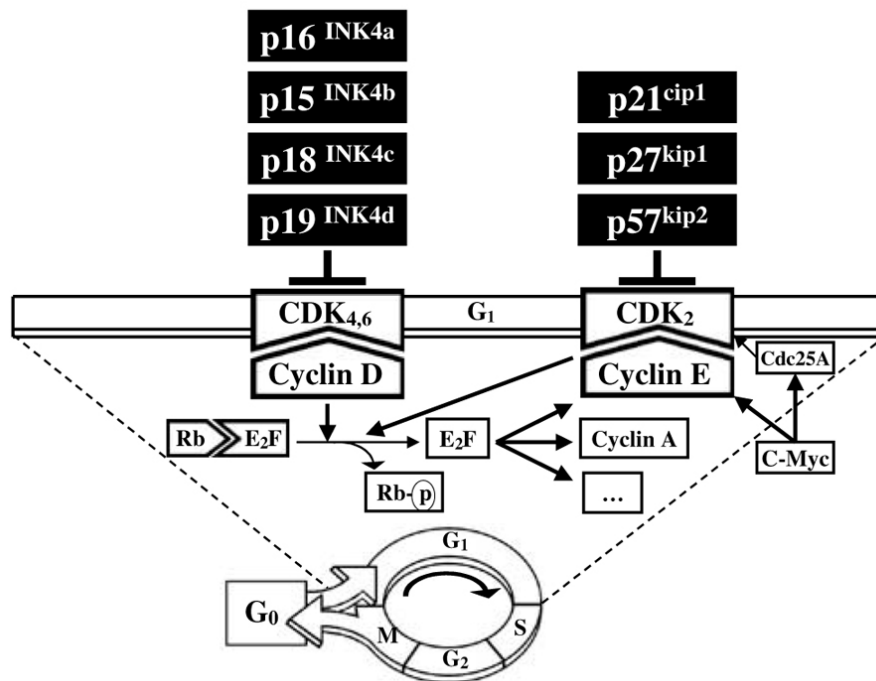


FIGURE 3 – Acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de la progression en phase G₁ (D'après (Cheng, 2004))

La progression dans le cycle cellulaire est régulée par l'activation et l'inactivation séquentielles de CDK. Les CDKi sont indiqués dans les boîtes noires.

p21^{cip} possède un rôle déterminant dans le maintien de la quiescence. En effet, l'inhibition de p21^{cip} induit une augmentation de la prolifération des cellules et une diminution de la population de cellules souches quiescentes (Cheng et al., 2000b; Kippin et al., 2005). Il semble que p21^{cip} en perturbant la liaison de

l'entrée en cycle en liant une chaperonne moléculaire impliquée dans le transport du complexe Cycline D1 (Zou et al., 2011).

Les mécanismes de survie

Comme toutes les cellules ayant une durée de vie prolongée, les cellules quiescentes peuvent accumuler des dommages à cause du stress environnemental comme le stress oxydatif. Ceci induit généralement une dégradation des constituants cellulaires et notamment de l'ADN (Rando, 2006; Kregel and Zhang, 2007; Rossi et al., 2008). Les cellules doivent donc adopter différents mécanismes afin d'assurer leur intégrité sur le long terme.

La signalisation protégeant contre le stress de l'environnement

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules hautement actives comprenant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-), et le radical hydroxyle ($OH^\bullet$). Sous-produits du métabolisme normal de l'oxygène, ils sont principalement formés par les mitochondries lors du processus de production d'énergie cellulaire et peuvent également être générés pour faciliter la signalisation intracellulaire. Dans des conditions physiologiques normales, les niveaux de ROS sont faibles et jouent un rôle crucial pour la prolifération, la survie et la migration. Leur accumulation, suite à un dysfonctionnement du métabolisme ou à une exposition des cellules à une source extérieure de ROS, conduit à un stress oxydant délétère. Dans ce cas, il s'ensuit une peroxydation des macromolécules cellulaires telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Reczek and Chandel, 2015; Storz, 2011). Les cellules possèdent des mécanismes permettant de prévenir l'accumulation de ces ROS (Figure 5). Par exemple, l'anion superoxyde, produit de la dysfonction mitochondriale, est converti en H_2O_2 par les superoxydes dismutases (SOD). H_2O_2 est ensuite décomposé en oxygène et en eau par la catalase ou peroxydase de glutathion (GPXS) (Balaban et al., 2005; Sena and Chandel, 2012).

De nombreuses molécules de signalisation sont également impliquées dans la régulation des ROS. ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) joue par exemple un rôle critique dans cette régulation. Cette sérine/thréonine kinase régule les ROS en modulant la voie AMPK-mTor et la production de NADPH (Alexander et al., 2010; Cosentino et al., 2011) et participe ainsi au maintien de la stabilité du génome, fonction essentielle assurant l'intégrité des cellules quiescentes sur le long terme (Figure 5). Les facteurs de transcription de la famille FoxO sont également impliqués dans la régulation redox. Leur rôle sera détaillé par la suite.

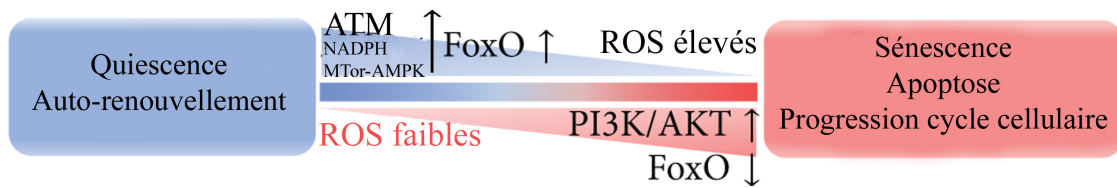


FIGURE 5 – **Implication des ROS dans la quiescence des cellules souches et leur auto-renouvellement** (D'après (Ryoo et al., 2016))

Avec de faibles niveaux de ROS, maintenus par ATM et les facteurs FoxO, les cellules souches restent quiescentes et leur activité d'auto-renouvellement est augmentée. De forts niveaux de ROS induisent la prolifération, la sénescence et l'apoptose des cellules. La voie phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K)-Akt est connue pour augmenter les ROS en régulant négativement les facteurs FoxO.

Les senseurs métaboliques

La survie de cellules quiescentes dépend de mécanismes intrinsèques pour maintenir une fonction métabolique pendant un stress persistant. Des mécanismes de protection efficaces doivent donc être mis en place par les cellules quiescentes, en voici quelques exemples.

De récentes études ont montré que des cellules souches quiescentes résident dans des niches très peu oxygénées (Mounier et al., 2011; Simsek et al., 2010; Parmar et al., 2007). En effet, il semble qu'un environnement hypoxique favorise l'induction de la quiescence (Shima et al., 2010; Hermitte et al., 2006). Cette capacité de survie est sous-tendue par l'expression de facteurs de transcription tels que HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α) (Greer et al., 2012).

Un lien étroit entre métabolisme et maintien de la quiescence semble exister. Pour survivre les cellules doivent maintenir une balance énergétique stable. Ceci suppose l'existence d'une molécule agissant comme une jauge (Figure 6). L'un des régulateurs majoritaires de cette balance est l'AMPK (5'-AMP-activated protein kinase). Il est intéressant de noter que cette kinase est régulée par LKB1 (Liver Kinase B1) qui est également un régulateur de mTORC1 et de la voie FoxO. Cette molécule fait donc un lien entre les mécanismes de détection de l'environnement et le métabolisme en contrôlant l'homéostasie énergétique (Blagih et al., 2012; Gurusurthy et al., 2010; Gan et al., 2010; Nakada et al., 2010). En plus de l'ATP, la concentration cellulaire de GTP est également modifiée en fonction du statut cellulaire. Une étude récente montre que la PI5P4K β , une phosphoinositide kinase, détecte la concentration en GTP et la convertit en un signal cellulaire *via* un second messenger lipidique, le PI(5)P (Sumita et al., 2016).

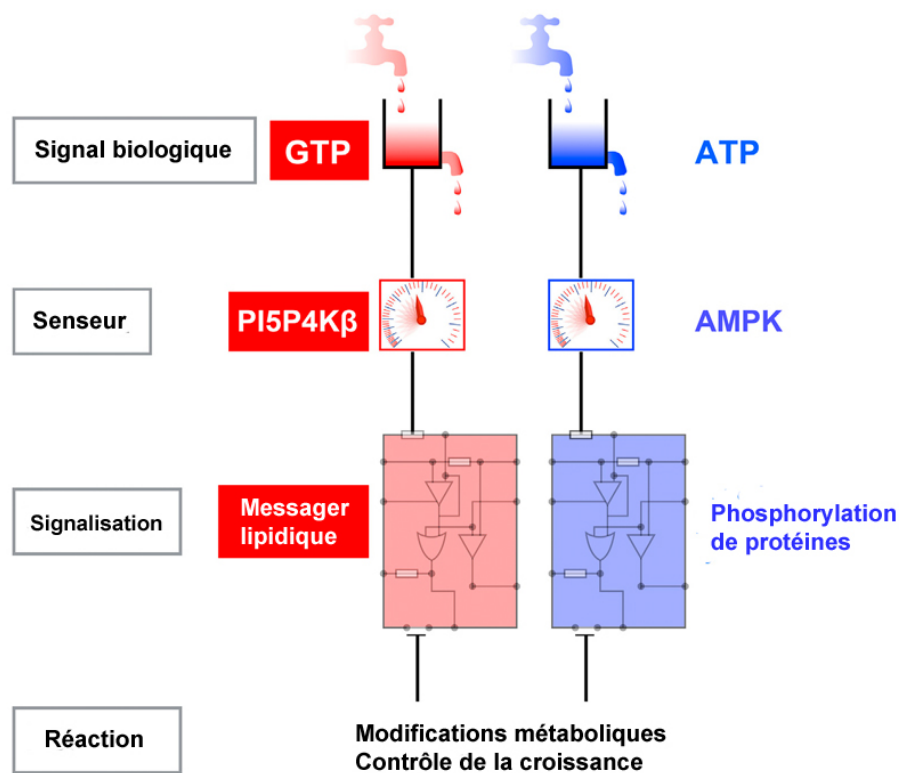


FIGURE 6 – Régulation de la balance énergétique au sein d’une cellule (D’après (Sumita et al., 2016))

Le changement dans la concentration de molécules énergétiques est détecté par des senseurs moléculaires spécifiques et converti en un signal cellulaire induisant des adaptations métaboliques.

L’induction de l’autophagie semble également être un mécanisme important dans l’homéostasie et la survie des cellules soumises à des conditions de stress. L’autophagie correspond à une voie de dégradation lysosomale impliquant le recyclage d’organelles cytoplasmiques et d’autres composants endommagés afin de préserver l’intégrité de la cellule (Klionsky and Emr, 2000). L’un des gènes essentiels de l’autophagie dans le système hématopoïétique est *Atg7*. En effet, l’ablation de ce gène induit une diminution du nombre de cellules souches et une accumulation de mitochondries altérées et de ROS (Mortensen et al., 2011).

La préservation de l’intégrité du génome

Par ailleurs, les cellules quiescentes peuvent être soumises à des dommages de l’ADN dus au turnover homéostatique normal. Leur survie dépend donc de mécanismes de réparation (Lombard et al., 2005). Deux mécanismes majeurs peuvent entrer en jeu, la recombinaison homologue et la jonction d’extrémités non homologues (ou NHEJ pour Non-Homologous End-Joining) (Sancar et al., 2004).

La recombinaison homologue est un mécanisme de réparation des cassures double brin hautement fidèle. En effet, une longue séquence homologue est utilisée pour guider la réparation de la cassure en phase S et G₂, phases où des chromatides soeurs sont disponibles comme modèle (Shrivastav et al., 2008).

La réparation par NHEJ est par contre un mécanisme non conservatif. En effet, ce mécanisme n'a pas besoin de séquence modèle puisqu'il ne restaure pas la séquence de l'ADN mais seulement sa continuité. Ce mécanisme est généralement utilisé en phase G₁ (Shrivastav et al., 2008). Ceci implique donc que des cellules quiescentes accumulent des mutations en utilisant préférentiellement ce mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN (Mohrin et al., 2010). En 1975, John Cairns propose un modèle permettant aux cellules de protéger leur ADN (Cairns, 1975). Appelée hypothèse de l'ADN immortel, ce mécanisme stipule que, durant la mitose, les brins d'ADN ne soient pas répartis au hasard au sein des cellules filles. En effet, l'une des cellules filles recevrait les brins matrices et resterait cellule souche alors que l'autre, qui se différencierait, hériterait des brins néosynthétisés. Ainsi, la cellule souche se protège des mutations résultant d'erreur lors de la réplication de l'ADN. Néanmoins, les mécanismes par lesquels la cellule engage une ségrégation asymétrique de ses chromosomes restent à définir (Rando, 2007). De plus un tel type de ségrégation des chromosomes ne semble pas avoir lieu dans tous les types cellulaires (Kiel et al., 2007).

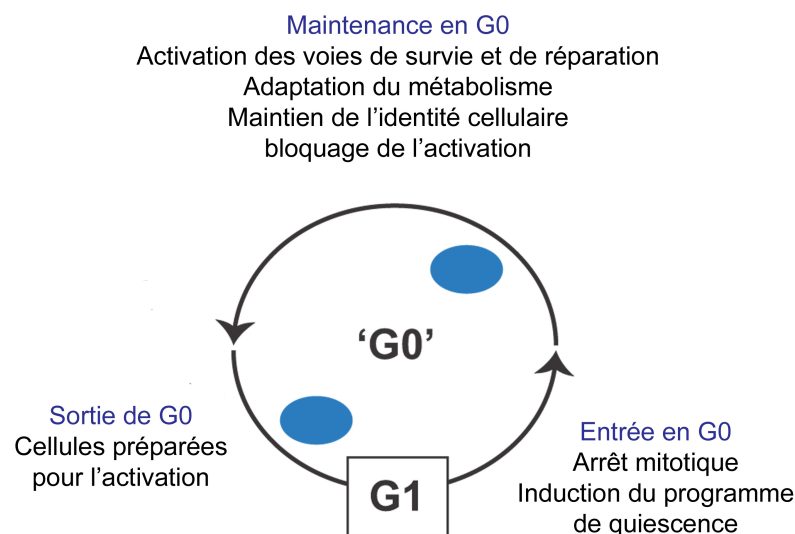


FIGURE 7 – Le cycle de quiescence (D'après (Dhawan and Laxman, 2015))

La quiescence implique l'induction de différents programmes en dehors de l'arrêt mitotique. Pour maintenir cet état, les cellules induisent des mécanismes de survie, adaptent leur métabolisme, maintiennent leur identité et empêchent leur activation. Suite à des stimuli appropriés, les cellules peuvent sortir de quiescence et reprendre leur cycle.

L'état quiescent n'est donc pas juste un état passif mais hautement régulé par

différents mécanismes intrinsèques. Les cellules se trouvent dans un état d'équilibre, préparées pour l'activation par des mécanismes spécifiques ne nécessitant que peu d'énergie mais permettant des réponses rapides à tout signal activateur (Figure 7).

La dérégulation du cycle cellulaire, exemple des cellules transformées

La régulation de la capacité proliférative des cellules est donc un phénomène hautement contrôlé impliquant la levée de l'inhibition du programme de quiescence en réponse à des signaux extracellulaires particuliers. Il existe cependant des cellules qui ont perdu la capacité de réguler leur progression dans le cycle cellulaire : les cellules transformées.

La transformation peut avoir lieu suite à différents événements parmi lesquels on peut citer l'apparition de mutations dans les gènes suppresseurs de tumeur ou anti-oncogènes, c'est-à-dire des gènes dont la fonction normale est d'inhiber la division cellulaire. La mutation des deux allèles de ces gènes est généralement nécessaire pour induire la formation d'une tumeur. Cependant, dans certain cas, la mutation d'un seul allèle produit un « dominant négatif », c'est-à-dire que la protéine mutée empêche la fonction normale de la protéine produite par l'allèle non muté (Baker et al., 1990). Véritable garde-fous, ils empêchent la dérive des cellules vers la malignité. Les exemples les plus connus sont les gènes *p53* et *Rb*. Le suppresseur de tumeur *p53* est essentiel pour la restriction de l'entrée en cycle cellulaire et l'induction de la quiescence (Liu et al., 2009; Meletis et al., 2006). Ayant une demi-vie courte, sa présence est réduite dans les cellules normales mais des conditions de stress induisent la stabilisation de la protéine *p53*. Une fois stable, *p53* est activée par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation et d'acétylation et devient un puissant facteur de transcription activant l'expression d'un vaste panel de gènes tels que *p21* ou *gadd45*. Ce gardien du génome peut bloquer transitoirement le cycle cellulaire en cas de mutation donnant ainsi le temps aux mécanismes de réparation de se mettre en place. Lorsque cette réparation est impossible, il permet un blocage permanent du cycle et conduit à la mort des cellules (Levine, 1997). *p53* semble donc être au centre d'un carrefour décisionnel important.

Un autre régulateur important du cycle cellulaire, *pRb*, est le produit du gène suppresseur de tumeur du rétinoblastome. La perte de fonction de *pRb* prive la cellule d'un mécanisme important pour freiner la prolifération cellulaire par la modulation de l'expression génique (Weinberg, 1995). *pRb* fait partie d'une famille de protéines comprenant également *p107* (Ewen et al., 1991; Zhu et al., 1993) et *p130* (Hannon et al., 1993; Li et al., 1993; Mayol et al., 1993) qui partagent une similarité structurale et fonctionnelle. Tout comme *pRb*, *p107* et *p130* sont capables d'inhiber la croissance de certains types cellulaires. De

manière générale, ces protéines agissent en se liant à des facteurs de transcription ou des protéines impliquées dans la régulation de la transcription comme les membres de la famille de facteurs de transcription E2F nécessaires pour l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (White, 1997; Johnson and Schneider-Broussard, 1998; Mayol and Grana, 1998; Yee et al., 1998). pRb exerce la plupart, voire la totalité de ses effets dans une fenêtre de temps définie avant le point de restriction R. En effet, avant le point de restriction, pRb est trouvée sous forme hypophosphorylée et est donc active. Pour pouvoir passer le point de restriction, pRb doit être hyperphosphorylée par des complexes cycline/CDK et cette configuration sera maintenue pendant le reste du cycle cellulaire jusqu'à la fin de la phase M (Bartek et al., 1996; Mayol and Graña, 1997; Mayol and Grana, 1998).

La transformation cellulaire peut également impliquer un oncogène. Les oncogènes ont d'abord été identifiés comme étant des gènes de rétrovirus. Ces séquences d'ADN ont été appelées v-onc. Des études plus approfondies ont révélé que ces séquences v-onc correspondent à des gènes cellulaires que le virus a modifiés et incorporés dans son génome (Vogt, 2012). Ces gènes cellulaires ont alors été nommés c-onc ou encore proto-oncogène. Les propriétés de transformation des oncogènes sont dérivées de mutations de type « gain de fonction », modifiant une signalisation homéostatique hautement régulée en un état oncogénique incontrôlé (Ohgaki and Kleihues, 2009).

Ces mutations peuvent entre autre s'expliquer par le fait que le NHEJ est le mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN utilisé préférentiellement dans les cellules quiescentes.

Les fonctions essentielles pour la survie des cellules sont généralement médiées par des gènes différents, faisant apparaître un mécanisme de redondance. Dans le cas des cellules transformées, la mutation de l'un de ces gènes implique que la cellule sera très sensible à la régulation des autres gènes. Le concept de la létalité synthétique, proposant que l'inactivation simultanée de gènes ayant une fonction redondante est létale, tire partie de cette caractéristique pour améliorer les traitements anti-tumoraux. Cette approche a notamment été utilisée avec succès dans des cas de cancers du sein (Ashworth, 2008). L'un des problèmes dans ce cas est de pouvoir inhiber sélectivement des protéines qui peuvent également être importantes pour l'homéostasie des cellules saines environnant les cellules cancéreuses.

Un concept alternatif semble intéressant à étudier, celui basé sur des signaux contradictoires (O'Connor et al., 2000). Cette approche vise des systèmes biologiques dans lesquels une mortalité est observée lorsque deux voies antagonistes sont, cette fois, activées simultanément. Prises indépendamment, chacune de ces voies induit des programmes cellulaires opposés tout à fait bien

interprétés par la cellule mais leur activation simultanée induit des modifications incompatibles que la cellule résout en induisant son apoptose. Ces signaux peuvent aussi bien être induits par des mutations génétiques que par des signaux extracellulaires, tels que des facteurs de croissance ou des cytokines ou encore par l'utilisation d'agents pharmacologiques. Dans le cas des cellules transformées, en prolifération constante, la réinduction du programme de quiescence constituerait un exemple de ce concept. En effet, les cellules seraient alors soumises à deux signaux contradictoires simultanément, un signal de prolifération inhérent à leur statut de cellules transformées et un signal d'entrée en quiescence induit artificiellement, les conduisant à enclencher un programme de mort.

Chapitre 1

De la quiescence à la réponse immune

1.1 Les caractéristiques des LT quiescents

La régulation de l'homéostasie des lymphocytes est critique pour le développement et le fonctionnement du système immunitaire. Un certain nombre de cellules doit être maintenu pour conserver une quantité suffisante de lymphocytes afin de lutter contre les agents pathogènes étrangers, mais également empêcher leur accumulation excessive qui pourrait augmenter le risque de développer un syndrome auto-immun ou néoplasique.

1.1.1 Un ou des états quiescents pour les LT ?

Au sein du système immunitaire, le pool de cellules T naïves a longtemps été considéré comme un prototype de cellules quiescentes, se retrouvant dans un état non prolifératif par défaut attendant un signal d'activation. Mais du chapitre précédent, il ressort que la quiescence est un état de non prolifération réversible activement régulé par de nombreux mécanismes cellulaires.

Les LT naïfs sont considérés comme ayant une activité métabolique réduite et étant capables de rester en interphase sur une longue période de temps tout en conservant leur état naïf (Sprent and Tough, 1994; Tough and Sprent, 1994). Le maintien de ces cellules nécessite un contact avec un complexe CMH/peptide du soi et de l'IL7 (Sprent and Surh, 2011; Takada and Jameson, 2009a). En plus de permettre la survie des cellules, ces signaux homéostatiques pourraient également réguler la fonction des LT naïfs; le contact des LT naïfs avec des cellules dendritiques (DC) à l'état d'équilibre apparaissant essentiel pour maintenir la capacité de ceux-ci à répondre efficacement lors de la reconnaissance d'un antigène (Ag) étranger (Hochweller et al., 2010). Le concept selon lequel l'état quiescent des LT naïfs est un état régulé plutôt qu'un état de latence est débattu depuis de nombreuses années au cours desquelles un grand nombre de facteurs

ont été décrits pour maintenir la quiescence des LT. Parmi ceux-ci on retrouve, par exemple, les facteurs de transcription de la famille Fox (Forkhead box) FoxO et FoxP1, qui ont été décrits pour jouer un rôle dans le contrôle de la survie et de la quiescence des LT (Feng et al., 2011).

Afin de définir les caractéristiques des LT naïfs quiescents, de nombreuses études se sont penchées sur la sortie de quiescence des LT en réponse à des signaux extrinsèques homéostatiques, c'est-à-dire en absence de toute stimulation par le biais d'un Ag étranger. Cette capacité des LT naïfs à proliférer, dans certains contextes, en réponse à des facteurs homéostatiques (complexe CMH/peptide du soi et IL7) permet au système immunitaire de combler une niche vide et ainsi stopper toute autre prolifération homéostatique en limitant l'accès à ces signaux (Sprent and Surh, 2011; Takada and Jameson, 2009a). Ce mécanisme, à partir de LT naïfs, produit des LT appelés « cellules mémoires virtuelles », ayant un phénotype similaire à celui des cellules mémoires sans passer par un stade de différenciation en effecteur. Ces études ont mis en évidence qu'une certaine hétérogénéité existe au sein du pool de LT naïfs quiescents puisque tous n'ont pas la même capacité de réponse à ces signaux homéostatiques (Sprent and Surh, 2011; Jameson, 2002). En effet, certains LT naïfs resteront quiescents et ne subiront pas de prolifération homéostatique en dépit du contexte. Cette différence pourrait, par exemple, s'expliquer par une quantité différente des ligands CMH/peptide du soi à la périphérie, par l'expression de molécules particulières comme CD5 ou par la définition d'un potentiel de prolifération homéostatique au cours de la sélection des thymocytes (Hamilton and Jameson, 2012; Kieper et al., 2004; Smith et al., 2001).

L'hétérogénéité du pool de LT naïfs quiescents conduit à une capacité différente de ces cellules à proliférer et se différencier en réponse à des signaux homéostatiques. Certains LT naïfs, avec le plus grand potentiel prolifératif, occupent une « zone grise » entre les cellules naïves et mémoires : ces cellules sont constamment prêtes à « perdre » leur quiescence en fonction des changements de signaux homéostatiques (Hamilton and Jameson, 2012).

Le pool de LT mémoires ne requiert pas les mêmes signaux que les LT naïfs pour sa survie et sa maintenance. En effet, la survie des LT mémoires nécessite la présence d'IL7 tout comme les LT naïfs mais également de l'IL15 pour assurer leur auto-renouvellement. Ces cellules sont considérées comme étant maintenues dans un état plus actif, donc moins quiescent. Des analyses indiquent que les cellules mémoires ne sont pas dans une phase G_0 comme les cellules naïves mais dans une phase plus avancée proche de la phase G_1 . En effet, leur niveau d'ARN est plus élevé, ce qui permet une réponse fonctionnelle rapide (Latner et al., 2004; Veiga-Fernandes and Rocha, 2004; Allam et al., 2009). Cet état différent de celui des cellules naïves est un processus actif nécessitant un contact avec des cellules dendritiques impliquant CD27 et 4-1BB (CD137), membres de la

superfamille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) (Allam et al., 2009). *In vitro*, le blocage de ces interactions conduit à une réversion des cellules mémoires vers une phase G_0 , donc à une perte de leurs caractéristiques fonctionnelles. En effet, dans des souris déficientes pour CD27 infectées par LCMV, les cellules mémoires s'expandent deux fois moins et le virus est moins bien éliminé (Matter et al., 2005). L'engagement de CD27 implique l'activation de la voie PI3K et l'induction de mTor, expliquant en partie l'augmentation de l'activité métabolique des cellules mémoires (Kaeck et al., 2002).

Cependant, des études montrent que bien que les capacités effectrices des cellules mémoires soient rapidement mobilisables, le temps nécessaire pour induire leur prolifération n'est pas différent de celui des cellules naïves (Veiga-Fernandes et al., 2000; Stock et al., 2006; Whitmire et al., 2008).

De plus, il existe également une hétérogénéité dans le pool de cellules mémoires conférant une capacité différente de survie dans un état quiescent. Ce pool de LT peut être séparé en deux sous-populations possédant des caractéristiques (Tableau 1.1) et des localisations différentes : les LT mémoires centraux (LTcm) et les LT mémoires effecteurs (LTem). Les LTcm circulent au sein des organes lymphoïdes secondaires alors que les LTem sont plutôt résidents dans les tissus non lymphoïdes. Les deux populations sont détectées dans le sang et la rate, bien que les LTem soient retrouvés dans la pulpe rouge de la rate et les LTcm dans la pulpe blanche. Les LTem présentent une forte activité effectrice alors que les LTcm ont une capacité de prolifération supérieure (Sallusto et al., 2014; Masopust, 2001).

Type de cellules	Phénotype murin	Phénotype humain
LTcm	CCR7 ^{high} , CD44 ^{high} , CD127 ^{high} , CD62L ^{high} , KLRG1 ^{low}	CCR7 ^{high} , CD44 ^{high} , CD45RO ^{high} , CD45RA ^{low} , CD127 ^{high} , CD62L ^{high} , expression de niveaux élevés d'IL2 et intermédiaire d'IFN γ et de TNF
LTem	CCR7 ^{low} , CD44 ^{high} , CD127 ^{high} , CD62L ^{low} , KLRG1 ^{high}	CCR7 ^{low} , CD44 ^{high} , CD45RO ^{high} , CD45RA ^{low} , CD127 ^{high} , CD62L ^{low} , expression de niveaux élevés d'IFN γ et TNF et de faible niveau d'IL2

TABLE 1.1 – Marqueurs des sous-populations de LT mémoires (D'après (Rosenblum et al., 2016))

La quiescence des LT naïfs et mémoires n'est pas identique mais s'appuie sur des spécificités de réseaux moléculaires propres à chaque stade de différenciation. A la fois pour les LT naïfs et les LT mémoires, l'état quiescent n'est pas un état homogène mais il existe un degré de quiescence qui est activement maintenu dans les cellules afin de préserver les caractéristiques de chaque sous-population.

Dans la suite de ce manuscrit, les LT mémoires désigneront principalement les LTcm puisque ceux-ci partagent de fortes similitudes avec les LT naïfs.

1.1.2 Les signaux de survie

La survie des LT est dépendante de deux facteurs principaux : une réactivité faible mais significative à des complexes CMH/peptide du soi et une stimulation *via* des cytokines (Figure 1.1).

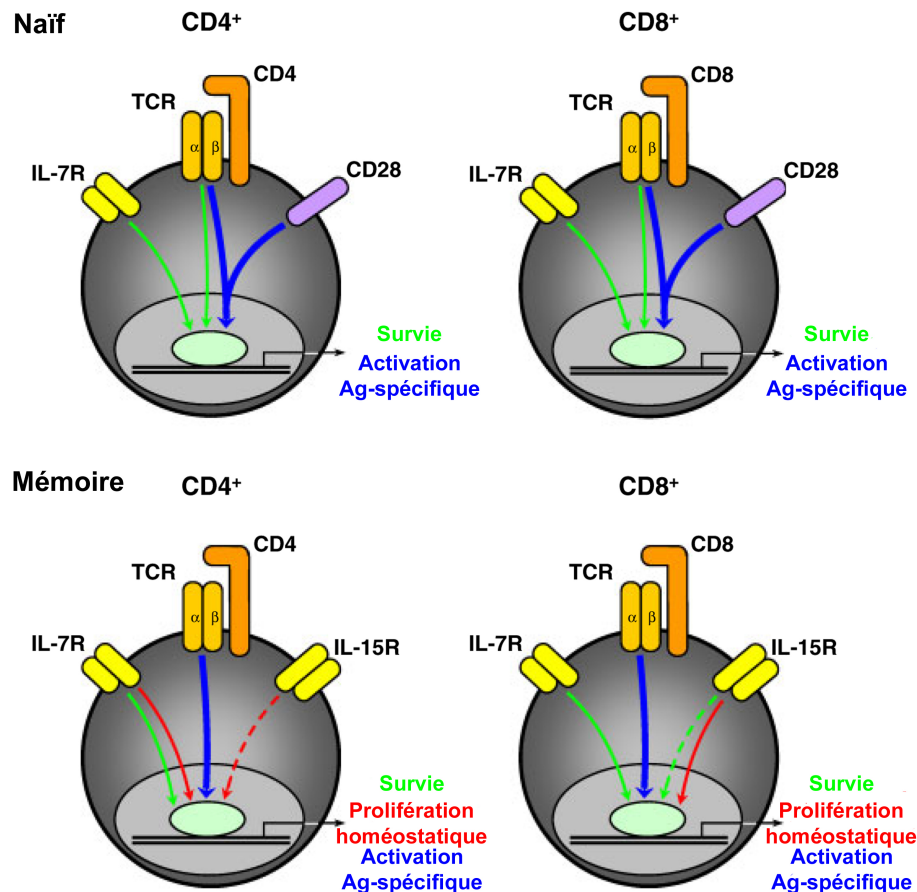


FIGURE 1.1 – La survie, la prolifération homéostatique et l'activation des sous populations de LT dépendent de différents signaux (D'après (Boyman et al., 2009))

Pour les LT CD4⁺ et CD8⁺ naïfs, l'activation Ag spécifique de ces cellules nécessite une forte stimulation du TCR et des molécules co-stimulatrices telles que CD28. A l'inverse, la survie des LT naïfs repose sur une stimulation faible du TCR et de l'IL7. La stimulation Ag spécifique secondaire des LT CD4⁺ et CD8⁺ mémoires dépend d'un stimulus TCR fort sans engagement de CD28. La survie des LT CD4⁺ et CD8⁺ mémoires est indépendante du TCR, mais nécessite de l'IL7, tandis que l'IL15 pourrait également contribuer à la survie des LT CD8⁺ mémoires. A l'inverse, la prolifération homéostatique des LT CD8⁺ mémoires dépend principalement de l'IL15, tandis que celle des LT CD4⁺ mémoires nécessite deux signaux, de l'IL7 et de l'IL15.

A la périphérie, les LT naïfs ont besoin d'un signal impliquant des

interactions directes faisant intervenir l'engagement du TCR par des complexes CMH/peptide du soi comme le démontre les nombreuses expériences menées dans des souris déficientes en CMH classe I et/ou classe II (Grusby et al., 1991; Grusby et al., 1993; Zijlstra et al., 1990; Koller et al., 1990; Madsen et al., 1999). Les complexes CMH/peptides du soi peuvent être exprimés à la surface de cellules stromales (Classe I) ou de cellules présentatrices d'antigène (APC) (Classe II) (Takada and Jameson, 2009b; Martin, 2006). Bien qu'indispensable pour la survie des LT naïfs, ce signal n'est pas nécessaire pour la survie des LT mémoires (Murali-Krishna, 1999; Wiehagen et al., 2010). La survie des LT naïfs nécessite donc un signal d'activation sans prolifération impliquant un mécanisme de régulation puisque la voie en aval du TCR, activée ici, est la même que celle activée dans un contexte antigénique qui engendre une prolifération accrue.

Des signaux cytokiniques sont également nécessaires à la survie et peuvent varier selon le stade de différenciation. La principale cytokine participant à la survie des LT quiescents naïfs et mémoires est l'IL7 (Vivien, 2001; Schluns et al., 2000; Carrio et al., 2007; Osborne et al., 2007). Celle-ci est produite par les cellules stromales présentes dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires où les LT sont recrutés grâce à l'expression de CCR7. La capacité de circulation des LT quiescents est donc indispensable pour leur survie. L'un des facteurs importants de ce mécanisme est KLF2 (Krüppel Like Factor 2) qui régule l'expression des gènes *cd62l*, *ccr7* et *s1p1*, molécules clés de la migration des LT (Bai et al., 2007). La signalisation en aval de l'IL7R induit notamment l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl2 (B-cell lymphoma 2) qui permet la survie des LT (Akashi et al., 1997; Maraskovsky et al., 1997; Pellegrini et al., 2003; Grayson et al., 2001). Cependant, il apparaît que l'expression de ces molécules ainsi que l'expression de l'IL7R soient plus fortes dans les LT mémoires que dans les LT naïfs ce qui suggère une régulation spécifique de la survie de chaque sous-population.

Une autre cytokine est impliquée dans la subsistance à long terme des LT mémoires, l'IL15. Cette cytokine régule en fait principalement le lent auto-renouvellement de ces cellules (Becker et al., 2002; Yajima et al., 2002). Bien que partiellement redondant à celui de l'IL7, l'IL15 possède de ce fait un rôle complémentaire en soutenant le maintien à très long terme du pool de LT mémoires (Goldrath et al., 2002).

La définition claire de signaux spécifiques nécessaires à la survie des LT quiescentes est rendue complexe par l'hétérogénéité des populations considérées. Suivant le niveau de quiescence des LT, il semble que les signaux requis varient : un signal d'activation du TCR sous optimal et de l'IL7 pour les LT naïfs mais de l'IL7 uniquement pour les LT mémoires. Ceci pourrait s'expliquer par la nécessité de maintenir des caractéristiques intrinsèques différentes. A la survie propre des cellules, il faut également ajouter la nécessité de préserver une mémoire efficace à

l'échelle de la vie d'un individu. Ceci requiert un auto-renouvellement régulier des cellules mémoires, mécanisme là aussi différent suivant la sous-population.

1.1.3 Le métabolisme

L'état métabolique des cellules T peut avoir une influence profonde sur la croissance et la survie cellulaire. Ainsi, les LT naïfs utilisent un métabolisme oxydatif, qui évolue vers un métabolisme glycolytique lorsqu'ils sont stimulés par un pathogène. Après la clairance de l'Ag, les cellules T doivent revenir à un métabolisme oxydatif (Figure 1.2). Bien que l'activité métabolique des LT naïfs et mémoires quiescents soit réduite, elle est suffisante pour maintenir des fonctions essentielles, telles que la survie et la migration. Le maintien de ce phénotype est dépendant de signaux extérieurs reçus par les récepteurs aux cytokines, chimiokines et par le TCR. La régulation du métabolisme est ainsi couplée à des signaux essentiels pour d'autres propriétés des LT.

Le métabolisme des cellules T quiescentes repose donc sur une consommation à bas bruit de glucose et une oxydation d'acides gras, de pyruvate et de glutamine *via* le cycle de Krebs au sein des mitochondries (Michalek and Rathmell, 2010). Par exemple, le glucose est utilisé pour la synthèse d'oligosaccharide, la production de lactate et l'oxydation du CO₂ pour générer de l'ATP.

Pour maintenir une activité catabolique suffisante et empêcher l'atrophie et l'apoptose, les LT naïfs sont dépendants de signaux extrinsèques (Wofford et al., 2008; Rathmell et al., 2000). Le signal TCR pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'expression du transporteur de glucose Glut1. En absence de signal TCR, son expression diminue réduisant la capacité des cellules à emmagasiner du glucose (Jacobs et al., 2008; Wofford et al., 2008; Rathmell et al., 2000). Cependant le mécanisme par lequel le TCR régule Glut1 n'est pas certain. Dans les adipocytes et les myotubes la voie MAPK augmente la transcription de Glut1 (Barros et al., 1997). Or les signaux TCR activent cette voie de signalisation. Une stimulation du TCR peut également induire l'activation de l'AMPK et améliorer l'absorption du glucose et l'activité oxydative des cellules (Tamás et al., 2006; Rutter et al., 2003; Barnes et al., 2002).

Les cellules T mémoires dépendent, quant à elles, majoritairement de l'oxydation des lipides. Ainsi ces cellules expriment des niveaux élevés de CPT1 α , un transporteur de lipides mitochondrial (van der Windt et al., 2012). TRAF6 (tumor necrosis factor receptor activating factor 6) a été identifié comme un acteur important dans la transition vers un métabolisme d'oxydation lipidique et la génération de cellules mémoires bien que le mécanisme mis en jeu ne soit pas identifié (Pearce et al., 2009). Cette même étude a aussi révélé que

l'activation de l'AMPK par la metformine semble augmenter l'oxydation des lipides et améliorer la génération des LT mémoires. mTor peut aussi améliorer la génération de cellules mémoires en augmentant la glycolyse (Araki et al., 2009). La capacité des cellules T mémoires à rapidement proliférer en réponse à une restimulation suggère que ces cellules ont une capacité de passer rapidement de programmes métaboliques oxydatifs à un état glycolytique pro-croissance.

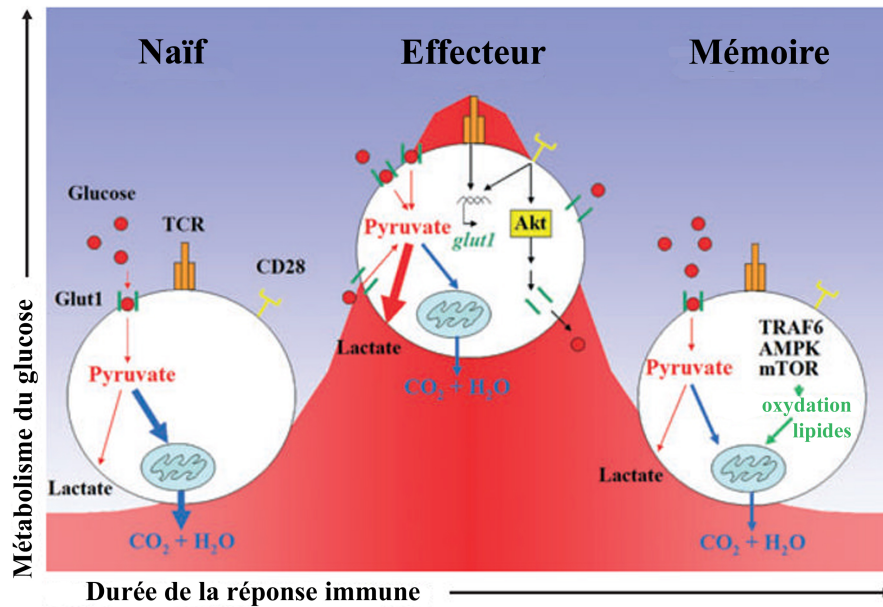


FIGURE 1.2 – Modifications transitoires du métabolisme des LT au cours d'une réponse immune (D'après (Michalek and Rathmell, 2010))

Les LT naïfs quiescents répondent à leurs besoins énergétiques faibles par le biais de l'oxydation du glucose et de la glutamine dans les mitochondries pour obtenir une production maximale d'ATP. Lors de l'activation, les LT naïfs s'activent et se différencient en effecteurs hautement proliférants et fonctionnels. Cette transition nécessite une augmentation massive du métabolisme glycolytique caractérisée par l'expression du transporteur de glucose Glut1 induite par l'engagement du TCR et de CD28, le transport de Glut1 à la surface des cellules médié par Akt et une augmentation de l'absorption du glucose. Après élimination du pathogène, les LT effecteurs survivants se différencient en LT mémoires et reviennent à un état métabolique oxydatif qui se caractérise par l'oxydation des lipides *via* TRAF6, AMPK et mTor.

L'accumulation de LT périphériques au cours de l'existence implique une limitation de l'accès aux signaux de survie extrinsèques qui sont nécessaires pour l'absorption de nutriments. Ce mécanisme empêche donc la déplétion des réserves de nutriments de l'organisme. La compétition entre les LT pour les facteurs de croissance peut définir quel LT survit et lequel est éliminé. L'existence de degrés de quiescence différents pourrait alors affecter le répertoire des LT maintenu.

1.2 La transition de la quiescence à la prolifération

En réponse à une stimulation antigénique, la prolifération des LT naïfs n'est pas immédiate. Un temps de latence au cours duquel la cellule ne cycle pas est observé. Ce laps de temps permet aux LT de mettre en place l'ensemble des mécanismes pro-prolifératifs nécessaires à leur expansion clonale. Au sein du pool de LT périphériques, tous les LT n'ont pas la même réactivité suite à une stimulation antigénique, laissant suggérer l'existence d'un seuil d'activation différent suivant la sous-population étudiée.

1.2.1 Une question de cinétique

Un mécanisme particulier semble se mettre en place afin que les cellules puissent sortir de leur état quiescent et entrer en prolifération. Il a pu être observé que lorsque des LT naïfs CD4⁺ transgéniques (spécifiques d'un peptide de l'hémagglutinine présenté par le CMH I-E^d) sont stimulés *in vitro* avec des CMH II chargés et des anticorps (Ac) anti-CD28 (Iezzi et al., 1998) ou lorsque des LT sont activés de manière polyclonale avec un mélange d'Ac anti-CD3 et anti-CD28 (Viola and Lanzavecchia, 1996), un temps de latence est nécessaire pour induire le premier cycle de division et une faible prolifération est visible à 72h. Cette durée peut être diminuée si des APC sont utilisées, en particulier des DC matures ou des fibroblastes exprimant de forts niveaux de molécules d'adhérence telles que ICAM-1 ou LFA-1 (Ding et al., 1993; Lanzavecchia et al., 1999; Lee et al., 2002). Une fois l'engagement du programme prolifératif établi, les LT sont capables de proliférer sans autre signal stimulant et se divisent environ toutes les 4 à 6h (Delon and Germain, 2000). La capacité des cellules naïves à entrer dans le premier cycle de division est généralement décrite comme étant dépendante de la « force » et de la durée du signal induit par le TCR et l'ensemble des co-récepteurs. Ce temps de latence permettrait donc aux LT d'intégrer l'ensemble des signaux nécessaires à leur activation.

Dans ces études *in vitro* les cellules sont constamment en contact avec la source de stimulation. Dans des conditions physiologiques, il n'est pas clairement établi que les LT soient soumis à une stimulation ininterrompue sur une si longue période. Les LT sont donc capables d'intégrer et d'additionner plusieurs signaux provenant de sources différentes.

En utilisant des techniques de microscopie, différents comportements décrivant l'interaction LT/DC dans un ganglion ont pu être mis en évidence. Par exemple, une fois que le LT reconnaît une DC chargée avec un peptide d'intérêt, la cellule T peut se lier à la surface de la DC pour une longue période allant jusqu'à 15h (Stoll, 2002). D'autres études montrent que des interactions courtes mais répétées peuvent activer et induire la prolifération des LT (Underhill et al., 1999; Gunzer et al., 2000). Les interactions LT/DC ne durent alors qu'une

dizaine de minutes et la durée cumulative de ces interactions au cours des 24 premières heures est de moins de 2h. Aucune synapse immunologique stable ne se forme mais les LT sont capables de proliférer (Gunzer et al., 2000). Une autre étude montre que la stimulation des LT se produit en trois phases distinctes (Mempel et al., 2004). Ainsi, lors de la première phase (durant 8h), les LT contactent de manière courte et répétitive les DC. Durant les 12h suivantes, les LT ralentissent leur mouvement et forment des contacts longs avec les DC. Enfin, lors de la troisième phase, les LT retrouvent leur mobilité et commencent à proliférer. Ces résultats amènent à penser que les LT sont capables de « mémoriser » plusieurs signaux de stimulation. En 2005, une étude montre qu'une stimulation sous optimale de LT primaires naïfs (5-7h de stimulation) permet d'observer trois sous-populations. La première se compose de cellules capables de se diviser sans avoir recours à d'autres signaux stimulants. Les deux autres, appelées cellules G_1 et G_0 ne se divisent pas. Après une période de repos pouvant aller jusqu'à 2 jours, les cellules G_1 , mais pas les cellules G_0 , se divisent rapidement si elles reçoivent un autre signal sous optimal de stimulation (Munitic et al., 2005). La capacité des LT à enregistrer plusieurs signaux pourrait être un moyen d'intégrer des signaux provenant de différentes sous-populations de DC.

La présence de cellules ne se divisant pas après un premier stimulus sous optimal mais capables d'être rapidement mobilisées après un second signal rappelle la description du point de restriction faite par Pardee (*cf.* Avant-propos). Jusqu'alors non décrit dans les LT, une étude réalisée en 2003 démontre son existence (Lea et al., 2003). Ce point de transition à partir duquel la cellule va entrer en cycle est atteint 3 à 5h après la stimulation par des Ac anti-CD3 et anti-CD28 dans des LT humains $CD4^+$ et $CD8^+$. Le passage de ce point nécessite la formation d'un complexe CDK6/4-Cycline D. En effet, les gènes essentiels pour la progression dans la phase G_1 et l'entrée en mitose sont transcrits lors de la transition G_0 - G_1 . Ce mécanisme requiert plusieurs complexes contenant une kinase dont l'activité dépend de la présence et de l'association à une cycline particulière. Les cyclines de type D associées aux CDK4 et CDK6 initient donc la phosphorylation de pRb, première étape de la progression en phase G_1 . Ces complexes peuvent également, plus tardivement en G_1 , séquestrer les inhibiteurs p21^{cip} et p27^{kip1} permettant de lever l'inhibition de l'activité du complexe CyclineE/CDK2 qui phosphoryle alors pRb sur des sites additionnels. Ceci entraîne donc la libération des facteurs de la famille E2F et la transcription des gènes indispensables à l'entrée en phase S (Figure 1.3). Il est intéressant de noter une différence dans la mise en place de ce réseau moléculaire entre les LT naïfs et mémoires. En effet, une quantité importante de complexes cycline D/CDK6 est pré-synthétisée et déjà assemblée dans les LT mémoires, contrairement aux LT naïfs. Cependant, étant séquestrés dans le cytoplasme, ils ne peuvent induire la progression dans le cycle. De plus, l'expression de l'inhibiteur de cycle p27^{kip1} est beaucoup plus faible dans les LT mémoires comparés aux LT naïfs et est préférentiellement associé aux complexes cycline D/CDK (Grayson et al., 2001;

Veiga-Fernandes and Rocha, 2004). Ceci pourrait en partie contribuer à la différence de réactivité entre des LT naïfs et mémoires de même spécificité suite à une stimulation antigénique.

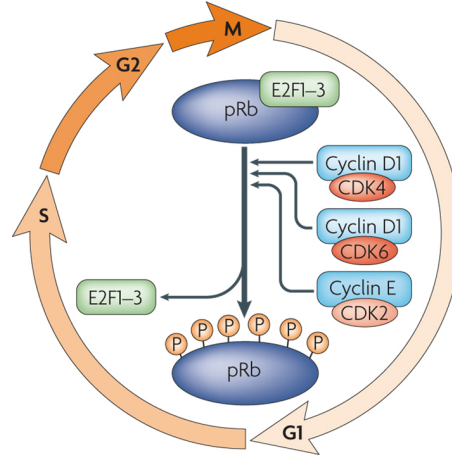


FIGURE 1.3 – **Rôle central de pRb dans la progression du cycle cellulaire** (D'après (Coller, 2007))

L'entrée en phase S est caractérisée par la phosphorylation de pRb par les complexes Cycline D/CDK4, Cycline D/CDK6 et Cycline E/CDK2. La phosphorylation de pRb entraîne la libération du facteur de transcription E2F, qui active ensuite les gènes nécessaires pour la progression du cycle cellulaire.

Il est également intéressant de noter que, même en prenant en compte ce temps de latence, la durée du premier cycle de division reste plus importante que la durée des cycles suivants. Une étude publiée récemment apporte une réponse intéressante (Mishima et al., 2014). Dans cette étude basée sur des LT CD4⁺ stimulés avec de la PMA et ionomycine, les auteurs montrent que les phases « Gap », phases décrites comme étant nécessaires à la croissance de la cellule et à la préparation de la phase S (phase G₁) ou de la phase M (phase G₂), sont quasiment absentes lors du deuxième cycle. Ceci permet ainsi à la cellule de se diviser de manière très rapide. Les LT CD4⁺ doivent donc posséder un mécanisme de régulation unique pour compenser le raccourcissement de ces phases G₁ et G₂ et maximiser leur vitesse de prolifération.

En 2014, une équipe propose quant à elle un modèle de « cycle cellulaire élastique » (Dowling et al., 2014). Cette étude est basée sur l'utilisation de LT issus d'une souris transgénique exprimant un reporteur fluorescent rouge durant la phase G₁ et un reporteur vert à partir de la phase S jusqu'à la fin du cycle. Ils proposent un modèle de cycle cellulaire au cours duquel la durée de chaque phase individuelle varie en proportion directe par rapport à la durée totale de la division. Ce modèle suppose la présence d'un facteur partagé et transmis aux cellules filles qui affecte la progression à travers toutes les phases du cycle cellulaire. Différents candidats peuvent être envisagés. En effet, les changements

de durée des phases du cycle cellulaire peuvent être dus à des niveaux différents de protéines régulatrices telles que les cyclines ou les CDK ou à des modifications épigénétiques contrôlant le niveau de synthèse d'ARNm.

Le degré de quiescence des LT, inhérent à leurs propriétés intrinsèques, pourrait donc influencer le temps nécessaire pour passer le point de restriction et entrer dans le cycle cellulaire.

1.2.2 Une question de seuil d'activation

A la périphérie, l'activation des LT nécessite des signaux simultanés d'activation. Le premier signal dérive de l'interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH qui définit la spécificité du LT activé. Ce signal est alors transduit par un complexe moléculaire multiprotéique et peut être modulé *via* l'interaction de molécules agissant directement sur cette voie de signalisation et de cofacteurs. La régulation du seuil d'activation des LT fait intervenir un jeu de balance entre molécules inhibitrices et molécules activatrices. En intégrant l'ensemble de ces signaux, la cellule peut donc produire une large palette de réponses et finement adapter son comportement.

Des modifications intracellulaires intervenant directement au niveau des molécules composant la voie de signalisation en aval du TCR ainsi que la présence de molécules inhibitrices permettent de maintenir un état inactif des LT. Nous en citerons quelques exemples.

L'une des premières molécules dans la signalisation en aval du TCR est Lck. La régulation de l'activité de cette protéine tyrosine kinase cytoplasmique est donc cruciale pour déterminer le type de réponse à adopter. Lck permet au LT de moduler sa réponse en fonction de la force de l'interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH. En effet, si cette interaction est de faible affinité, Lck phosphoryle rapidement SHP1 (SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase) et SHP1 déphosphoryle en retour Lck induisant un arrêt de la signalisation en aval du TCR (Štefanová et al., 2003). Au contraire, si l'interaction est de forte affinité, une activation rapide de Erk permet la phosphorylation de Lck empêchant la liaison de SHP1. Le signal TCR est donc soutenu et active encore plus fortement Erk. Lck existe sous différentes conformations déterminant son activité. Ainsi, les protéines Csk (C-ter Src Kinase) peuvent phosphoryler Lck sur une tyrosine inhibitrice et la maintenir dans une conformation inactive (Vang et al., 2004). Cette action est contre-balançée par CD45, qui peut déphosphoryler ce même site et ainsi permettre l'autophosphorylation de Lck et donc son activation. CD45 peut également avoir un rôle inhibiteur de Lck en déphosphorylant un site actif de la molécule (Figure 1.4). La balance entre ces deux rôles antagonistes de CD45 semble être contrôlée par la proximité des molécules effectrices stimulées par le TCR et par la conformation de CD45.

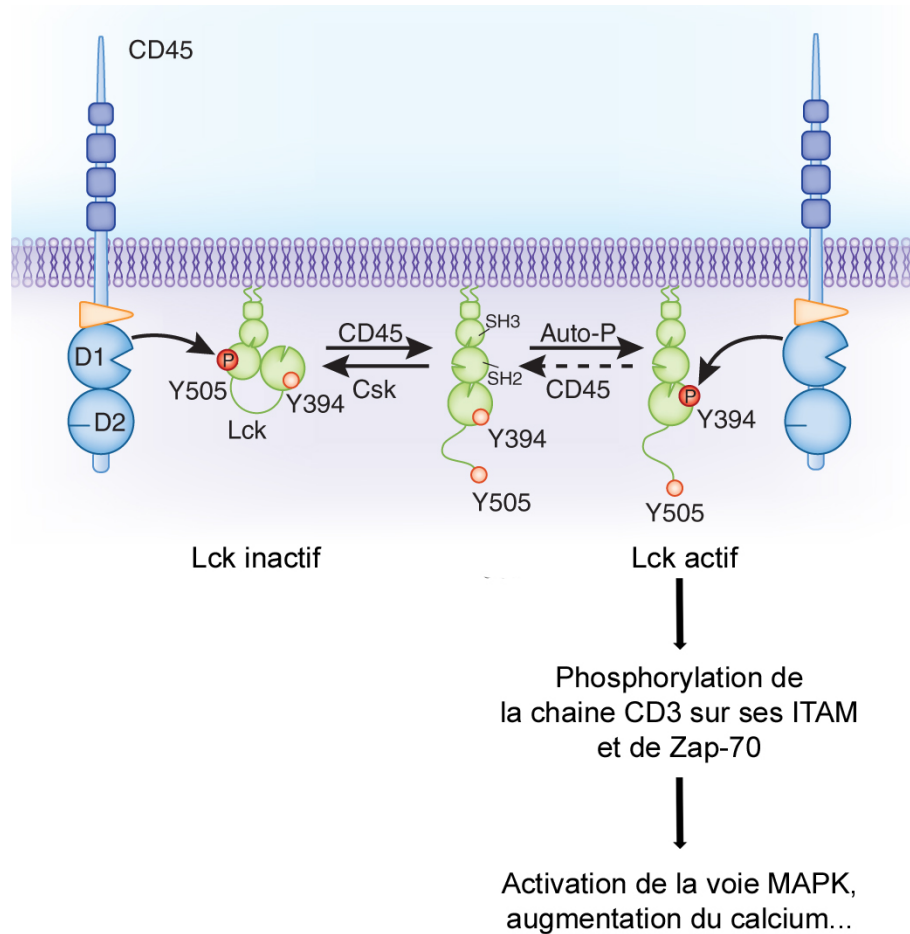


FIGURE 1.4 – Représentation schématique de la régulation du signal TCR par Lck (D'après (Rhee and Veillette, 2012))

Dans les LT, l'activité de Lck est régulée par CD45 et les protéines Csk par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation. L'activation de Lck permet de phosphoryler les chaînes CD3 sur leurs motifs ITAM ainsi que Zap-70. Ainsi activée, Zap-70 peut à son tour phosphoryler les effecteurs en aval et ainsi activer par exemple les voies MAPK et du calcium.

Les molécules c-Cbl et Cbl-b facilitent également l'ubiquitinylation des protéines et donc leur dégradation. Ces régulateurs antagonisent donc le signal TCR (Bachmaier et al., 2000; Naramura et al., 2002; Murphy et al., 1998; Balagopalan et al., 2007). Ce signal négatif est contrebalancé par la signalisation *via* CD28 (Zhang et al., 2002).

Les protéines adaptatrices de la famille Dok (Downstream of tyrosine kinase) sont également impliquées dans le maintien de l'homéostasie des LT en établissant une boucle de rétrocontrôle négative de la signalisation du TCR. Les différents membres de cette famille sont régulés *via* des mécanismes différents. La phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 est dépendante de la production de phospho-inositide, produit suite à l'activation du TCR alors que la

phosphorylation de Dok-4 induit sa relocalisation dans un compartiment spécifique du cytoplasme (Gerard et al., 2009; Guittard et al., 2009; Guittard et al., 2010).

L'engagement de facteurs de co-stimulation est alors nécessaire pour lever la régulation négative afin de permettre l'activation des cellules.

Il existe deux grandes familles de facteurs de co-stimulation. La superfamille des immunoglobulines regroupe un ensemble de molécules s'associant directement à des kinases. Le membre le plus connu de cette famille est le récepteur membranaire CD28 dont les ligands, exprimés sur les APC, sont CD80 (ou B7.1) et CD86 (ou B7.2). L'engagement de ce récepteur est nécessaire pour induire la prolifération et la différenciation des cellules naïves. En effet, la réponse à une large variété de challenges immuns chez des souris déficientes pour CD28 est réduite (Shahinian et al., 1993; King et al., 1996; Mittrucker et al., 2001; Compton and Farrell, 2002). Étonnament, la signalisation en aval du TCR peut être amplifiée en partie par l'engagement à la membrane plasmique d'une forme mutée de CD28 ne possédant qu'un domaine extra-membranaire (Morin et al., 2015). La signalisation *via* CD28 peut agir directement sur le cycle cellulaire en induisant une augmentation de l'expression des cyclines D, l'activation de CDK4 et CDK6 et la phosphorylation de pRb ainsi qu'en dégradant l'inhibiteur p27^{kip1} par l'activation de la voie de la PI3K (Boonen et al., 1999; Kovalev et al., 2001; Appleman et al., 2002). De plus, la signalisation de CD28 en augmentant l'expression de c-REL, un membre de la famille NF- κ B, contribue à la modification de la structure de la chromatine et à la déméthylation de l'ADN notamment au niveau du locus du gène codant l'IL2, nécessaire pour l'engagement de la croissance des cellules, l'entrée du cycle cellulaire et la différenciation (Kane et al., 2002; Grogan et al., 2001; Rao et al., 2003; Bruniquel and Schwartz, 2003).

La seconde grande famille de facteurs de co-stimulation est celle des récepteurs TNF. Parmi ceux-ci on peut noter, par exemple, CD27, OX-40 ou encore 4-1BB. Ces récepteurs ne s'associant pas directement avec des protéines kinases, la transduction du signal se fait par l'intermédiaire de protéines adaptatrices TRAF et permet l'activation des voies PI3K, NF- κ B, JNK et MAPK. Ceci entraîne donc une augmentation de la survie, la production de cytokines et la prolifération cellulaire (Watts, 2005).

Suite à leur activation, les LT expriment des co-répresseurs tels que CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) et PD-1 (Programmed Death-1) qui permettent d'augmenter le seuil d'activation des LT. CTLA-4 est structuellement très proche de CD28, protéine de co-stimulation emblématique, et interagit avec les mêmes ligands mais avec une affinité différente (Balzano et al., 1992; van der Merwe et al., 1997). Ces deux molécules sont retrouvées sur les LT et sont notamment importantes pour le contrôle du développement des maladies auto-immunes (Waterhouse et al., 1995; Hizawa et al., 2001).

Un réseau moléculaire interactif complexe se met donc en place afin de contrôler la réponse immune. Les LT naïfs et mémoires pourraient donc produire des réponses d'efficacité différente en s'appuyant sur des spécificités sous-jacentes de ces réseaux moléculaires propres à chaque stade de différenciation.

La différence observée dans l'efficacité de la signalisation entre un LT naïf et un LT mémoire peut provenir de différents niveaux. On peut citer, par exemple, la protéine Lck. Des études utilisant des souris, dans lesquelles l'expression de Lck est inductible, montrent que cette molécule n'est pas nécessaire pour l'induction d'une réponse CD8 mémoire contrairement à une réponse primaire. Ainsi, lors de l'activation du TCR avec un super Ag bactérien, la voie de signalisation induite par la phospholipase C- β pourrait compenser l'absence de Lck (Tewari et al., 2006). Au contraire, l'activité kinase de Zap-70 semble nécessaire à l'activation des LT mémoires (Au-Yeung et al., 2010). Ceci suggère donc que Zap-70 est activée par une autre kinase que Lck dans les LT mémoires.

1.3 La prolifération lymphocytaire T

1.3.1 Phase d'activation et d'expansion

Les LT naïfs sont principalement retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses). À l'équilibre, ils sillonnent continuellement ces zones *via* les vaisseaux sanguins et lymphatiques (Braun et al., 2011). La rencontre entre un LT quiescent et une cellule présentant son Ag spécifique, comme les cellules dendritiques par exemple, aboutit à la formation d'une synapse immunologique. Cette structure regroupe les signaux activateurs nécessaires pour la mise en place d'une réponse efficace (Vardhana et al., 2010). En effet, trois signaux majeurs sont requis : l'Ag (signal 1) dont la reconnaissance par le TCR apporte la spécificité de la réponse, les molécules de co-stimulation (signal 2) qui permettent de moduler la réponse et les cytokines inflammatoires (signal 3). L'ensemble de ces signaux aboutissent au déclenchement d'un ensemble de voies de signalisation et en 24 heures en moyenne le LT s'engage dans un processus de prolifération et de différenciation en LT effecteurs (Henrickson et al., 2008a; Henrickson et al., 2008b). C'est l'expansion clonale. Au cours de cette phase, les LT acquièrent de nouvelles capacités effectrices. Par exemple, les LT CD8⁺ en se différenciant vont être capables de produire des cytokines leur permettant, une fois sur le site de l'infection, d'amplifier la réponse et de contrôler l'infection comme l'IFN γ et le TNF α . Ils expriment également des ligands de récepteurs à domaine de mort (FasL) et produisent des molécules cytotoxiques de type granzyme et perforine afin d'éliminer les cellules infectées (Anikeeva and Sykulev, 2011).

Lors de cette étape d'expansion clonale, les LT naïfs subissent des modifications importantes de leurs propriétés. L'activation et la prolifération des

LT impliquent un arrêt temporaire de la migration des LT et leur rétention dans les ganglions, favorisant une stimulation optimale des cellules T. L'acquisition de nouvelles propriétés effectrices induit une modification des signaux de survie nécessaires. Le volume des LT augmente et on observe un changement d'activité métabolique nécessaire à la prolifération rapide et massive (Pearce, 2010).

Conséquences sur le potentiel migratoire des LT naïfs

Très rapidement après une stimulation efficace, on observe une modification transitoire des propriétés migratoires des LT dépendant de l'activation de la voie PI3K-mTor. En effet, des LT quiescents expriment très fortement à leur surface la molécule d'adhérence L-sélectine ou CD62L, clé essentielle leur permettant d'entrer dans un ganglion lymphatique. L'activation du LT va induire à la fois un clivage de la partie extracellulaire de CD62L mais aussi un arrêt de la transcription de son gène. Une autre molécule importante pour la circulation des LT dans les organes lymphoïdes secondaires voit son expression diminuer, CCR7 le récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21 produites par les cellules stromales des zones T, de même que l'expression du récepteur S1P₁, qui assure la sortie des LT des ganglions lymphatiques, suite à une diminution de l'expression du facteur de transcription KLF2 (Sinclair et al., 2008). A l'inverse d'autres marqueurs vont être acquis par les LT activés. Ainsi, la production d'interféron de type I (IFN) entraîne l'augmentation de l'expression de CD69, un marqueur d'activation contrôlant négativement l'expression de S1P₁ (Shiow et al., 2006). L'ensemble de ces modifications favorisent ainsi un contact prolongé entre le LT et la DC mais aussi une rétention dans l'organe lymphoïde secondaire, environnement favorable à la prolifération et à la différenciation en LT effecteurs.

Conséquences sur la survie

La capacité des cellules activées à recevoir les signaux de survie est également modifiée. En effet, l'expression de l'IL7R est diminuée comparée à celle des cellules naïves, ce qui se traduit par une réduction de l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl2 (Grayson et al., 2001; Kaech et al., 2003). Les cellules activées sont donc plus sensibles à l'apoptose. De nouveaux récepteurs aux cytokines sont alors exprimés comme l'IL2R (Kaech et al., 2003). L'IL2 devient donc la cytokine majeure de cette phase d'expansion clonale, notamment pour la différenciation en cellules effectrices et mémoires (Malek and Castro, 2010). En effet, la signalisation en aval de l'IL2R fait intervenir la voie de la PI3K, ce signal étant nécessaire pour la différenciation en LT effecteurs. Ainsi dans un modèle murin invalidé pour la chaîne α du récepteur à l'IL2, il existe un défaut dans la génération des LT cytotoxiques (Cornish, 2006; Pipkin et al., 2010).

Conséquences sur le métabolisme

Afin de permettre une prolifération massive, les voies métaboliques doivent également s'adapter et passer d'un régime catabolique vers un régime anabolique. Ainsi, l'activation de la voie PI3K/Akt et mTor permet d'augmenter la synthèse protéique et participe à l'inactivation de facteurs de quiescence comme les facteurs FoxO (Jacobs et al., 2008).

Différenciation et migration vers le site inflammatoire

La signalisation *via* le TCR déclenche la prolifération et la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en LT CD4⁺ effecteurs spécialisés. Ce processus est guidé par les cytokines produites par les cellules de l'immunité innée en réponse à un PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern). Les facteurs Stat spécifiques pour chaque sous-population vont alors pouvoir induire l'expression de « master régulateurs » (Tableau 1.2).

Cytokines présentes dans le milieu	Différenciation des LT CD4 ⁺ naïfs en	Facteurs Stat impliqués	Master régulateur
IL12 ou IFN de type I	LT CD4 ⁺ T _H 1 produisant de l'IFN γ	Stat4, Stat1	Tbet
IL4	LT CD4 ⁺ T _H 2 produisant de l'IL5 et de l'IL13	Stat6, Stat5	Gata3
IL6 et TGF β	LT CD4 ⁺ T _H 17 produisant de l'IL17	Stat3	ROR γ t
IL2 et TGF β	LT CD4 ⁺ régulateur	Stat5	FoxP3

TABLE 1.2 – **Signaux cytokiniques induisant la différenciation spécifique des LT CD4⁺ naïfs** (D'après (Tubo and Jenkins, 2014; Christie and Zhu, 2014))

L'activation d'un LT CD8⁺ naïf va conduire à une expansion clonale massive au sein des ganglions lymphatiques, générant un grand nombre de cellules aux capacités effectrices. Ces LT CD8⁺ effecteurs sont capables de lyser les cellules infectées par exocytose de granules contenant de la perforine et des granzimes (Williams and Bevan, 2007). L'IL12 produite par les DC induit la cytotoxicité des LT CD8⁺ effecteurs et permet la production d'IFN γ et de TNF (Williams and Bevan, 2007). Etant donné que les LT effecteurs ne peuvent exercer leur fonction que localement, les LT CD8⁺ effecteurs doivent alors migrer vers le site de l'infection.

L'expression de S1P₁ semble être nécessaire au processus de sortie des ganglions lymphatiques. Durant une réponse immune, les niveaux d'expression de CCR7 et S1P₁ sont diminués à la surface des LT activés. Après environ quatre divisions, Les LT réexpriment préférentiellement S1P₁ (Pham et al., 2008). Cette modification d'expression de récepteur entraîne la sortie des LT effecteurs différenciés des ganglions lymphatiques vers la périphérie. Ils sont alors guidés par des chimiokines vers les sites d'infection ou d'inflammation afin de jouer leur rôle d'effecteurs. Cette migration est rendue possible par l'induction de l'expression de récepteurs aux chimiokines à la surface des LT CD8⁺ activés tels que CXCR3 ou CCR5 (Ferguson and Engelhard, 2010; Nolz et al., 2011). Les LT CD4⁺ expriment eux aussi des récepteurs aux chimiokines qui varient en fonction du sous type cellulaire (Bromley et al., 2008). En plus de l'expression d'une combinaison de récepteurs aux chimiokines inflammatoires, les LT CD8⁺ activés expriment des molécules d'adhérence spécifiques du tissu inflammé. Ce signal d'adressage leur permet donc de migrer vers des organes particuliers (Agace, 2006).

Il est intéressant de noter que l'acquisition des marqueurs de différenciation des LT et leur capacité à sécréter des cytokines corrélerent avec le nombre de divisions effectuées pendant la stimulation primaire (Gett and Hodgkin, 1998; Bird et al., 1998). Les LT qui se divisent le plus sont plus susceptibles de produire des cytokines effectrices telles que l'IFN γ lors d'une restimulation. A l'inverse, les LT qui ne se divisent pas ou peu ne produiront pas de cytokines et deviendront anergiques (Schwartz, 2003) résultant non seulement en une absence de différenciation mais également en une induction de tolérance.

Différents modèles ont été proposés pour expliquer le couplage entre le cycle cellulaire et la différenciation. Un premier modèle propose que les phase S et M soient des « fenêtres d'opportunité » pour des modifications épigénétiques des gènes exprimés par les LT effecteurs. Un second modèle suggère que les molécules de signalisation et les facteurs de transcription spécifiques de chaque sous-population soient répartis de manière asymétrique lors de la division des deux cellules filles. Le troisième modèle postule, quant à lui, que les facteurs impliqués dans l'expression des gènes effecteurs et mémoires sont directement contrôlés par les CDK (Wells and Morawski, 2014).

1.3.2 Phase de contraction

Une fois le pic de l'expansion clonale atteint, la phase de contraction est engagée. Cette phase se caractérise par la mort par apoptose de 90 à 95% des LT activés permettant un retour à l'équilibre homéostatique (Pellegrini et al., 2003). Néanmoins le déclenchement de cette phase reste mal compris.

Pendant longtemps, la corrélation entre l'élimination du pathogène et le déclenchement de la phase de contraction a laissé penser que l'organisme

disposait d'un moyen pour détecter la fin du danger. Cependant, des expériences menées sur des souris infectées par *Listeria monocytogenes* et traitées par un antibiotique indiquent que la cinétique de la contraction de la réponse n'est pas modifiée (Badovinac et al., 2004). Par contre, il semble que le déclenchement de la contraction soit dépendant de signaux détectés précocément au cours de l'activation comme l'inflammation et la nature du signal TCR.

L'inflammation pourrait avoir un rôle actif dans la régulation de cette phase notamment *via* l'IFN γ . En effet, dans un modèle de souris déficientes pour l'IFN γ , la mort cellulaire est diminuée au cours de la phase de contraction. De plus, une faible production d'IFN γ en début de réponse n'engendre qu'une très modeste phase de contraction (Badovinac, 2000; Badovinac et al., 2004).

Il a été proposé que la déprivation en facteurs de survie des LT CD8⁺ puisse induire la mort cellulaire au cours de cette phase. Ainsi, le grand nombre de cellules produites au pic de la réponse limiterait l'accès aux cytokines de survie (Fischer et al., 2008; Strasser and Pellegrini, 2004; Vella et al., 1998; Yajima et al., 2006). En effet, l'injection d'IL2 ou d'IL15 au cours de la phase de contraction augmente la survie des LT CD8⁺ (Blattman et al., 2003; Yajima et al., 2006). Cependant cette hypothèse n'est pas totalement admise. Une étude ultérieure conteste ces résultats en suggérant que la compétition pour l'accès aux cytokines n'a pas de lien direct avec la mort cellulaire (Prlc and Bevan, 2008).

Le mécanisme moléculaire mis en jeu suite à une déprivation en signaux de survie fait intervenir une activation de la voie mitochondriale de l'apoptose *via* l'induction de la molécule pro-apoptotique Bim. Or l'invalidation de Bim entraîne une accumulation de LT à la fin d'une réponse anti-virale ou anti-bactérienne (Hildeman et al., 2002; Pellegrini et al., 2003). Cependant, l'expression de Bim ne varie pas. Néanmoins l'expression de Bcl2, molécule anti-apoptotique diminue au cours de l'activation. Ceci pourrait donc entraîner une modification de la balance mort/survie des LT basculant vers l'apoptose induite par Bim (Grayson et al., 2001; Hildeman et al., 2002).

1.3.3 Différenciation en LT mémoires

Bien que la majorité des LT activés disparaissent en fin de réponse, 5 à 10% d'entre eux survivent et forment la population de cellules mémoires.

Deux modèles principaux décrivent la différenciation en LT mémoires : un modèle linéaire et un modèle ramifié. Le premier indique une différenciation progressive des LT naïfs en LT effecteurs puis en LT mémoires. La différenciation ramifiée implique quant à elle que les LT naïfs donnent directement naissance aux LT effecteurs et aux LT mémoires. En effet, une première division asymétrique engendrerait une répartition inégale des composants intracellulaires dans les cellules filles : la cellule dérivant du côté où s'est formée la synapse immunologique présenterait des caractéristiques de LT effecteurs. La seconde

cellule fille se différencierait en un LT mémoire (Chang et al., 2007).

L'intégration des différents signaux d'activation induit une grande diversité au sein des LT effecteurs se répercutant sur la génération des LT mémoires. Deux grandes populations sont décrites : les SLECs (Short-Lived Effector Cells) et les MPECs (Memory Precursor Effector Cells). Les SLECs sont à l'origine des LT effecteurs à courte durée de vie alors que les MPECs produisent les LT mémoires. Une certaine balance entre ces deux populations se met en place, influencée par de nombreux signaux. Par exemple, une forte stimulation du TCR et une forte inflammation induisent la génération de SLECs (Badovinac et al., 2004; Sarkar et al., 2007; Cui et al., 2009).

De plus, la population de cellules mémoires est elle aussi hétérogène. En effet, on peut décrire plusieurs sous-populations parmi les LT mémoires : les LTcm et les LTem. Ainsi, lors d'une réponse secondaire, les LTem présentent une activité effectrice immédiate au site de l'infection. Les LTcm, quant à eux, sont à l'origine d'une forte et rapide expansion clonale générant à la fois des LT effecteurs et mémoires (Sallusto et al., 2014; Masopust, 2001).

En plus de signaux extracellulaires, un ensemble de voies moléculaires intracellulaires influencent la balance effecteurs/mémoires. T-bet et Eomes, deux membres de la famille des facteurs de transcription à « boîte T », ont été décrits pour agir en coopération sur l'induction des fonctions effectrices des LT et leur différenciation en LT mémoires. Ainsi, T-bet favorise la génération des SLECs et LTem alors qu'Eomes permet la génération des LTcm (Cui and Kaech, 2010).

Cette balance entre T-bet et Eomes semble être contrôlée par la voie mTor, qui inhibe le facteur FoxO1 dans les LT CD8⁺, favorisant la différenciation en LT effecteurs (Rao et al., 2010). En effet, un traitement des LT avec de la rapamycine, un inhibiteur de mTor, favorise la formation de LT mémoires. Cependant, ce processus semble plus complexe. La génération de LT mémoires peut être favorisée lorsque l'activité de mTor est inhibée par une faible dose de rapamycine dans les huit premiers jours d'une réponse immune ou par une forte dose à partir du pic de l'expansion clonale (Araki et al., 2009). *In vitro*, des cellules stimulées par un Ag dans un milieu riche en IL15, ou avec une faible dose d'IL2, se différencient en LTcm. L'inverse est observé pour une forte dose d'IL2 (Manjunath et al., 2001). Ceci reflète la différence d'intensité d'activation de la voie PI3K en aval des récepteurs à l'IL15 et à l'IL2 : l'IL2 induit une plus forte activation de la voie PI3K et de mTor, favorisant la différenciation en effecteurs contrairement à l'IL15 qui serait propice à la différenciation en mémoires (Cornish, 2006; Sinclair et al., 2008). Or mTor est également impliquée dans la régulation du métabolisme des cellules. Ainsi, une inhibition de mTor et l'activation conjointe de l'AMPK favorisent la transition d'un régime anabolique à un régime catabolique. Le maintien de ce régime dans un pool de cellules pourrait aider à les induire en LT mémoires.

Chapitre 2

Les molécules de signalisation importantes dans le cadre de notre étude

2.1 Les facteurs de transcription FoxO

Les facteurs de transcription FoxO appartiennent à la famille Forkhead box et plus particulièrement à la sous famille O. Chez les mammifères, cette sous famille, homologue de la protéine DAF-16 de *C. elegans*, comprend quatre membres : FoxO1, FoxO3a, FoxO4 et FoxO6 (Peng, 2007). Ils possèdent une fonction conservée au cours de l'évolution et permettent aux cellules d'adapter leur prolifération en fonction de la disponibilité des nutriments dans l'environnement (Webb and Brunet, 2014). Ces facteurs de transcription, composés d'une centaine d'acides aminés et formés de trois hélices α , trois brins β et de deux boucles, sont caractérisés par leur domaine de liaison à l'ADN (Clark et al., 1993). Ce domaine interagit avec des motifs spécifiques de type 5'-GTAAA(T/C)AA-3'.

Les facteurs FoxO sont exprimés dans un grand nombre d'organes différents, sauf FoxO6 dont l'expression est restreinte au système nerveux central (Furuyama et al., 2000). Ce dernier est d'ailleurs régulé de manière différente des autres facteurs FoxO (Jacobs et al., 2003; van der Heide et al., 2005). Les facteurs FoxO1 et FoxO3 sont quant eux les plus exprimés dans le système immunitaire mais leur niveau d'expression est différent suivant l'organe et le type de cellules étudiés. FoxO1 est plutôt exprimé dans la rate et les ganglions lymphatiques alors que FoxO3 est détecté dans le thymus et la moelle osseuse. De plus, les LT et LB expriment plus FoxO1, alors que FoxO3 est plutôt retrouvé dans les cellules de l'immunité innée (Dejean et al., 2011). Cette préférence transcriptionnelle n'est pas encore comprise. Dans les cellules quiescentes, les facteurs FoxO sont majoritairement nucléaires (Tran et al., 2003) et peuvent ainsi activer ou réprimer la transcription de nombreux gènes. Par la suite, j'utiliserai le terme facteurs FoxO pour désigner à la fois FoxO1, FoxO3 et

FoxO4.

2.1.1 La régulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs FoxO

La régulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs FoxO s'effectue à plusieurs niveaux. Leur activité peut être régulée par le contrôle de l'expression même de ces facteurs. Différents mécanismes peuvent réguler leur activité transcriptionnelle.

Régulation de leur expression

Le premier niveau de régulation concerne le contrôle de leur propre expression. Ces processus contrôlent à la fois la transcription des facteurs FoxO, la régulation de leur traduction et leur dégradation protéique.

L'expression des facteurs FoxO est régulée au niveau de leur propre transcription. Le facteur de transcription STAT3 semble réguler positivement ce mécanisme dans les LT. En effet, STAT3 se lie aux promoteurs de *Foxo1* et *Foxo3*, comme l'indiquent les études portant sur des LT CD4⁺ naïfs *Stat3*^{-/-} dont les niveaux d'ARNm de ces deux facteurs FoxO sont faibles (Oh et al., 2011). Plusieurs facteurs peuvent affecter l'expression de FoxO comme par exemple p53 à la suite d'un dommage à l'ADN. Ce facteur, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, peut se lier au promoteur de FoxO3 et le transactiver (Renault et al., 2011). Les facteurs FoxO eux-mêmes possèdent la capacité de réguler leur propre transcription, attestant d'une boucle de régulation positive (Essaghiri et al., 2009; Al-Mubarak et al., 2009).

La régulation de l'expression protéique des facteurs FoxO s'effectue à deux niveaux par des mécanismes post-transcriptionnel et post-traductionnel. Au niveau post-transcriptionnel, les facteurs de transcription FoxO peuvent être sujet à une régulation *via* plusieurs micro-ARN. Par exemple, miR-27a, miR-96 et miR-182 induisent une diminution de l'expression de l'ARNm FoxO1 dans des cellules cancéreuses (Guttilla and White, 2009). Il a été montré que, dans des LT murins activés, miR-182 est induit par l'IL2 et diminue l'expression de FoxO1 permettant aux cellules de continuer à proliférer et ce même après disparition des facteurs de croissance (Stittrich et al., 2010). Un autre micro-ARN, miR-155, inhibe l'expression du facteur FoxO3 dans la lignée T Jurkat et dans des LT murins (Yamamoto et al., 2011).

La régulation de l'expression des facteurs FoxO passe également par des modifications post-traductionnelles. La dégradation protéolytique des facteurs FoxO suite à leur translocation vers le cytoplasme en est un exemple. Ce mécanisme conduit à une poly-ubiquitination des facteurs FoxO et à leur dégradation par la voie du protéasome (Matsuzaki et al., 2003; Plas and

Thompson, 2003; Aoki et al., 2004). Par exemple, FoxO3 peut être régulé négativement suite à sa phosphorylation par Erk induisant une ubiquitinylation par MDM2 et une dégradation *via* le protéasome (Yang et al., 2008). De plus, des cytokines pro-inflammatoires peuvent mener à l'activation de IKK ($I\kappa B$ kinase) et ainsi à l'inactivation de FoxO3 (Hu et al., 2004). Par ailleurs, un autre mode de régulation des facteurs FoxO fait intervenir les GIMAP (GTPases of the immunity-associated protein family) connues pour leur rôle dans l'autoimmunité (Shin et al., 2007; Hellquist et al., 2007; Cousins et al., 2006). En effet, des LT murins possédant une mutation dans le gène *Gimap5* montrent une diminution de l'expression de FoxO1, FoxO3 et FoxO4. Ceci serait dû à la dégradation des facteurs FoxO par le protéasome induite *via* un mécanisme SKP2 dépendant (S-phase kinase-associated protein 2) (Aksoylar et al., 2012).

Régulation de leur activité transcriptionnelle

Au contrôle de leur expression s'ajoute la régulation de leur activité qui fait intervenir une modification de localisation subcellulaire des facteurs FoxO (Brunet et al., 1999). Il a été démontré au laboratoire que l'activation de LT par des DC chargées d'un peptide aboutit à l'exclusion nucléaire de FoxO *via* l'activation de la voie PI3K/Akt. Ceci conduit donc à un arrêt de son activité transcriptionnelle et permet la prolifération des LT (Fabre et al., 2005). Plus précisément, l'activation de la kinase PI3K aboutit au recrutement à la membrane plasmique des kinases Akt et SGK1 qui, une fois activées par phosphorylation, se transloquent dans le noyau où elles peuvent à leur tour phosphoryler les facteurs FoxO (Alessi et al., 1997; Stokoe, 1997; Guertin et al., 2006; Facchinetti et al., 2008; Brunet et al., 2001). Cette phosphorylation sur trois sites (une thréonine et deux sérines) permet de constituer un point d'ancrage typique de la protéine 14-3-3. Cette liaison conduit à une déstabilisation de la liaison FoxO/ADN et aboutit à l'export nucléaire et à la rétention cytoplasmique des facteurs FoxO (Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999; Salih and Brunet, 2008). Un grand nombre de phosphorylations, décrites dans des modèles cellulaires non lymphoïdes, peuvent influencer sur la localisation cellulaire des facteurs FoxO. Le but n'étant pas de faire une liste exhaustive des modifications décrites, je soulignerais juste le fait qu'il existe une intégration des différentes phosphorylations plus ou moins liées qui permet de contrôler finement l'activité transcriptionnelle des facteurs FoxO suivant les stimuli extracellulaires. Ainsi, les modifications post-traductionnelles induites par l'insuline ou les facteurs de croissance entraînent une séquestration cytoplasmique et donc l'inactivation des facteurs FoxO. Un stress oxydatif entraînera quant à lui des modifications imposant une localisation nucléaire et donc l'activation des facteurs FoxO (Brunet et al., 2002; Lehtinen et al., 2006).

En dehors des phosphorylations, d'autres modifications post-traductionnelles peuvent moduler la localisation des facteurs FoxO comme l'acétylation ou encore

la méthylation. Il a été montré que des acétylations de FoxO1 inhibent ou entravent complètement sa liaison à l'ADN démontrant que des modifications post-transcriptionnelles peuvent altérer directement la fonction des facteurs FoxO en plus de modifier leur localisation intracellulaire (Obsil and Obsilova, 2011). La méthylation des facteurs FoxO sur plusieurs résidus peut inhiber leur exclusion nucléaire en empêchant la phosphorylation par Akt sur la sérine 256 (Yamagata et al., 2008). Ce jeu de modifications post-traductionnelles complémentaires offre une réponse très fine et spécifique des facteurs FoxO en fonction des stimuli reçus (Figure 2.1).

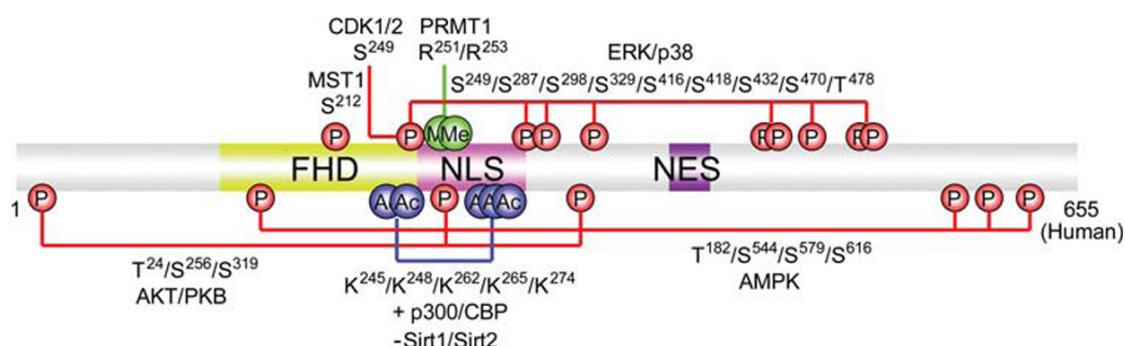


FIGURE 2.1 – Principales modifications post-traductionnelles régulant l'activité des facteurs de transcription FoxO (D'après (Zhao et al., 2011))
Le facteur FoxO1 humain est ici pris en exemple.

Mécanismes de régulation de la transcription

Les facteurs FoxO peuvent réguler la transcription des gènes par différents mécanismes. Tout d'abord, ils peuvent soit induire, soit réprimer leurs gènes cibles. D'autre part, leur activité résulte soit d'une fixation directe sur une séquence consensus, soit réguler la transcription de gènes cibles de manière indépendante à leur liaison à l'ADN probablement par le biais de co-facteurs (Ramaswamy et al., 2002) (Figure 2.2).

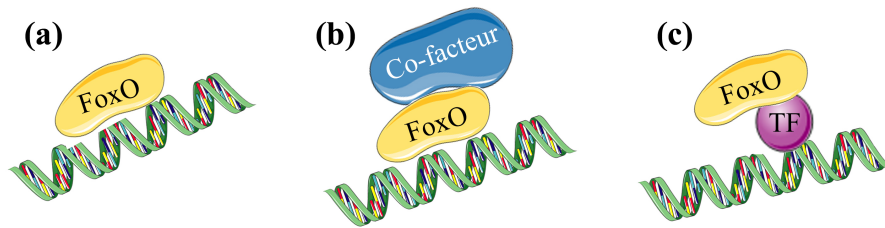
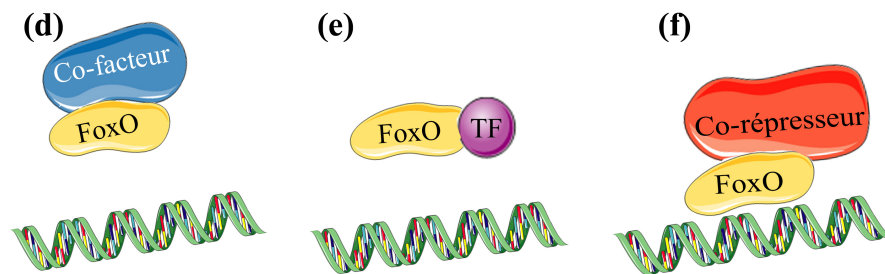
Activation transcriptionnelle**Répression transcriptionnelle**

FIGURE 2.2 – Mécanismes de régulation de la transcription par les facteurs FoxO (D'après (Birkenkamp and Coffey, 2003))

(a) FoxO se lie directement à une séquence spécifique sur le promoteur et le transactive. (b) FoxO se lie directement à une séquence spécifique sur le promoteur et l'activation de la transcription s'effectue grâce au recrutement d'un co-facteur. (c) FoxO coopère avec un autre facteur de transcription (TF) pour activer la transcription. (d) La titration d'un co-facteur nécessaire pour de nombreux autres facteurs de transcription conduit à une inhibition générale de la transcription. (e) La titration d'un facteur de transcription conduit à une inhibition spécifique des gènes normalement induits par ce facteur. (f) La transcription est inhibée *via* le recrutement d'un co-répresseur.

Les facteurs FoxO ont également un rôle de remodelage de la chromatine leur conférant la possibilité de moduler les états actifs de la chromatine (Hatta and Cirillo, 2007). Dans ce cas, les facteurs FoxO sont toujours associés avec des co-facteurs tels que les protéines Smad, des histones déacétylases, des acétyltransférases ou encore des hormones nucléaires (van der Vos and Coffey, 2008). Les facteurs FoxO en coopération avec d'autres protéines peuvent donc intégrer des informations extrinsèques provenant de nombreuses voies et initier la régulation transcriptionnelle de divers programmes.

2.1.2 La régulation des propriétés cellulaires par les facteurs FoxO

Les facteurs FoxO possèdent un rôle primordial dans le contrôle de l'homéostasie des LT. En composant avec l'ensemble des signaux perçus par les

cellules, ils sont capables de réguler finement des fonctions importantes de la physiologie T.

Implication dans la quiescence

Les facteurs FoxO participent activement à la régulation de la quiescence (Eijkelenboom and Burgering, 2013) dans de nombreux types de cellules, dont les LT, par le contrôle de l'expression de nombreux gènes (Ouyang and Li, 2011). Parmi ceux-ci, on peut par exemple citer *klf2*, *cbl-b* jouant un rôle dans le phénomène de quiescence que nous allons développer (Fabre et al., 2008).

La plupart des études réalisées pour étudier le rôle des facteurs FoxO dans la régulation du cycle cellulaire ont été réalisées *in vitro* en exprimant des formes mutées des facteurs FoxO dans des modèles cellulaires pour la plupart non lymphoïdes. L'expression de gènes importants pour la progression du cycle cellulaire est régulée par les facteurs FoxO. En effet, les cycline D1 et cycline D2 sont inhibées par les facteurs FoxO3 et FoxO4, alors que la transcription de pRb est activée (Schmidt et al., 2002; Kops et al., 2002b). D'autres modèles cellulaires ont également permis de mettre en évidence un rôle des facteurs FoxO dans des phases plus tardives du cycle cellulaire. Ainsi, en régulant la transcription de gènes impliqués dans la résistance au stress, comme *gadd45* (Growth Arrest and DNA Dammage inducible protein 45), les cellules peuvent être bloquées en phase G₂/M (Tran, 2002). De plus, ils peuvent aussi participer à la détoxification des dérivés réactifs de l'oxygène en régulant les gènes codant par exemple la catalase ou la superoxyde dismutase (Kops et al., 2002a). L'ensemble de ces données reste à vérifier dans des cellules hématopoïétiques. Étonnament, les gènes connus pour être des cibles transcriptionnelles de FoxO1 dans d'autres modèles cellulaires, sont faiblement induits dans les LT. En effet, une expérience de puce à ADN réalisée dans la lignée T Jurkat au laboratoire montre que les cyclines D2 et D3 ne sont que peu régulées par FoxO1 dans ces cellules. L'effet est un peu plus marqué pour GADD45. Par contre, FoxO1 induit un ensemble de gènes impliqués dans la migration des LT tels que *cd62l*, *ccr7* et *s1p1* (Fabre et al., 2008).

Il a été observé dans un modèle murin déficient pour la GEF Vav1 un défaut d'activation de la voie PI3K dans les LT, induisant une activation constante de FoxO1. Ce phénomène conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ associé à un maintien de l'expression de l'inhibiteur des CDK p27^{kip1} (Charvet et al., 2006). De plus, une carence en IL2 peut également induire un blocage d'une lignée cellulaire T murine, les cellules CTLL-2, en phase G₀/G₁ du cycle. Cet arrêt peut être mimé en présence d'IL2 par un traitement avec des inhibiteurs de la voie PI3K ou par surexpression d'une forme constitutivement nucléaire de FoxO3. Ce blocage du cycle passe aussi par l'activation de la transcription de p27^{kip1} (Stahl et al., 2002).

Le premier travail effectué sur un modèle murin invalidé pour FoxO3 par

« gene trap targeting strategy » montre que cette délétion est à l'origine d'un faible désordre inflammatoire et d'une lymphoprolifération à partir de seize semaines (Lin et al., 2004). Ces souris présentent donc des organes lymphoïdes secondaires dont la taille est augmentée par rapport à des souris WT. Ces phénomènes sont principalement dus aux LT CD4⁺ qui présentent des capacités de prolifération et de production de cytokines supérieures alors qu'aucun défaut apoptotique n'est observé. Ces caractéristiques font intervenir une activation de la voie NF κ B. En effet, dans ces cellules, les inhibiteurs de l'activité transcriptionnelle de NF κ B, I κ B β et I κ B ϵ , sont moins présents tant au niveau transcriptionnel que protéique. FoxO3 pourrait donc avoir un rôle dans le maintien de la quiescence des LT. Néanmoins, dans d'autres études, basées sur des modèles murins différents, les souris ne présentent pas ce phénotype inflammatoire (Castrillon, 2003; Dejean et al., 2009; Hosaka et al., 2004). Ceci suggère que la délétion de FoxO3 seul n'est pas suffisante pour engendrer une activation spontanée des LT et révèle une activité compensatrice possible des autres formes de FoxO et notamment de FoxO1.

Les modèles murins où FoxO1 est invalidé dans tous les organes sont létaux au stade embryonnaire E10.5. Il est donc nécessaire d'utiliser des modèles de délétion spécifique des LT. Ainsi, aucune prolifération spontanée des LT n'est observée dans ce type de modèle. C'est également le cas dans les modèles combinant une délétion de FoxO1 et FoxO3 dans les LT (Kerdiles et al., 2009; Gubbels Bupp et al., 2009; Ouyang et al., 2009; Ouyang et al., 2010). De plus, pour s'affranchir de la redondance des facteurs FoxO observée, une invalidation conditionnelle simultanée de FoxO1, FoxO3 et FoxO4 a été réalisée (Paik et al., 2007). Ces souris ne développent des lymphomes qu'à partir de 5 mois et 75% d'entre elles ne présentent aucun phénotype majeur au bout d'un an. Il semble donc que d'autres acteurs soient également impliqués dans la régulation d'une fonction aussi importante pour l'intégrité de l'organisme qu'est la quiescence des LT.

Implication dans la survie des cellules

En l'absence de stress particulier, FoxO1 semble être le facteur principal dans la régulation de la survie des LT quiescents. *In vivo* il régule directement la transcription de la chaîne α de l'IL7R (Kerdiles et al., 2009; Ouyang et al., 2009). En effet, l'invalidation du gène *foxo1* dans les LT induit une diminution de l'expression de l'IL7R α conduisant à une atténuation de l'expression de Bcl2, une molécule anti-apoptotique. Ainsi une déplétion du compartiment T périphérique dans les modèles murins déficients pour FoxO1 est observée. La survie des LT périphériques peut être restaurée par croisement de ces modèles avec une souris transgénique pour l'IL7R α (Ouyang et al., 2009). Comme nous l'avons vu précédemment, le facteur FoxP1 possède un rôle inhibiteur sur l'expression de l'IL7R α . Or ce facteur se fixe sur la même séquence enhancer du promoteur de la chaîne α de l'IL7R que FoxO1 (Feng et al., 2010). Il pourrait donc y avoir une

compétition entre ces deux facteurs, d'autant plus que cette étude suggère une répression de l'expression de l'IL7R α par FoxP1 en l'absence de FoxO1.

Nous avons également vu que l'IL7 est un signal primordial dans la survie des LT naïfs et mémoires. Or la quantité de protéines FoxO est plus faible dans les LT mémoires (Allam et al., 2009). Les mécanismes de régulation de l'IL7R α pourraient donc différer entre ces deux types cellulaires. Suivant la différenciation du LT, l'état du locus de l'IL7R α peut varier (Chandele et al., 2008). Dans les LT naïfs, le répresseur transcriptionnel Gfi-1 n'étant pas exprimé, le locus de l'IL7R α est acétylé et une faible quantité de GABP α est liée au promoteur. FoxO1 est quant à lui fortement exprimé et permet la transcription du gène de l'IL7R α . Dans les LT mémoires, Gfi-1 est exprimé mais ne se lie que faiblement au promoteur de la chaîne α de l'IL7R. GABP α se fixe fortement sur le promoteur de l'IL7R α et les histones sont acétylées. Ce mécanisme pourrait être important pour la génération des LT mémoires mais également pour leur maintien à long terme. En effet, des LT mémoires dont le gène *foxo1* est invalidé voient leur survie à long terme altérée (Rao et al., 2012). Ainsi, dans les LT mémoires, il est possible que la plus faible quantité de FoxO1 soit suffisante pour induire une transcription efficace de la chaîne α de l'IL7R ou que FoxO1 en favorisant le recrutement de co-facteurs active la transcription du gène.

Implication dans la migration des cellules

Le transcriptome induit par les facteurs de transcription FoxO varie suivant le type cellulaire étudié. L'une des fonctions spécifiques des LT liée à leur survie et contrôlée par les facteurs FoxO est leur capacité migratoire. Plusieurs groupes, dont le laboratoire, ont montré que, dans des LT au repos, FoxO1 possède un rôle crucial dans la régulation de cette propriété en influant à la fois sur l'expression de molécules membranaires et l'expression de facteurs intrinsèques qui participent au contrôle de ce processus. En effet, FoxO1 contrôle entre autres l'expression de CCR7, le récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21 (Fabre et al., 2008; Kerdiles et al., 2009). La chimiokine CCL19 induit non seulement l'adhérence de LT sur un support cellulaire ou matriciel, mais a également un effet attracteur des LT puisqu'elle stimule leur migration. Cette étude a également permis de mettre en évidence que l'expression de FoxO1 induit un ensemble de gènes impliqués dans l'entrée et la sortie ganglionnaires des cellules T (*cd62l*, *edg1* et *edg6*) (Fabre et al., 2008). Ainsi, dans des modèles murins invalidés pour FoxO1, le nombre de LT naïfs dans les ganglions lymphatiques est réduit du fait de la perte d'expression de CD62L et CCR7, molécules clés pour l'entrée dans ces organes (Kerdiles et al., 2009; Gubbels Bupp et al., 2009). FoxO1 est également capable de se lier directement sur le promoteur de *klf2* et de le transactiver (Fabre et al., 2008). Or ce dernier influence la capacité migratoire des LT en contrôlant directement la transcription des gènes codant CD62L et S1P₁ (Carlson et al., 2006; Bai et al., 2007). Ainsi FoxO1 active la

transcription de KLF2 qui induit lui-même la transcription de CD62L et S1P₁. Le facteur de transcription FoxO1 coordonne donc dans les LT leur capacité de migration et de prolifération. En effet, au repos, FoxO1 est nucléaire et les LT sont quiescents et migrent ; lors de l'activation, FoxO1 devient cytoplasmique et les LT prolifèrent et ne migrent plus.

Implication dans la différenciation des cellules

Les facteurs FoxO sont également impliqués dans la différenciation des LT en LT mémoires, LT régulateurs (LTreg) et LT_H17.

Le facteur FoxO1 est impliqué dans la différenciation des LT CD8⁺ au cours d'une réponse immune. En effet, son inhibition par exclusion nucléaire suite à l'activation du LT est nécessaire pour permettre l'expression du facteur de transcription T-bet favorable à la mise en place d'une réponse effectrice. FoxO1 réprime en effet la transcription du gène *Tbx21* codant T-bet (Rao et al., 2012; Michelini et al., 2013). Par ailleurs, FoxO1 peut directement cibler le promoteur du facteur de transcription Eomes et induire sa transcription, favorisant la génération de LTcm. Ainsi l'activité transcriptionnelle de FoxO1 conduit à l'acquisition d'un phénotype mémoire par les LT en activant les gènes tels que *eomes*, *cd62l* et *il7ra* (Rao et al., 2012). Ces résultats corrélerent avec le fait que l'activation constitutive de Akt, qui inactive les facteurs FoxO, favorise une différenciation en LT effecteurs à courte durée de vie (Macintyre et al., 2011; Kim et al., 2012).

De manière intéressante, les facteurs FoxO semblent impliqués dans le maintien du statut mémoire dans les LT CD8⁺. Dans ces cellules, la signalisation en aval de CD27 et de 4-1BB, qui active notamment la voie PI3K/Akt, est nécessaire pour diminuer l'expression protéique de FoxO1 afin de les maintenir en phase pré-G₁ sans l'abolir totalement pour qu'ils ne puissent pas passer le point R (Allam et al., 2009). Ainsi, il est possible que ce statut plus « avancé » dans le cycle cellulaire des LT mémoires soit en partie activement maintenu *via* la diminution d'expression et/ou d'activité des facteurs FoxO. En effet, ceci pourrait conduire à l'augmentation de l'expression de la cycline D3, la cycline de type D majoritaire dans les LT, et à une plus faible inhibition de pRb. L'absence d'expression de p27^{kip1} pourrait également en résulter. La régulation négative des facteurs FoxO favoriserait alors une diminution du seuil d'activation caractéristique des LT mémoires.

FoxO3 possède un rôle majeur non redondant dans la réponse aux infections virales. En effet, des souris déficientes pour FoxO3 infectées avec le virus LCMV par exemple montrent une phase d'expansion des LT plus forte que les souris contrôles. Ce phénotype ne semble pas dépendre des cellules T mais de la présence, dans ces souris invalidées pour FoxO3, d'un nombre plus important de

DC avec un état de maturation avancé. Ainsi ces DC peuvent mieux stimuler les LT et augmenter leur survie en produisant par exemple plus d'IL6. Ceci suggère donc un rôle majeur de FoxO3 dans la régulation de la production de cytokines proinflammatoires (Dejean et al., 2009). Un autre groupe a montré que FoxO3 pouvait réguler la réponse des LT CD8⁺ de manière intrinsèque. Ainsi, l'accumulation de LT spécifiques de l'Ag serait due à une diminution de l'apoptose et non à une augmentation de la prolifération. A long terme, un plus grand nombre de LT mémoires subsisteraient également (Sullivan et al., 2012). Cependant le modèle murin utilisé ici est le même que celui utilisé par Lin *et al.* qui est le seul à présenter une lymphoprolifération tardive. Des études plus approfondies semblent donc nécessaires pour identifier les rôles intrinsèque et extrinsèque de FoxO3 au cours de la réponse immune.

Ainsi, FoxO1 semble jouer un rôle intrinsèque dans la différenciation en LT mémoires alors que FoxO3 influe sur l'accumulation des LT spécifiques de l'Ag aboutissant à un plus grand nombre de LT mémoires.

Les facteurs FoxO sont également impliqués dans la différenciation des LT CD4⁺ en régulant la balance de différenciation entre LT régulateurs et LT_H17. En effet, les facteurs FoxO1 et FoxO3 jouent un rôle fondamental dans le développement et la fonction des LT régulateurs (Ouyang et al., 2009; Kerdiles et al., 2010) en régulant directement la transcription du facteur FoxP3, facteur de transcription clé du développement et du fonctionnement des LTreg (Harada et al., 2010; Ouyang et al., 2010). Les facteurs FoxO agissent donc très précocement dans la différenciation des LTreg alors que FoxP3 agit plus tardivement sur le contrôle de l'homéostasie des cellules et leur fonction. Il semble que les facteurs FoxO et notamment FoxO1 puisse eux aussi jouer un rôle important dans la fonction des LTreg (Ouyang et al., 2012). En effet, les souris déficientes pour FoxO1 dans les LTreg développent des troubles inflammatoires majeurs similaires à ceux observés dans les souris déficientes pour FoxP3 mais sans la perte des LTreg. De plus, FoxO1 est nécessaire en aval d'un signal TGF- β pour inhiber l'expression du facteur T-bet impliqué dans la différenciation en T_H1 des LT CD4⁺ (Kerdiles et al., 2010). Une étude très récente montre un rôle inattendu de FoxO1 dans l'inhibition de la tolérance médiée par les LTreg résidant dans les tissus non lymphoïdes chez la souris (Luo et al., 2016). En effet, l'inactivation de FoxO1 est nécessaire pour la fonction de ces LTreg qui ont un rôle crucial dans la suppression des réponses LT CD8⁺. La voie de signalisation des facteurs FoxO dans les LTreg pourrait donc être ciblée afin de rompre la tolérance immune.

Le rôle des facteurs FoxO dans la différenciation en T_H17 est beaucoup moins connu. De premières expériences réalisées sur des souris déficientes pour FoxO1 ont suggéré une régulation négative de l'expression de l'IL-17A, cytokine pro-inflammatoire produite par les T_H17, par FoxO1 (Kerdiles et al., 2009). Plus

récemment, FoxO1 a été impliqué dans la signalisation en aval de SGK1 dans le développement des T_H17 (Wu et al., 2013). Le mécanisme moléculaire mis en jeu restait peu décrit. Au laboratoire, il a été montré que FoxO1 est un régulateur négatif direct du programme de différenciation en T_H17 *in vivo* et *in vitro*, en agissant par un mécanisme intrinsèque (Laine et al., 2015). En effet, un complexe moléculaire entre FoxO1 et ROR γ t, le facteur de transcription clé des T_H17 , se forme inhibant ainsi la transcription de nombreux gènes importants pour la différenciation des LT en T_H17 médiée par ROR γ t.

2.2 Les protéines 14-3-3

La régulation de l'activité, de la localisation et des interactions protéiques par phosphorylation est un mécanisme crucial pour de nombreux processus cellulaires.

2.2.1 Fonctionnement général

Les protéines 14-3-3 sont une famille de protéines régulatrices ubiquitaires chez les eucaryotes très conservée au cours de l'évolution au sein des différentes espèces. Elles sont impliquées dans les interactions protéiques médiant la transduction de signaux au sein des cellules. D'abord découvertes dans le cerveau de mammifères, elles sont caractérisées comme des protéines acides de poids moléculaire compris entre 25-35kDa par monomère. Cette famille de protéines est composée de 7 isoformes : β , γ , ε , σ , ζ , τ et η et est retrouvée dans les cellules sous forme d'homo et hétéro-dimères. Ceux-ci peuvent lier un grand nombre de protéines *via* des sérines et thréonines phosphorylées localisées au niveau de deux motifs consensus spécifiques : RSx[pS/pT]xP et Rxxx[pS/pT]xP dans lesquels x représente n'importe quel résidu. Cette interaction intervient au niveau du coeur des monomères formant une poche amphipathique (Yaffe et al., 1997; Muslin et al., 1996). Cependant, les protéines 14-3-3 sont également capables de se lier à des cibles non phosphorylées contenant les motifs GHSL et WLDLE (Andrews et al., 1998; Petosa et al., 1998). La liaison de 14-3-3 à sa cible peut entraîner diverses modifications comme par exemple un changement de conformation, de localisation sub-cellulaire ou encore stabiliser la structure de la protéine avec laquelle elle interagit (Tzivion and Avruch, 2002) (Figure 2.3).

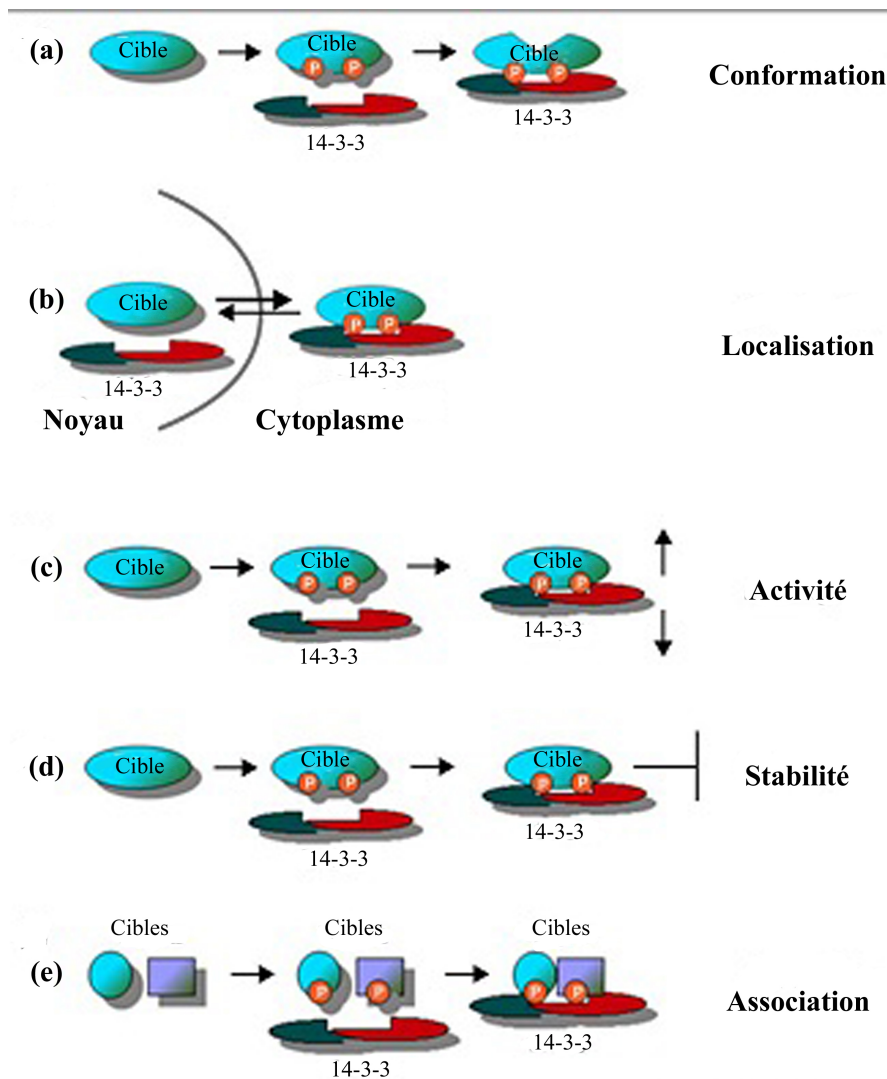


FIGURE 2.3 – Modes d'interaction des protéines 14-3-3 et de leurs cibles (D'après (Gökirmak et al., 2010))

La liaison de 14-3-3 à sa cible peut entraîner des changements conformationnels (a), modifier la localisation nucléaire *vs* cytoplasmique (b), réguler l'activité catalytique (c), contrôler le renouvellement des protéines cibles (d) ou associer plusieurs cibles ensemble (e).

Les poches de liaison formées par les dimères sont similaires et toutes les isoformes de 14-3-3 peuvent lier toutes les cibles phosphorylées testées *in vitro*. Cependant, il existe des différences d'affinité entre les isoformes (Aitken et al., 2002) et il existe une répartition cellulaire différente des diverses isoformes de 14-3-3 (Perego and Berruti, 1997; van Zeijl et al., 2000). Par ailleurs, l'expression des isoformes de 14-3-3 varie au cours du temps pendant le développement et en fonction des signaux extracellulaires (Roberts and Bowles, 1999; van der Brug et al., 2002). Ainsi, l'existence de plusieurs isoformes, qui sont spatialement et temporellement régulées, peut fournir une spécificité cellulaire dans les réponses

aux cascades de signalisation qui déclenchent la phosphorylation des protéines cibles des 14-3-3 (Mackintosh, 2004).

2.2.2 Fonctions cellulaires régulées

La régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose sont les fonctions les plus étudiées des protéines 14-3-3.

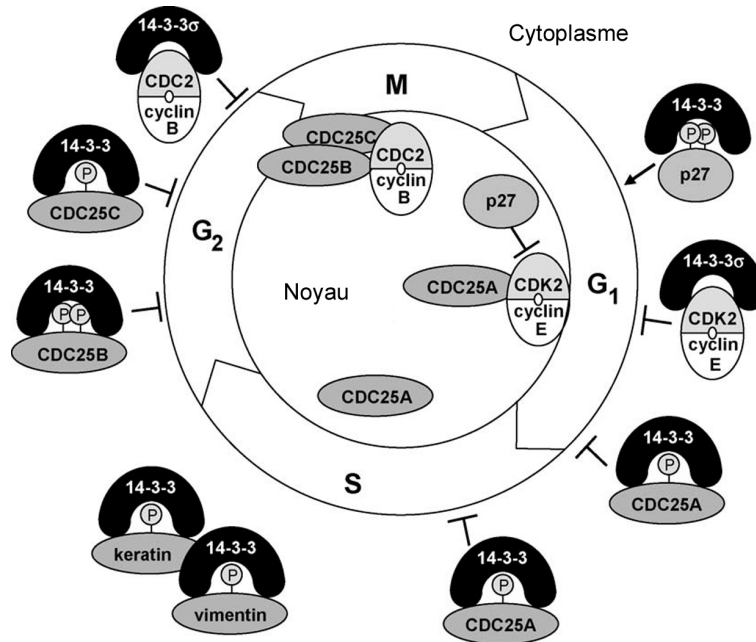


FIGURE 2.4 – Régulation de la progression dans le cycle cellulaire par les protéines 14-3-3 (D'après (Hermeking et al., 1997))

Les protéines 14-3-3 jouent un rôle pivot dans la régulation de la progression du cycle cellulaire en faisant partie de nombreux complexes de « checkpoint » (Figure 2.4). L'entrée en mitose nécessite l'activation de la protéine kinase Cdc2 inactive pendant la phase S ou après des dommages de l'ADN car phosphorylée. Son activation passe donc par sa déphosphorylation par la phosphatase Cdc25C (Gautier et al., 1991). L'activation de cette phosphatase est cruciale pour la progression en mitose et son inhibition constitue l'un des « checkpoints » clé lors de la transition G₂/M (Takizawa and Morgan, 2000; Donzelli and Draetta, 2003). Les protéines 14-3-3 sont impliquées dans la régulation de son activité en séquestrant Cdc25C phosphorylé dans le cytoplasme pendant toute la phase S induisant une augmentation de la phosphorylation de Cdc2 et donc une inhibition de la mitose (Sanchez, 1997; Graves et al., 2001). Ainsi, la liaison de 14-3-3 à Cdc25C masque le signal de localisation nucléaire de la protéine mais ne modifie pas son activité phosphatase (Kumagai and Dunphy, 1999). Une boucle

de régulation positive existe pour assurer le maintien sous forme active de Cdc2 une fois la mitose engagée. En effet, Cdc2 activée par Cdc25C phosphoryle en retour Cdc25C sur un site empêchant sa liaison avec 14-3-3 (Bulavin et al., 2003).

Les protéines 14-3-3 peuvent également exercer un contrôle dans la régulation de Cdc2 et Cdc25C de manière indirecte. En effet, la sérine/thréonine kinase Chk1 qui en phosphorylant Cdc25C crée un site de liaison avec 14-3-3 est elle-même activée en réponse aux dommages liés à l'ADN après liaison avec 14-3-3 (Zhou and Elledge, 2000; Liu et al., 2000; Jiang et al., 2003). De même, l'un des régulateurs principaux de l'activité de Cdc2, la kinase Wee1, est sujet à la régulation par 14-3-3. Ainsi, la perte de la liaison entre 14-3-3 et Wee1 ou Cdc25C induit l'activation de Cdc2 et donc la progression de la mitose (Lee et al., 2001).

Par ailleurs, toutes les isoformes de 14-3-3 ne semblent pas avoir le même effet sur leurs ligands et donc sur la progression du cycle cellulaire (Katayama et al., 2005). Par exemple, toutes ne sont pas capables d'exercer une régulation de Cdc25C. Ainsi, 14-3-3 σ ne peut pas lier Cdc25C mais empêche néanmoins la condensation de la chromatine induite par cette phosphatase (Dalal et al., 2004). Ceci suggère donc que 14-3-3 σ régule l'entrée en mitose en aval de Cdc25C en supprimant l'activité de Cdc2 par un mécanisme alternatif. En effet, le gène codant 14-3-3 σ est une cible de p53 et son expression est induite suite à la détection de dommages de l'ADN conduisant à un arrêt en G₂/M (Hermeking et al., 1997). Ce phénomène est dû à la séquestration par 14-3-3 σ du complexe Cdc2/Cycline B dans le cytoplasme donc hors de portée de ses substrats nucléaires (Chan et al., 1999; Laronga et al., 2000).

Les protéines 14-3-3 sont également impliquées dans la régulation de la transition G₁/S par différents mécanismes. Au cours de cette transition, 14-3-3 lie et inhibe cette fois Cdc25A, un régulateur central de l'entrée en phase S qui a pour rôle de déphosphoryler Cdk2 (Chen et al., 2003). De plus, 14-3-3 σ peut également lier directement les kinases Cdk2 et Cdk4 mais cette liaison ne semble pas liée à une phosphorylation puisqu'aucun motif consensus n'est retrouvé dans ces protéines kinases (Laronga et al., 2000).

Les protéines 14-3-3 peuvent aussi interagir directement avec un inhibiteur de Cdk, p27^{kip1}, et ainsi conduire à un arrêt en phase G₁ par inhibition des complexes Cycline E/Cdk2. En effet, l'activité de p27^{kip1} dépend notamment de sa localisation cellulaire qui est régulée par son état de phosphorylation et donc son association avec les protéines 14-3-3. Ainsi, après phosphorylation par Akt sur une thréonine, p27^{kip1} ne peut plus se lier à l'importine α et est séquestrée par 14-3-3 dans le cytoplasme (Slingerland and Pagano, 2000; Fujita, 2002; Sekimoto et al., 2004).

En plus de réguler les kinases et phosphatases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, les protéines 14-3-3 régulent également les facteurs de transcription inhibant la progression du cycle cellulaire. Les protéines 14-3-3 sont

responsables notamment de la localisation intracellulaire des facteurs FoxO jouant un rôle à la fois dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (Brunet et al., 2002; Obsil et al., 2003; Obsilova et al., 2005; Rena et al., 2001). Ceci montre donc l'importance de ces protéines dans la régulation à différents niveaux du cycle cellulaire.

Les protéines 14-3-3 régulent l'apoptose en liant les protéines de la famille Bcl-2. En effet, leur rôle a été mis au jour en étudiant les interactions entre les protéines 14-3-3 et les protéines contenant un domaine BH3, dont Bad et Bax. Ainsi la phosphorylation de Bad par Akt induit sa liaison avec 14-3-3. D'autres kinases pourraient également être impliquées dans ce processus (Datta et al., 1997; Tan et al., 1999). 14-3-3 facilite l'inactivation de Bad à la fois en le séquestrant de manière transitoire pour empêcher sa liaison avec la molécule anti-apoptotique Bcl-XL et donc son inhibition. Mais ce mécanisme maintient également Bad dans une conformation favorable à la phosphorylation d'un résidu additionnel dans son domaine BH3 se traduisant par un état plus inactif (Datta et al., 2000).

Par ailleurs, les protéines 14-3-3 peuvent aussi lier et inactiver Bax, un effecteur pro-apoptotique (Nomura et al., 2003). Cette interaction empêche Bax de transiter vers la mitochondrie où cette protéine interagit avec Bak pour induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et déclencher la libération du cytochrome c et l'activation des caspases (Youle and Strasser, 2008).

L'ensemble de ces résultats indique une implication importante de 14-3-3 dans la régulation de la voie de la PI3K. Un des points communs des différents modes d'action de 14-3-3 est d'inhiber par séquestration les effecteurs moléculaires à l'origine de ces processus.

2.3 L'histone déacétylase HDAC6

La famille des histones déacétylases (HDAC) est subdivisée en différentes classes. HDAC6 fait partie de la sous classe IIb des HDAC comprenant également HDAC10. La protéine HDAC6 est apparue immédiatement différente notamment par sa localisation sub-cellulaire. Découverte plus tard, HDAC10 est moins étudiée.

2.3.1 Fonctionnement général

L'enzyme HDAC6 a été découverte en 1999 (Verdel and Khochbin, 1999) et est caractérisée par deux domaines déacétylases et un domaine ZnF-UBP (Zinc Finger in specific Proteases). Cette protéine est majoritairement retrouvée dans le cytoplasme des cellules. Il apparaît que l'activité catalytique de HDAC6 nécessite la présence simultanée de ses deux domaines déacétylases (Zhang et al.,

2003).

Bien que dénommée histone déacétylase, le premier substrat de HDAC6 est l' α -tubuline cytoplasmique. L' α et la β -tubuline forment un complexe hétérodimérique à la base de la structure des microtubules. Ces derniers, des structures cylindriques polarisées creuses, sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la mitose, le transport intracellulaire de vésicules ou d'organites et la mobilité des flagelles. Ils participent ainsi à la formation de structures subcellulaires telles que le cytosquelette, le fuseau mitotique ou les centrioles (Nogales, 2000). Diverses modifications post traductionnelles comme par exemple l'acétylation, la phosphorylation ou la polyglycylation peuvent affecter la tubuline (MacRae, 1997). L'utilisation de lignées stables exprimant une forme de HDAC6 sauvage ou mutée dans son domaine catalytique a permis de montrer son activité tubuline déacétylase. Ces premiers résultats ont été confortés par l'inhibition spécifique de HDAC6 en utilisant des drogues telles que la trichostatine A (TSA) ou le butyrate ainsi que des techniques d'ARN interférence (Hubbert et al., 2002; Matsuyama, 2002; Zhang et al., 2003). HDAC6 interagit avec la β -tubuline et catalyse la réaction de déacétylation sur la lysine 40 de l' α -tubuline *via* son deuxième domaine déactylase (Haggarty et al., 2003). Une autre déacétylase, SIRT2, peut interagir avec HDAC6 et déacétyler la tubuline en présence de NAD (North et al., 2003). Ainsi, HDAC6 et SIRT2 co-localisent avec le réseau de microtubules dans le cytoplasme.

HDAC6 peut déacétyler d'autres protéines telles que la chaperonne moléculaire HSP90 (Heat-Shock Protein 90kDA) (Kovacs et al., 2005) ou la protéine du cytosquelette cortactine (Zhang et al., 2007). HDAC6 régule aussi la dégradation de protéines mal conformées ou agrégées (Boyault et al., 2007).

2.3.2 Fonctions cellulaires régulées

HDAC6 a été impliquée dans la prolifération cellulaire *via* la régulation du cil primaire, une structure connue pour contrôler le cycle cellulaire. En effet, cette excroissance membranaire composée de microtubules est retrouvée à la surface de la plupart des cellules des vertébrés et est capable de « sentir » de nombreux signaux extracellulaires (Singla, 2006; Berbari et al., 2009). Par exemple, dans les cellules rétinienne, il peut agir en tant que photo-senseur, c'est un mécano-senseur dans les néphrons ou encore un senseur biochimique capable de détecter la présence de facteur de croissance. La présence de cette structure est couplée avec le cycle cellulaire puisqu'il n'est observé que lors des phases anti-prolifératives (Figure 2.5). En effet, le centrosome, qui est requis pour l'organisation du fuseau mitotique lors de la mitose, est séquestré dans le corps basal du cil. Ainsi, HDAC6 en déacétylant la tubuline réduit la stabilité des microtubules et induit la résorption du cil permettant ainsi la libération du centrosome et l'initiation de la division cellulaire (Forcioli-Conti et al., 2016;

Gradilone et al., 2013).

Les LT font partie des rares cellules à ne pas posséder de cil primaire. Néanmoins, la régulation de l'acétylation de la tubuline joue un rôle dans la physiologie des LT et le contrôle de la réponse immune. Lors de la formation de la synapse immunologique, HDAC6 se concentre rapidement à ce niveau et son déplacement est corrélé avec une déacétylation des microtubules. Il semblerait donc que HDAC6 puisse jouer un rôle dans le réarrangement de la membrane et du cytosquelette. Par ailleurs, les microtubules interviennent aussi sur l'activation puisque dans des cellules surexprimant HDAC6, la synthèse d'IL2 est altérée (Serrador et al., 2004). En effet, l'activité déacétylase de HDAC6 régule la localisation de certains facteurs cellulaires. En 2011, Ishiguro *et al.* démontrent l'implication de l'acétylation de l' α -tubuline dans l'inhibition de la translocation nucléaire de NFAT. Ce facteur de transcription, impliqué dans la modulation des réponses immunes et la production d'IL2, forme un complexe avec l' α -tubuline et l'importine β pour assurer sa translocation nucléaire. La déacétylation de l' α -tubuline par HDAC6 est nécessaire pour permettre la formation du complexe (Ishiguro et al., 2011).

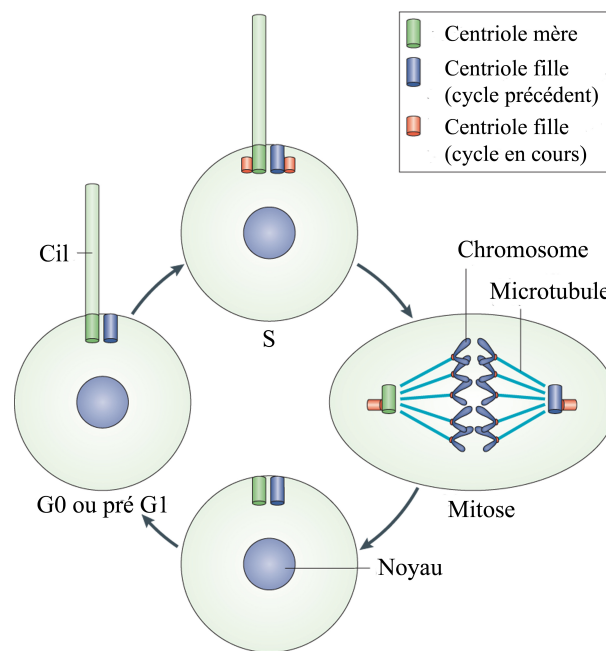


FIGURE 2.5 – Synchronisation de l'assemblage et du désassemblage du cil primaire avec le cycle cellulaire (D'après (Ishikawa and Marshall, 2011))

Au cours de la phase G_1 , le centriole mère se localise au cortex de la cellule et permet le développement d'un cil alors que le centriole fille associé (provenant du cycle précédent) ne forme pas de cil. Pendant la phase S, les centrioles mère et fille se dupliquent formant de nouveaux centrioles fille. Avant la mitose, le cil se résorbe permettant aux paires de centrioles de se détacher du cortex et de migrer aux pôles du fuseau. Ceci permet d'organiser et de positionner le fuseau mitotique. Le cil se reforme ensuite dans les deux cellules filles une fois ré-entrées en phase G_1 .

HDAC6 joue également un rôle dans l'infection des cellules par des virus comme par exemple par le VIH-1. La fixation de ce virus sur des LT provoque une hyper-acétylation de l' α -tubuline (Iyengar et al., 1998; Jernigan et al., 2000). Il semble que l'état d'acétylation de l' α -tubuline permette de contrôler la tension dynamique de la membrane plasmique et ainsi affecte le phénomène de fusion du VIH-1. L'activité catalytique de HDAC6 sur la tubuline freine donc l'infection virale en augmentant très fortement le contact entre l' α -tubuline et la membrane plasmique (Valenzuela-Fernandez, 2005).

HDAC6 est également impliquée dans la régulation de la survie des cellules *via* une interaction avec 14-3-3. Les dimères de 14-3-3 peuvent être acétylés au niveau de leur poche ce qui inhibe toute liaison. HDAC6 peut déacétyler ces sites et ainsi restaurer la liaison de 14-3-3 avec des protéines comme Bad et AS160 médiant une signalisation de croissance et de survie (Mortenson et al., 2015).

Bien que HDAC6 et la régulation de l'acétylation de l' α -tubuline influencent de nombreux processus cellulaires, les modèles de souris invalidées pour HDAC6 ne présentent pas de phénotype majeur. En effet, elles présentent une hyper-acétylation dans la plupart des tissus mais sont tout à fait viables et fertiles (Zhang et al., 2008). Au niveau comportemental, elles présentent une hyperactivité ainsi qu'une diminution de l'anxiété et une plus faible tendance à la dépression (Fukada et al., 2012). Au niveau du système immunitaire, le développement des lymphocytes est normal. Cependant, une légère diminution dans la production d'anticorps T dépendant est observée. La majeure différence observée concerne les LT régulateurs (LTreg) (de Zoeten et al., 2011). En effet, les LTreg invalidés pour HDAC6 contiennent des niveaux plus élevés des ARNm de FoxP3, CTLA-4, IL10 et GITR. Par rapport à des LTreg normaux, les LTreg des souris déficientes pour HDAC6 ont également une expression diminuée de CD44 et de CD62L et augmentée de CD103. De plus, l'acétylation de FoxP3 est favorisée et ils présentent une meilleure activité suppressive *in vitro*. Une étude récente a également démontré que HDAC6 contribue à la fonction cytotoxique des LT CD8⁺ (Núñez-Andrade et al., 2016). Les CTL issus de souris déficientes pour HDAC6 présentent un transport des granules lytiques altéré ainsi qu'une exocytose défectueuse. HDAC6 pourrait ainsi agir à différents niveaux dans le contrôle des voies de cytotoxicité des LT. L'ablation génétique de HDAC6 ne présente donc pas d'effet indésirable au moins dans un contexte non pathologique.

L'ensemble de ces résultats indiquent que HDAC6 n'est pas indispensable et que le niveau d'acétylation de la tubuline n'est pas critique pour le développement embryonnaire et l'homéostasie chez l'adulte.

2.4 La Rho-GTPase RhoA

Une autre voie de transduction du signal très importante pour la physiologie des LT met en jeu de petites protéines G. Ces protéines, suite à l'activation d'un récepteur transmembranaire, utilisent l'échange de GDP en GTP comme interrupteur moléculaire pour déclencher ou inhiber des cascades de signalisation.

2.4.1 Fonctionnement général

La famille des Rho-GTPases appartient à la super famille des Ras GTPases mais en diffère par un domaine Rho spécifique. Les trois principaux membres des Rho-GTPases sont Rac-1, RhoA et Cdc42 qui sont des régulateurs clés de nombreux processus fondamentaux des LT. Ainsi, Cdc42 est impliquée dans des mécanismes contrôlant entre autres la morphologie cellulaire et la formation de filopodes. Rac-1 est nécessaire dans les mécanismes de réorganisation du cytosquelette, notamment dans la dynamique du réseau d'actine. RhoA participe, par exemple, à la régulation des phénomènes de polarisation, d'adhérence, de mobilité et de migration des LT. Les Rho-GTPases peuvent participer à de nombreuses autres voies de signalisation en plus de celles liées au cytosquelette d'actine. Ainsi, elles interviennent également dans la régulation de la polarité cellulaire, de la transcription des gènes, de la progression du cycle cellulaire, de la dynamique des microtubules, des voies de transport des vésicules, et d'une large palette d'activités enzymatiques (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Les Rho-GTPases existent sous deux formes membranaires, l'une inactive liée au GDP et l'autre active liée au GTP. La transition entre ces deux formes se fait par l'intermédiaire d'enzymes : d'une part les GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui favorisent le remplacement du GDP par le GTP et d'autre part les GAP (GTPase Activating Protein) qui facilitent l'hydrolyse du GTP en GDP par la GTPase. Les Rho-GTPases peuvent également être séquestrées dans le cytoplasme des cellules par des GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor) qui bloquent leur activité intrinsèque de GTPase. Les voies de signalisation contrôlées par les Rho-GTPases impliquent de nombreuses protéines effectrices dont certaines sont exprimées exclusivement dans les cellules hématopoïétiques (Cantrell, 2003).

Un certain nombre de modifications post-traductionnelles peuvent également permettre de moduler la localisation des Rho-GTPases. La phosphorylation de la sérine 188 de RhoA a, par exemple, une fonction inhibitrice en favorisant la liaison de RhoA aux GDI résultant en une séquestration de RhoA dans le cytoplasme. Cette modification permet également de protéger RhoA d'une dégradation par le protéasome (Lang et al., 1996; Rolli-Derkinderen et al., 2005; Tkachenko et al., 2011). Une ubiquitination des Rho-GTPases va quant à elle induire leur dégradation (de la Vega et al., 2011). Ce mécanisme est impliqué

dans la dégradation locale de RhoA au lamellipode et dans les zones protrusives permettant un maintien de la polarité de la cellule.

2.4.2 Fonctions cellulaires régulées

La Rho-GTPase RhoA est impliquée dans le phénomène de cytokinèse. A l'anaphase, le fuseau dicte le site d'assemblage de l'anneau contractile nécessaire à la division des cellules. L'assemblage et la contraction de cet anneau implique l'activation de la myosine II et la polymérisation de l'actine, qui sont déclenchées par la GTPase RhoA (Yüce et al., 2005).

De part leurs fonctions de remodelage du cytosquelette et de molécule de signalisation, les Rho-GTPases régulent des processus importants au niveau du système immunitaire (Figure 2.6). Les Rho-GTPases ont un rôle prépondérant dans le développement des thymocytes. Ce rôle a d'abord été suggéré avec l'étude de souris déficientes pour la GEF Vav1 (Crespo et al., 1997). Dans ces souris, le développement des LT est partiellement bloqué au checkpoint du pré-TCR et fortement bloqué aux niveaux des sélections négative et positive (Fischer et al., 1995; Tarakhovsky et al., 1995; Turner et al., 1997; Zhang et al., 1995). Ces mécanismes sont dépendants de l'activité GEF de Vav1 (Saveliev et al., 2009). La plupart des informations concernant le rôle des Rho-GTPases dans les LT provient de l'étude de souris transgéniques exprimant la transférase C3 de *Clostridium botulinum* dans le lignage T. C3 est une toxine qui inactive les fonctions de RhoA par ADP-ribosylation au niveau de son domaine effecteur. Ainsi ces souris présentent un thymus plus petit et une sévère diminution de la cellularité au niveau du thymus avec un défaut de production des T α/β et γ/δ résultant d'un défaut de maturation, de prolifération et de survie au cours du développement des LT. Des sections histologiques montrent une morphologie anormale du thymus avec une jonction cortico-médullaire indistincte. Les organes lymphoïdes périphériques secondaires comme la rate ou les ganglions lymphatiques ne présentent pas de modification dans leur taille. Cependant la cellularité est fortement réduite (Galandrini et al., 1997; Henning et al., 1997).

L'une des caractéristiques particulière des LT est leur capacité de migration. La migration des LT dans les ganglions lymphatiques implique de traverser l'endothélium vasculaire. Ce processus complexe suit une séquence d'événements très régulés : la phase de rolling, l'activation des intégrines, l'adhésion et enfin l'extravasation. L'ensemble de ces événements sont contrôlés par des récepteurs activant des Rho-GTPases qui régulent de nombreuses molécules impliquées dans le réarrangement du cytosquelette (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Jaffe and Hall, 2005). Afin de pouvoir migrer les LT doivent acquérir une morphologie polarisée composée à l'avant d'un lamellipode riche en actine et en Rac1 et Cdc42 et à l'arrière d'un uropode riche en RhoA (Sanchez-Madrid, 1999; Ratner et al., 1997; Krummel and Macara, 2006). RhoA joue un rôle important dans la

transduction du signal issu des récepteurs chimiokines pour réguler le homing des LT (Giagulli et al., 2004).

Une fois dans les ganglions lymphatiques, les LT qui rencontrent leur Ag spécifique entrent en interaction étroite avec l'APC. La formation de la synapse immunologique cause une réorganisation du cytosquelette d'actine/myosine et des microtubules permettant un regroupement des molécules nécessaires à la signalisation T. Les Rho-GTPases se retrouvent alors localisées à la synapse immunologique (Singleton et al., 2009).

Les Rho-GTPases orchestrent donc les changements du cytosquelette et les voies biochimiques menant à la polarisation des LT et jouent un rôle clé dans leur activation.

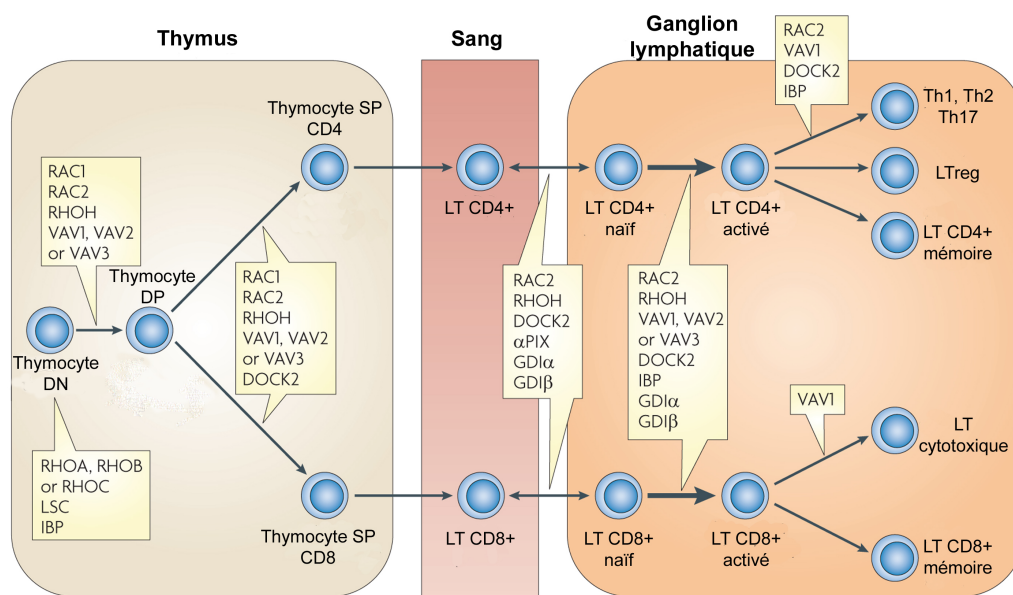


FIGURE 2.6 – Rôle des Rho-GTPases et de leurs régulateurs dans le développement et la fonction des LT (D'après (Tybulewicz and Henderson, 2009))

Les Rho-GTPases interviennent à différentes étapes clés tout au long du développement des LT.

Chapitre 3

Présentation du projet

Les facteurs de transcription FoxO, exprimés dans différents types cellulaires, induisent un transcriptome dépendant du contexte cellulaire. Ainsi, afin d'étudier les cibles transcriptionnelles de FoxO1 dans les LT, le laboratoire a réalisé une expérience de puce à ADN dans une lignée T, les cellules Jurkat. Ces cellules, issues d'une lignée T CD4⁺ leucémique, ont la particularité d'avoir une voie PI3K/Akt constitutivement active car la lipide phosphatase PTEN (Phosphatase and TENsin homolog mutated in multiple advanced cancers 1) est absente. L'activation permanente de la sérine/thréonine kinase Akt qui en résulte implique donc une exclusion nucléaire de FoxO1 et donc sa dégradation. L'expression par infection rétrovirale d'une forme de FoxO1 mutée au niveau des trois résidus normalement phosphorylés par Akt (FoxO1-TM), donc constitutivement active, permet la restauration de l'activité transcriptionnelle de FoxO1. Les puces ont donc été réalisées par comparaison du transcriptome induit par l'infection d'un vecteur lentiviral codant la GFP ou le mutant constitutivement actif de FoxO1, FoxO1-TM. Étonnament, les cibles classiques de FoxO1 ne sont que modérément induites dans les cellules Jurkat. Cette étude a permis de mettre en évidence un ensemble de gènes impliqués dans la migration des cellules comme *cd62l*, *edg1* et *edg6* mais également d'identifier une nouvelle cible transcriptionnelle de FoxO1, le gène *fam65b*, comme l'un des plus fortement activé par FoxO1 (Fabre et al., 2008). En effet, les transcrits codant Fam65b sont augmentés 13 fois dans les cellules Jurkat exprimant la forme active de FoxO1. Ils correspondent donc aux transcrits les plus fortement régulés par FoxO1 dans ce contexte. Cette nouvelle cible semblait d'autant plus intéressante qu'elle avait également été identifiée au laboratoire dans un crible double-hybride employant la Rho GTPase RhoA comme appât, mettant en évidence un lien inattendu et nouveau entre la voie PI3K/Akt et celle des Rho GTPases.

Peu de travaux ont été consacrés à Fam65b. Ce gène code deux isoformes (1 et 2) de 1068 et 591 acides aminés respectivement, résultant d'un épissage alternatif (Figure 3.1).

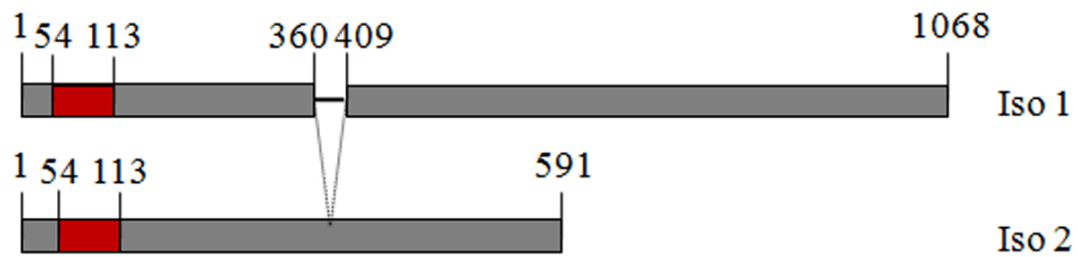


FIGURE 3.1 – Représentation schématique des différentes isoformes de la protéine Fam65b

Le domaine de liaison à RhoA représenté en rouge.

Ces deux isoformes sont préférentiellement exprimées dans les tissus lymphoïdes et de façon plus restreinte dans le rein, les glandes surrénales, le cerveau et l'endomètre.

Des données fonctionnelles disponibles dans la littérature sur la protéine Fam65b montrent son implication dans des modifications morphologiques observées au cours du développement placentaire et musculaire (Yoon et al., 2007). En effet, lors de la différenciation myoblastique fœtale chez l'homme, l'expression de Fam65b est augmentée et cette protéine induit la formation de filopodes, cette fonction étant assurée par un domaine situé entre les acides aminés 55 et 113. Ces résultats ont été confirmés dans des cellules musculaires de caille où Fam65b induit la formation de myotubes (Hirayama and Kim, 2008). Fam65b a également été impliquée dans la différenciation cytotrophoblastique caractérisée par la formation de syncytia durant laquelle son expression est nettement augmentée (Dakour et al., 1997). De plus, Fam65b a également été identifiée comme marqueur dans une sous-population de cellules cancéreuses prostatiques PC3 ayant des caractéristiques de cellules souches (Zhang and Waxman, 2010). Ainsi l'expression de Fam65b est très forte dans ces cellules mais diminue drastiquement dès lors que la tumeur commence à pousser suggérant un rôle de Fam65b dans la différenciation cellulaire et la régulation du cycle cellulaire. Une autre étude, publiée en 2012, a identifié *fam65b* comme un gène répondant aux radiations impliqué dans la régulation de la mort cellulaire (Smirnov et al., 2012). Ainsi, des expériences d'ARN interférence dirigées entre autres contre Fam65b dans des lymphocytes B humains et des cellules cancéreuses ont montré une augmentation de la sensibilité des cellules à la mort induite par radiation.

Plus récemment, plusieurs études menées dans différents modèles cellulaires ont confirmé l'implication de Fam65b dans des modifications du cytosquelette. L'équipe d'E. Gussoni a mis en évidence dans des cellules myogéniques humaines fœtales, une interaction de Fam65b avec l'histone déacétylase HDAC6. Ainsi, lors

de la différenciation de ces cellules, Fam65b inhibe l'activité de HDAC6 entraînant une augmentation de l'acétylation de la tubuline ce qui augmente la stabilité des microtubules (Balasubramanian et al., 2014).

Des travaux récents ont également décrit une délétion dans la partie N-ter de Fam65b (3^{ième} exon - acide aminé 34 à 86) associée à une surdité congénitale chez des familles de patients, liée à des anomalies des cellules ciliées au niveau de l'oreille interne (Diaz-Horta et al., 2014). Ces résultats sont complétés par une étude très récente reposant sur l'analyse d'un modèle murin dans lequel les exons 2 à 14 du gène *fam65b* sont remplacés par LacZ (Zhao et al., 2016). Dans ce modèle, les oligomères de Fam65b forment un anneau à la base du cil. Cette structure est nécessaire avec la taperine pour permettre une mécanotransduction efficace. De plus, l'oligomérisation de Fam65b est régulée par sa liaison avec RhoC.

Comme Fam65b ne semble pas doué de propriétés enzymatiques intrinsèques, sa fonction pourrait impliquer des interactions protéines/protéines. Une recherche systématique des interactants de Fam65b par double-hybride, réalisée au laboratoire, a par ailleurs permis de mettre en évidence une interaction entre Fam65b et RhoA. Des expériences de « pull-down » ont permis de valider cette interaction et de montrer d'autre part que Fam65b se lie à la fois aux formes active (liée au GTP) et inactive (liée au GDP) de RhoA *via* une séquence comprise entre les acides aminés 55 et 113. Parallèlement, des expériences réalisées à la fois *in vitro* et *in vivo* ont montré que Fam65b inhibe les processus d'adhérence, de polarisation et de migration des LT en réponse aux chimiokines, notamment CCL19 et que cela résultait d'une inhibition de l'activation de RhoA (Rougerie et al., 2013). Cette fonction a également été observée par un autre groupe dans les neutrophiles (Gao et al., 2015).

Parallèlement à cette étude, l'analyse des données regroupées sur GEOProfiles¹ a permis de visualiser les modifications de l'expression de Fam65b au cours de la réponse immunitaire. Ainsi le niveau d'expression de Fam65b est élevé dans les LT naïfs mais totalement inhibé lors de la phase d'expansion consécutive à une stimulation antigénique. Dans les LT mémoires pourtant quiescents le niveau de Fam65b est très inférieur à celui des LT naïfs. De façon plus fine, ces expériences montrent qu'au sein même du groupe mémoire, cette protéine est plus exprimée dans les LT mémoires centraux que dans les LT mémoires effecteurs. La capacité de réponse des LT à une stimulation antigénique semble donc être corrélée au niveau d'expression de Fam65b.

Les premiers travaux sur Fam65b réalisés par le laboratoire ayant permis de démontrer son rôle sur la mobilité des LT, j'ai dans un premier temps étudié le rôle de Fam65b dans la prolifération. Dans un second temps, j'ai initié la caractérisation d'un modèle murin déficient pour Fam65b dans le lignage T.

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/?term=Fam65b>

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 4

Fam65b inhibe la prolifération cellulaire *in vitro*

4.1 Fam65b inhibe la prolifération des cellules leucémiques T humaines

Fam65b a été identifié comme une cible transcriptionnelle de FoxO1 dans les cellules Jurkat. Dans ce modèle, les résultats obtenus au laboratoire montrent que FoxO1 induit un arrêt de la prolifération. Nous nous sommes demandé quel était le rôle de Fam65b dans ce processus.

Nous avons tout d'abord utilisé un modèle de lignée cellulaire, les cellules Jurkat. Ces cellules sont issues d'une lignée T CD4⁺ leucémique dont la phosphatase PTEN (Phosphatase and TENsin homolog mutated in multiple advanced cancers 1) est inactive. L'activation permanente de la sérine/thréonine kinase Akt qui en résulte conduit à l'exclusion nucléaire et donc à la dégradation du facteur de transcription FoxO1. Cette lignée cellulaire n'exprime donc pas Fam65b.

Afin d'étudier l'effet de la réexpression de Fam65b sur la croissance des cellules Jurkat, nous avons suivi la prolifération de cellules Jurkat transfectées avec un vecteur contrôle permettant l'expression de la GFP ou de l'isoforme 2 de Fam65b fusionnée à la GFP. La prolifération des cellules GFP⁺ est mesurée en comptant tous les jours le nombre total de cellules vivantes et en quantifiant le pourcentage de cellules GFP⁺ par cytométrie en flux. Contrairement aux cellules contrôles, les cellules exprimant Fam65b ne prolifèrent plus (Figure 4.1 A). De plus, une analyse du cycle cellulaire indique une accumulation significative en phase G₂/M des cellules exprimant Fam65b après trois jours de culture (Figure 4.1 B et C). Ce blocage du cycle cellulaire induit une mort des cellules (Figure 4.1 D).

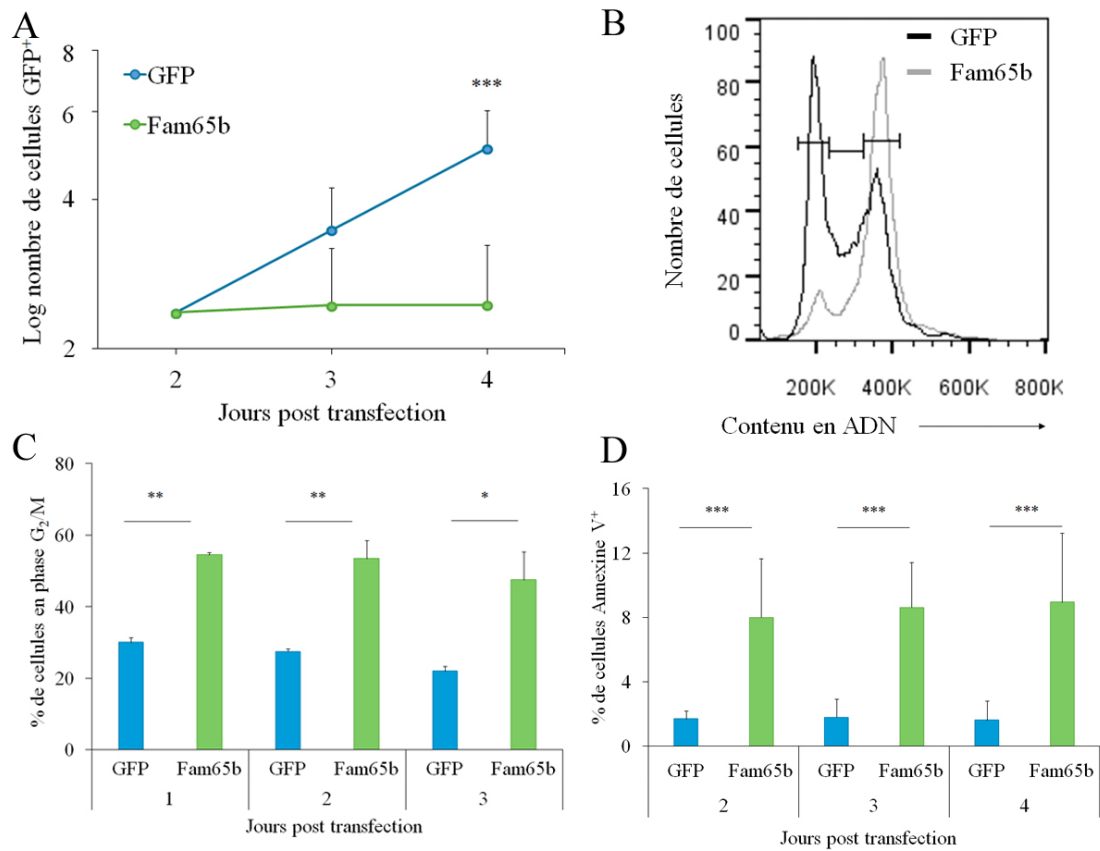


FIGURE 4.1 – L'expression de Fam65b inhibe la prolifération en perturbant la mitose (A) Mesure de la prolifération de cellules Jurkat transfectées avec des vecteurs d'expression de la GFP ou de Fam65b-GFP. (B) Profil de cycle cellulaire déterminé par cytométrie en flux trois jours après transfection. (C) Quantification de la proportion de cellules Jurkat transfectées en phase G₂/M mesurée par cytométrie en flux. (D) Mesure de la proportion de cellules Jurkat transfectées marquées avec l'Annexine V par cytométrie en flux. Résultats représentant des moyennes $\pm$ SD d'au moins trois expériences indépendantes. Stat : t test paillé bilatéral.

4.2 Fam65b altère la formation du fuseau mitotique

Pour aller plus loin dans notre analyse du mécanisme de blocage du cycle cellulaire induit par Fam65b, nous avons utilisé un modèle de lignée cellulaire adhérente, les cellules HeLa.

Dans cette lignée cellulaire non lymphoïde qui n'exprime pas Fam65b, nous avons tout d'abord vérifié que nous retrouvions bien le blocage en phase G₂/M observé précédemment. Ainsi, 55% des cellules HeLa transfectées avec Fam65b sont

en phase G₂/M contre 29% des cellules contrôle GFP (Figure 4.2). Ce phénomène n'est donc pas restreint aux LT.

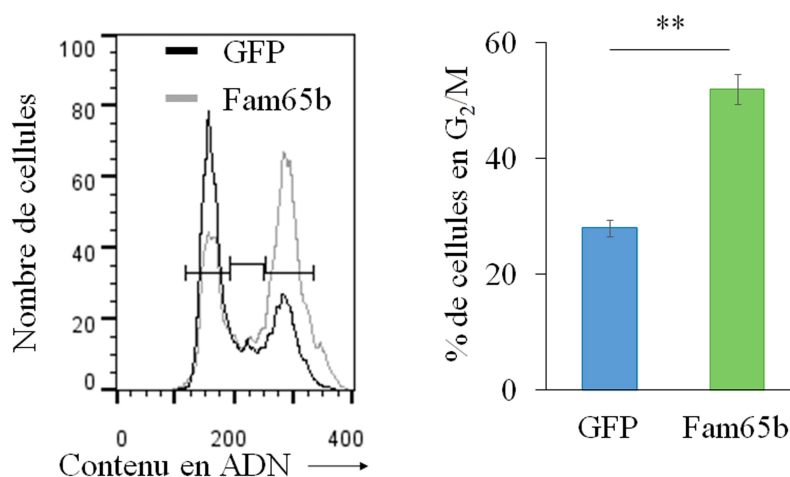


FIGURE 4.2 – Le blocage du cycle cellulaire induit par Fam65b n'est pas restreint aux lymphocytes

Profil de cycle cellulaire de cellules HeLa déterminé par cytométrie en flux trois jours après transfection. Résultats représentatifs de trois expériences indépendantes. Stat : t test pairé bilatéral.

Afin de pouvoir suivre en détail les différentes étapes du processus mitotique, nous avons co-transfecté des cellules HeLa avec des vecteurs permettant l'expression de la GFP comme contrôle ou de Fam65b-GFP ainsi que de l'histone H2B-mCherry.

Nous avons ensuite suivi par vidéomicroscopie la dynamique de réorganisation de l'ADN durant la mitose. Alors que les cellules contrôle se divisent rapidement (43min), le temps nécessaire pour la division des cellules exprimant Fam65b est environ deux fois plus long (94min) (Figure 4.3 A). D'autre part, dans les cellules GFP⁺ les chromosomes s'alignent parfaitement sur la plaque métaphasique alors que dans les cellules Fam65b⁺ on observe une mauvaise condensation de la chromatine et une incapacité d'alignement des chromosomes menant à des divisions anormales avec des chromatides non alignées (Figure 4.3 B et C).

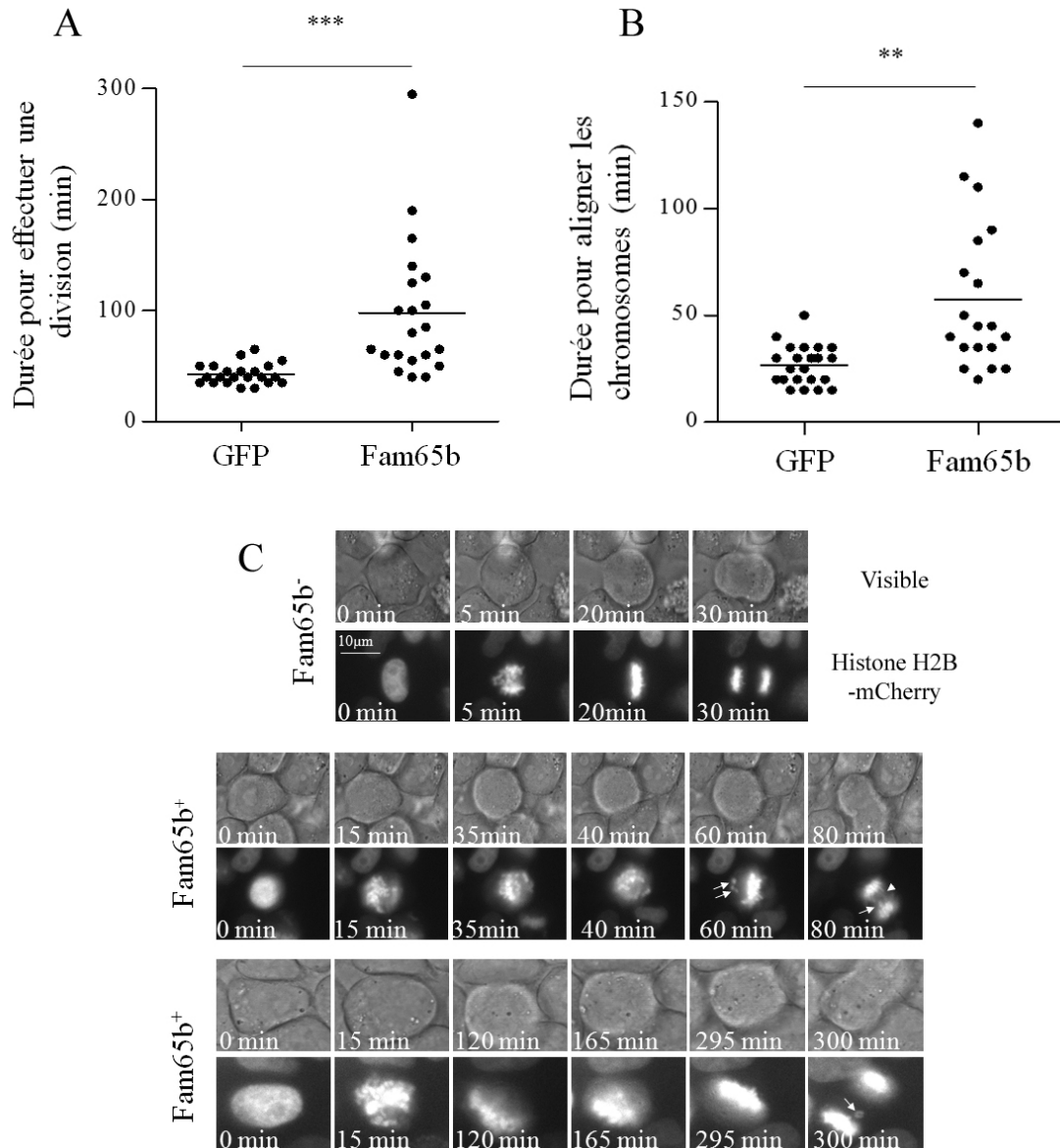


FIGURE 4.3 – L'expression de *Fam65b* dans des cellules en division perturbe les étapes de la mitose

(A et C) Evaluation par vidéomicroscopie du temps nécessaire aux cellules HeLa co-transfectées avec les vecteurs d'expression de l'histone H2B-mCherry et de la GFP (n=22) ou de *Fam65b*-GFP (n=27) pour se diviser. (B) Mesure par vidéomicroscopie du temps nécessaire aux cellules HeLa co-tansfectées pour l'alignement des chromosomes. (C) Images représentatives obtenues à partir des films réalisés sur les HeLa transfectées. Stat : t test non païré bilatéral.

Fam65b a déjà été impliquée dans la régulation de l'élongation des microtubules. Or le mouvement des chromosomes est dû à un complexe macromoléculaire, le fuseau mitotique, composé de trois principaux acteurs : les centrosomes, les microtubules constitués d' α -tubuline et les chromosomes. C'est pourquoi nous avons suivi la formation du fuseau mitotique au cours de la division de cellules HeLa co-transfectées par des vecteurs codant la mCherry seule ou Fam65b et l' α -tubuline-GFP par vidéomicroscopie. Nous avons observé que, contrairement aux cellules contrôle, les cellules exprimant Fam65b présentent un réseau de tubuline désordonné et une absence de formation claire du fuseau mitotique. Ainsi, l'expression forcée de Fam65b au moment de la division des cellules empêche la bonne formation du fuseau mitotique induisant un blocage de la mitose (Figure 4.4).

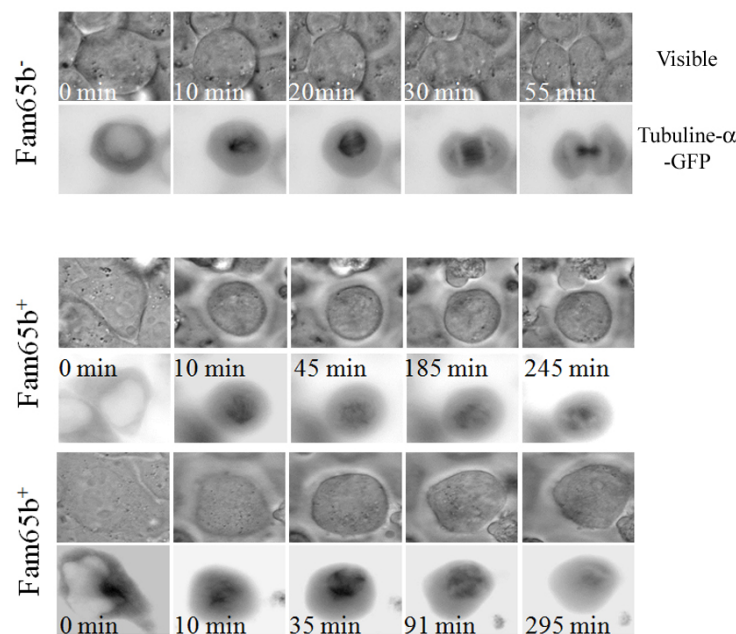


FIGURE 4.4 – L'expression de Fam65b déstabilise la formation du fuseau mitotique
 Evaluation par vidéomicroscopie de la capacité des cellules HeLa co-transfectées avec des vecteurs d'expression de l' α -tubuline-GFP et de mCherry (n=14) ou Fam65b-mCherry (n=20) à former un fuseau mitotique. Images représentatives obtenues à partir des films réalisés sur les HeLa transfectées.

4.3 Le complexe Fam65b-HDAC6-14-3-3 induit l'arrêt de la prolifération

Fam65b étant dépourvu de fonction enzymatique intrinsèque, sa fonction inhibitrice du cycle cellulaire pourrait être médiée par des interactions

protéine-protéine. Afin de mieux étudier le mécanisme moléculaire mis en jeu, nous avons étudié l'implication des partenaires connus de Fam65b dans l'arrêt de la prolifération.

4.3.1 L'inhibition de la prolifération est indépendante de RhoA

Il a précédemment été montré au laboratoire que Fam65b inhibe par sa liaison l'activité de RhoA, une petite protéine G impliquée dans la cytokinèse. Aussi notre première hypothèse fut que cette interaction pouvait être responsable de l'effet anti-prolifératif de Fam65b.

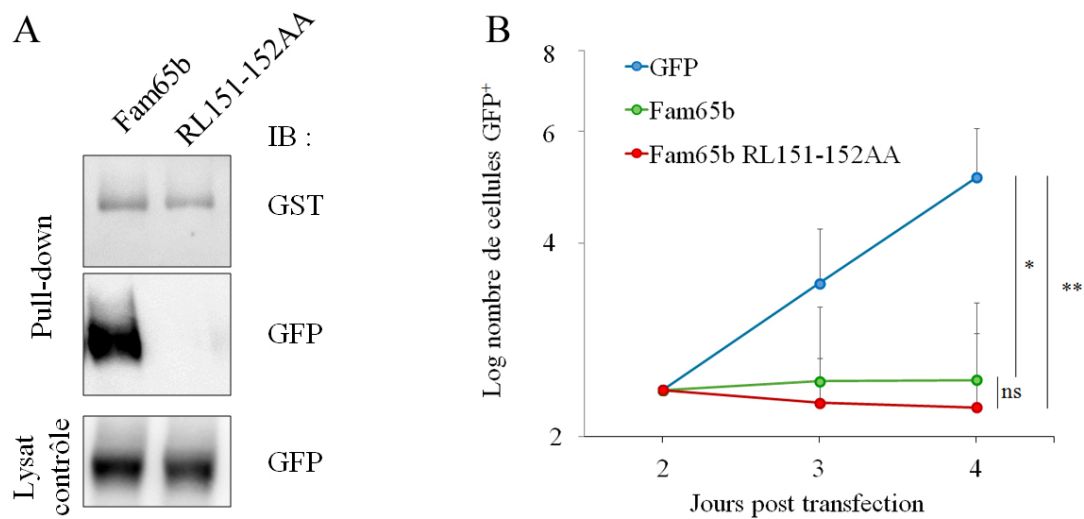


FIGURE 4.5 – L'effet anti-prolifératif de Fam65b n'est pas dû à son inhibition de l'activité de RhoA

(A) Détermination de la capacité de liaison de Fam65b et du mutant Fam65b RL151-152AA à RhoA dans des 293T par Pull down. (B) Mesure de la prolifération de cellules Jurkat transfectées avec des vecteurs d'expression de la GFP, de Fam65b-GFP ou de Fam65b RL151-152AA-GFP. Résultats représentant des moyennes $\pm$ SD d'au moins trois expériences indépendantes. Stat : t test pairé bilatéral.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé un mutant de Fam65b dans lequel l'arginine 151 et la leucine 152 sont mutées en alanines (Fam65b RL151-152AA). Ce mutant possède la particularité de ne plus lier RhoA (Figure 4.5 A). Nous avons donc suivi la prolifération de cellules Jurkat transfectées avec un vecteur contrôle permettant l'expression de la GFP, de Fam65b WT-GFP ou de Fam65b RL151-152AA-GFP. Comme précédemment, la prolifération des cellules GFP⁺ est mesurée en comptant tous les jours le nombre total de cellules vivantes et en quantifiant le pourcentage de cellules GFP⁺ par cytométrie en flux. Tout comme la forme WT de Fam65b, le mutant Fam65b RL151-152AA inhibe

la prolifération des cellules Jurkat, ce qui indique que l'activité anti-proliférative de Fam65b n'est pas due à son inhibition de l'activité de RhoA (Figure 4.5 B).

4.3.2 L'inhibition de la prolifération nécessite la phosphorylation de Fam65b

Une recherche systématique des interactants de Fam65b par un crible double-hybride réalisé dans le laboratoire avait permis de mettre en évidence une interaction non seulement avec RhoA mais également avec 14-3-3, ici nommée YWHAZ (Figure 4.6). Cependant, 14-3-3 est une famille de protéines impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la progression du cycle cellulaire et capable de se lier à de très nombreuses cibles. Ceci pose donc la question de la spécificité de l'interaction détectée par ce crible double-hybride.

Protein	Accession	Species	Score	Interaction	Score	Score	Score
pB29_A-148	5p/3p	Homo sapiens - YWHAZ var2	-61..690	IF		95.3	94.5
pB29_A-6	5p/3p	Homo sapiens - YWHAZ var2	-35..745	* X IF		99.6	99.3
pB29_A-154	5p/3p	Homo sapiens - YWHAZ var2	-35..745	* X IF		95.2	96.0
pB29_A-322	5p/3p	Homo sapiens - YWHAZ var2	-35..745	* X IF		94.6	97.2
Homo sapiens - YWHAZ var2			99.7			99.7	N/A

FIGURE 4.6 – Résultats du crible double hybride montrant une interaction entre Fam65b et 14-3-3

Pour confirmer les résultats obtenus, nous avons effectué une recherche *in silico* des molécules interagissant avec Fam65b. A partir de la base de données Uniprot nous avons découvert huit interactions possibles¹ (Figure 4.7).

1. Données obtenues *via* :
http://www.ebi.ac.uk/intact/pages/interactions/interactions.xhtml?query=Q9Y4F9*

#	Molecule 'A'	Links 'A'	Molecule 'B'	Links 'B'	Species 'A'	Species 'B'	Publication Identifier	Interaction Type	Interaction Detection Method	Interaction AC	Confidence Value
1	FAM65B PRIPY	 	rhlL PRBA	 	9606	632	20711500 imexIM-13779	physical association	two hybrid pooling approach	EBI-2870098 imexIM-13779-7652	author-score:1 intact-miscore:0.37
2	FAM65B PRUN	 	RHOA PRUN	 	9606	9606	imexIM-15364 21988832	physical association	two hybrid	EBI-3927020 imexIM-15364-1914	intact-miscore:0.37
3	FAM65B PRPY	 	WNK1 PRBA	 	9606	9606	20936779	physical association	two hybrid pooling approach	EBI-3453652	author-score:Core intact-miscore:0.37
4	FAM65B PRPY	 	GBA4_5317 PRBA	 	9606	1392	20711500 imexIM-13779	physical association	two hybrid pooling approach	EBI-2811901 imexIM-13779-1574	author-score:4 intact-miscore:0.37
5	FAM65B PRPY	 	foiC PRBA	 	9606	177416	20711500 imexIM-13779	physical association	two hybrid pooling approach	EBI-2798952 imexIM-13779-265	author-score:2 intact-miscore:0.37
6	FAM65B PRUN	 	MAP2K2 PRUN	 	9606	9606	imexIM-15364 21988832	physical association	two hybrid	EBI-3933239 imexIM-15364-2513	intact-miscore:0.37
7	FAM65B PRUN	 	PER1 PRUN	 	9606	9606	imexIM-15364 21988832	physical association	two hybrid	EBI-3932925 imexIM-15364-2482	intact-miscore:0.37
8	FAM65B PRPY	 	YWHAG PRBA	 	9606	9606	20936779	physical association	two hybrid pooling approach	EBI-3453100	author-score:Core intact-miscore:0.37

FIGURE 4.7 – Liste des protéines interagissant avec Fam65b

Parmi les protéines détectées, on retrouve également 14-3-3. Or cette interaction a été mise en évidence par un crible double-hybride utilisant comme appât 14-3-3 γ . Cette expérience est donc le miroir de celle réalisée précédemment et permet d'étayer la spécificité de l'interaction observée.

14-3-3 est une famille de protéines qui se lie à leur cible principalement si ces dernières possèdent des sérines ou des thréonines phosphorylées au niveau de sites spécifiques. La recherche dans les banques de données nous a confirmé que Fam65b possédait de tels motifs contenant des sérines et des thréonines phosphorylables. En effet, deux articles (Mayya et al., 2009; Navarro et al., 2011) montrent que Fam65b contient effectivement les motifs GIIRS*QSFAGFSG et ITKQLVKRLTS*AEVPMATDRL dont les sérines situées en position 21 et en position 573 (repérées par un *) peuvent être phosphorylées. De plus, une publication récente montre que Fam65b peut être phosphorylée dans les neutrophiles. Nous avons donc commencé par évaluer l'état de phosphorylation de Fam65b dans les cellules Jurkat transfectées par western blot en traitant les lysats cellulaires avec de la phosphatase λ .

Nous avons alors observé une diminution du poids moléculaire apparent de Fam65b après traitement suggérant que la protéine est phosphorylée dans les cellules Jurkat (Figure 4.8).

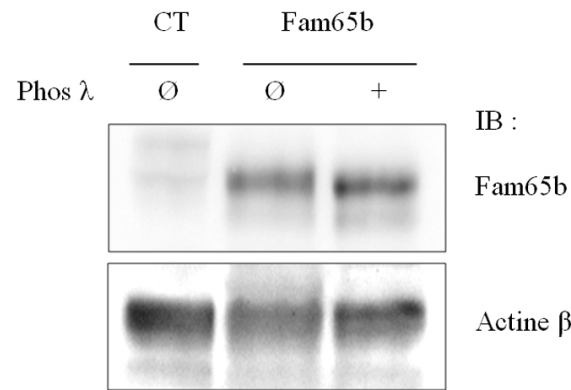


FIGURE 4.8 – **Fam65b est phosphorylée dans les cellules Jurkat transfectées**

Les lysats de cellules Jurkat transfectées avec un vecteur codant la GFP ou Fam65b-GFP ont été traités avec de la phosphatase λ et analysés par western blot

4.3.3 L'inhibition de la prolifération est médiée par l'interaction de Fam65b et 14-3-3

Un mutant non phosphorylable de Fam65b dans lequel 5 résidus sérine (positions 21, 37, 341, 523, 535) ont été mutés en alanine a été précédemment décrit (Fam65b S(x5)A) pour avoir perdu sa capacité à lier 14-3-3 (Figure 4.9 A). Nous avons donc testé si ce mutant a un effet anti-prolifératif et observé que Fam65bS(x5)A a perdu sa capacité à inhiber la prolifération des cellules Jurkat (Figure 4.9 B).

Ainsi, la phosphorylation de Fam65b est nécessaire pour induire son activité anti-proliférative et suggère donc un rôle de la formation du complexe Fam65b/14-3-3 dans le rôle anti-prolifératif de Fam65b.

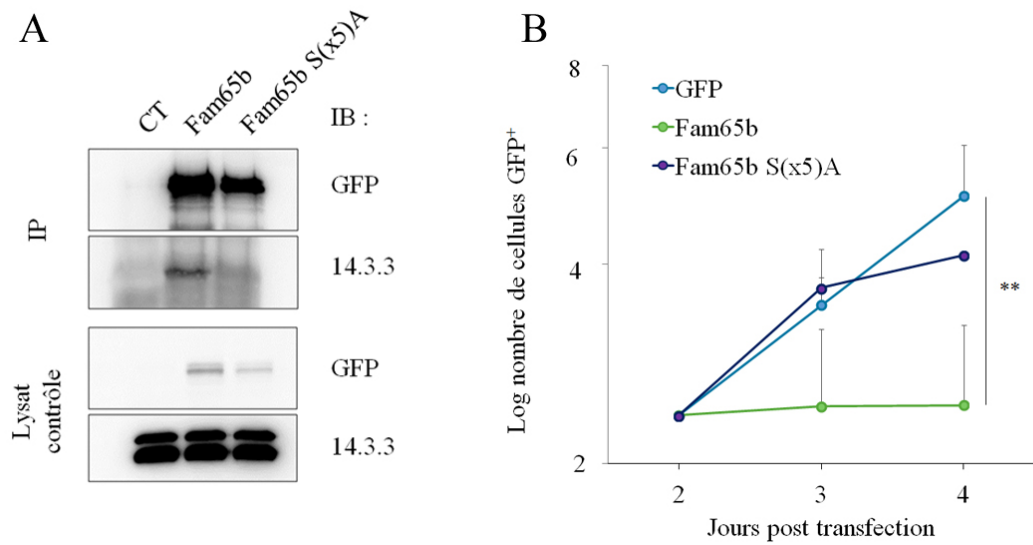


FIGURE 4.9 – L’effet anti-prolifératif de Fam65b est induit par son interaction avec 14-3-3

(A) Détermination de la capacité de liaison de Fam65b et du mutant Fam65bS(x5)A à 14-3-3 dans des 293T transfectées par immunoprécipitation. (B) Mesure de la prolifération de cellules Jurkat transfectées avec des vecteurs d’expression de la GFP, de Fam65b-GFP ou de Fam65bS(x5)A-GFP. Résultats représentant des moyennes $\pm$ SD d’au moins trois expériences indépendantes. Stat : t test païré bilatéral.

4.3.4 L’inhibition de HDAC6 induit un arrêt de la prolifération

De précédents travaux ont montré que 14-3-3 interagit avec une histone déacétylase particulière puisque cytoplasmique HDAC6 (classe II) dont la cible principale est la tubuline. L’inhibition de l’activité de HDAC6 conduit à un arrêt de la prolifération, ce que nous avons vérifié par l’utilisation d’un inhibiteur pharmacologique de HDAC6 (Figure 4.10).

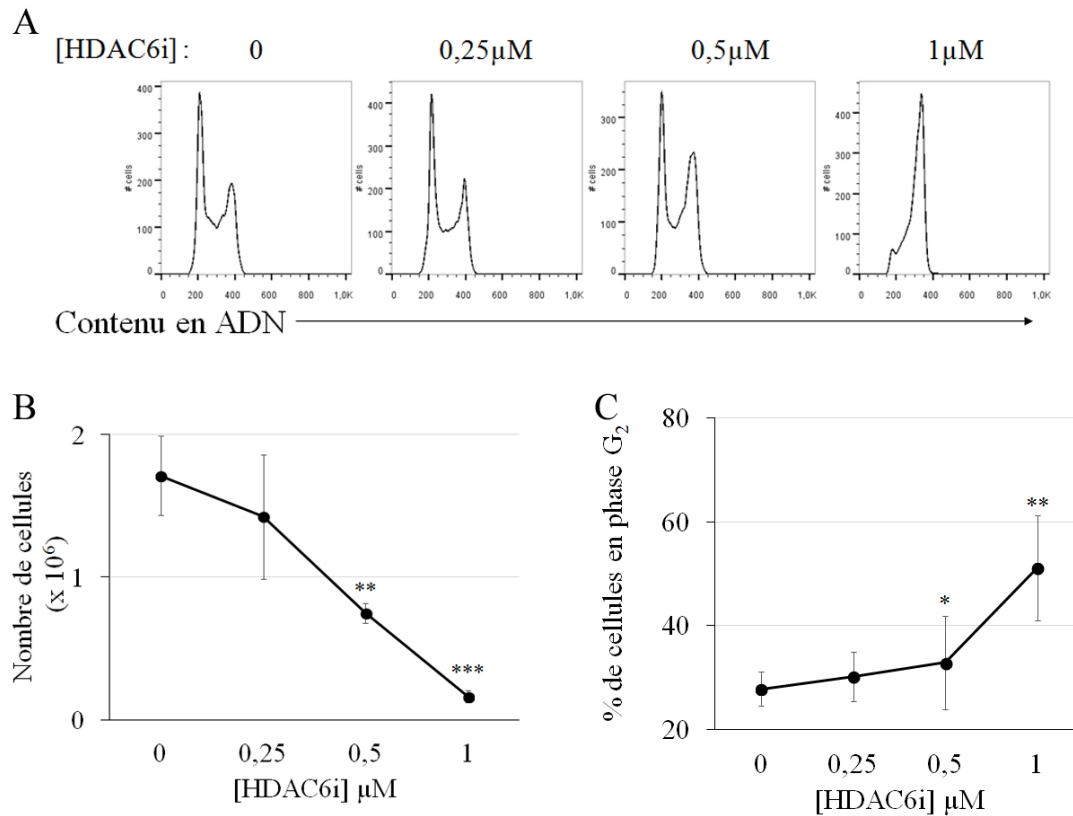


FIGURE 4.10 – L'inhibition de HDAC6 bloque la progression du cycle cellulaire en phase G₂/M

(A) Profils de cycle cellulaire de cellules Jurkat traitées avec une dose croissante d'inhibiteur de HDAC6 déterminés par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de trois expériences indépendantes. (B et C) Représentation de la prolifération des cellules traitées et de la proportion de cellules en phase G₂/M (respectivement) en fonction du traitement. Stat : t test païré bilatéral

4.3.5 L'effet anti-prolifération de Fam65b passe par l'inhibition de HDAC6

Fam65b est capable d'inhiber l'activité déacétylase de HDAC6. En effet, nous avons pu observer par cytométrie en flux dans des cellules Jurkat transfectées avec un vecteur codant la GFP ou Fam65b-GFP qu'il y a plus de tubuline acétylée lorsque Fam65b est exprimée (Figure 4.11 A). L'effet anti-prolifératif de Fam65b pourrait donc être médié par l'inhibition de l'activité de HDAC6 *via* son interaction avec 14-3-3.

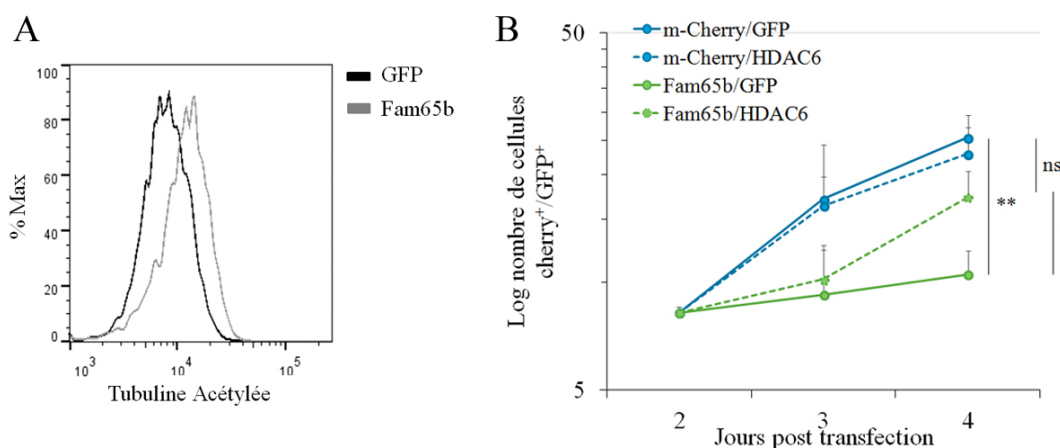


FIGURE 4.11 – **L’inhibition de l’activité déacétylase de HDAC6 par Fam65b est nécessaire à son effet anti-prolifératif**

(A) Mesure par cytométrie en flux dans des cellules Jurkat transfectées avec un vecteur codant la GFP ou Fam65b-GFP du niveau de tubuline acétylée un jour après transfection. (B) Mesure de la prolifération de cellules Jurkat co-transfectées avec des vecteurs codant mCherry ou Fam65b-mCherry et GFP ou HDAC6-GFP. Résultats représentant des moyennes $\pm$ SD d’au moins trois expériences indépendantes. Stat : t test pairé bilatéral

Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d’abord essayé de réverser l’effet anti-prolifératif de Fam65b en co-transfectant un excès de HDAC6 dans des cellules Jurkat où l’expression de Fam65b est forcée.

Cette expérience nous a permis de démontrer qu’un excès de HDAC6 pouvait en partie restaurer le phénotype des cellules Jurkat exprimant Fam65b (Figure 4.11 B).

4.3.6 La phosphorylation de Fam65b est nécessaire pour la formation du complexe Fam65b/14-3-3/HDAC6

Nous avons ensuite étudié le rôle de la phosphorylation de Fam65b sur les interactions entre ces trois partenaires.

Pour cela, nous avons co-transfecté des vecteurs permettant l’expression de HDAC6 et de 14-3-3 avec la forme WT de Fam65b ou mutante Fam65bS(x5)A et réalisé une co-immunoprécipitation en utilisant un Ac anti-Myc (Figure 4.12). Ainsi, un complexe de trois partenaires ne peut se former qu’avec la forme WT de Fam65b. Ainsi la capacité de liaison de 14-3-3 à des cibles non phosphorylées ne semble pas intervenir dans ce mécanisme. L’ensemble de ces résultats montre que l’effet anti-prolifératif de Fam65b résulte de la capacité de sa forme phosphorylée à former un complexe avec HDAC6 et 14-3-3.

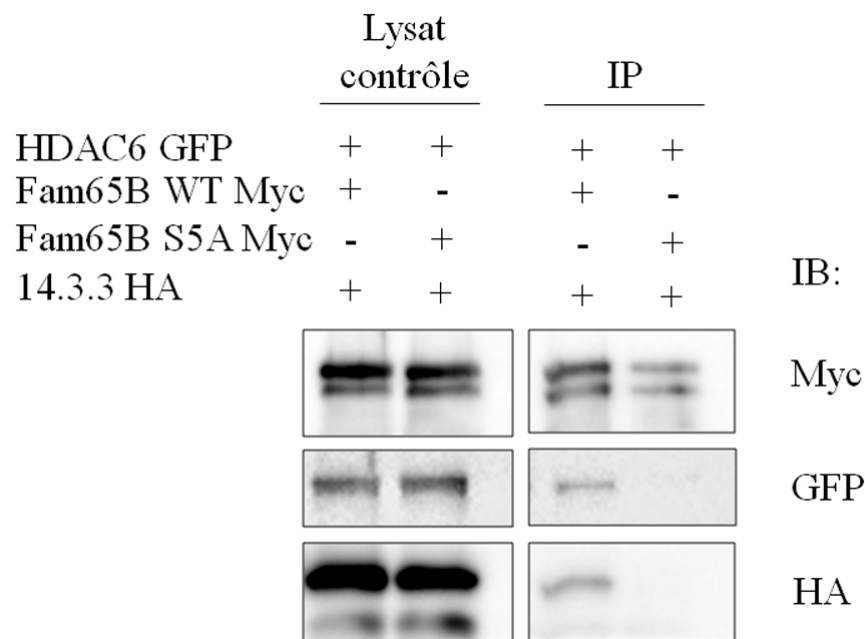


FIGURE 4.12 – La propriété anti-proliférative de Fam65b résulte de sa capacité à interférer avec HDAC6 et 14-3-3

Détermination de la capacité de Fam65b à former un complexe trimoléculaire avec HDAC6 et 14-3-3 en fonction de son état de phosphorylation dans des 293T co-transfectées par immunoprécipitation.

4.4 L'état de phosphorylation de Fam65b modifie sa localisation subcellulaire

Afin d'évaluer l'impact de la phosphorylation de Fam65b sur sa localisation subcellulaire, nous avons transfecté des cellules Jurkat avec différents mutants de Fam65b, Fam65b S(x9)A qui n'est plus phosphorylable, RL151-152AA qui ne lie plus RhoA et Fam65b S(x9)A & RL151-152AA qui combine les deux mutations (Figure 4.13). La localisation de Fam65b est déterminée en mesurant les intensités de fluorescence cytoplasmique et membranaire puis en calculant le ratio de ces deux valeurs pour déterminer l'index de fluorescence. Ainsi, un index supérieur à 1 indique une localisation cytoplasmique alors qu'un index inférieur à 1 signifie que la protéine est membranaire. La forme sauvage de Fam65b ainsi que les mutants RL151-152AA et Fam65b S(x9)A & RL151-152AA sont cytoplasmiques alors que le mutant Fam65b S(x9)A est, quant à lui, très enrichi au niveau membranaire. La phosphorylation de Fam65b ainsi que son interaction

avec RhoA influencent donc sa localisation subcellulaire.

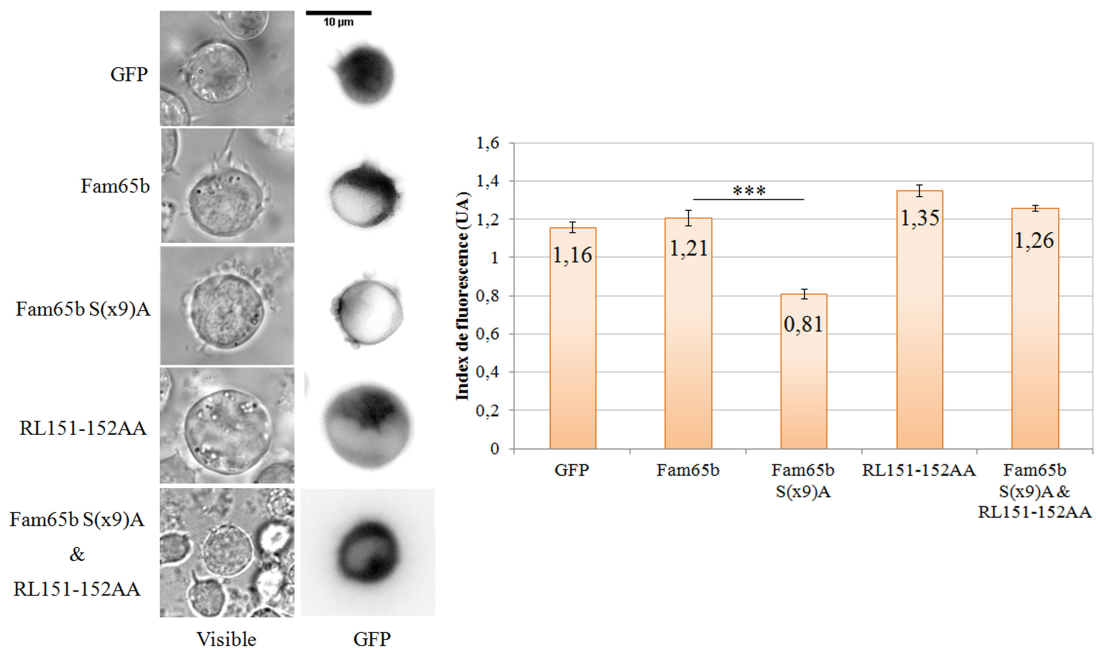


FIGURE 4.13 – L'état de phosphorylation de Fam65b influence sa localisation subcellulaire

Détermination de la localisation subcellulaire de Fam65b dans des cellules Jurkat transfectées en fonction de son état de phosphorylation par épifluorescence. Images représentatives des cellules transfectées étudiées (Panneau gauche). Mesure de l'index de fluorescence, correspondant au ratio de l'intensité de fluorescence cytoplasmique sur celle de la membrane (Panneau droit). Pour chaque condition, n=16 à 18 cellules.

4.5 Fam65b contrôle la prolifération des cellules T

Dans un second temps, nous avons analysé les conséquences de la régulation de la division cellulaire de LT primaires par Fam65b.

Dans un LT au repos, FoxO est nucléaire et actif donc Fam65b doit être exprimé. Après stimulation du TCR, FoxO est phosphorylé et exclu du noyau donc l'expression de Fam65b doit diminuer (Figure 4.14 A).

Nous avons vérifié ceci dans des lymphocytes T primaires humains (CD3 totaux) purifiés à partir du sang de donneurs sains (PBT) à la fois aux niveaux transcriptionnel et protéique et ainsi observé une diminution rapide de l'expression de Fam65b compatible avec l'activité transcriptionnelle de FoxO1 suite à une activation *in vitro* avec des billes couplées à des anticorps anti-CD3 et

anti-CD28 (Figure 4.14 B et C). La diminution de l'expression de Fam65b au cours de la stimulation n'est pas liée aux conditions de culture puisque son expression reste stable dans des cellules non stimulées maintenues en culture. De plus, en triant des PBT dans les différentes phases du cycle cellulaire, nous avons pu établir que l'expression de Fam65b est restreinte à la phase G₀ (Figure 4.14 D).

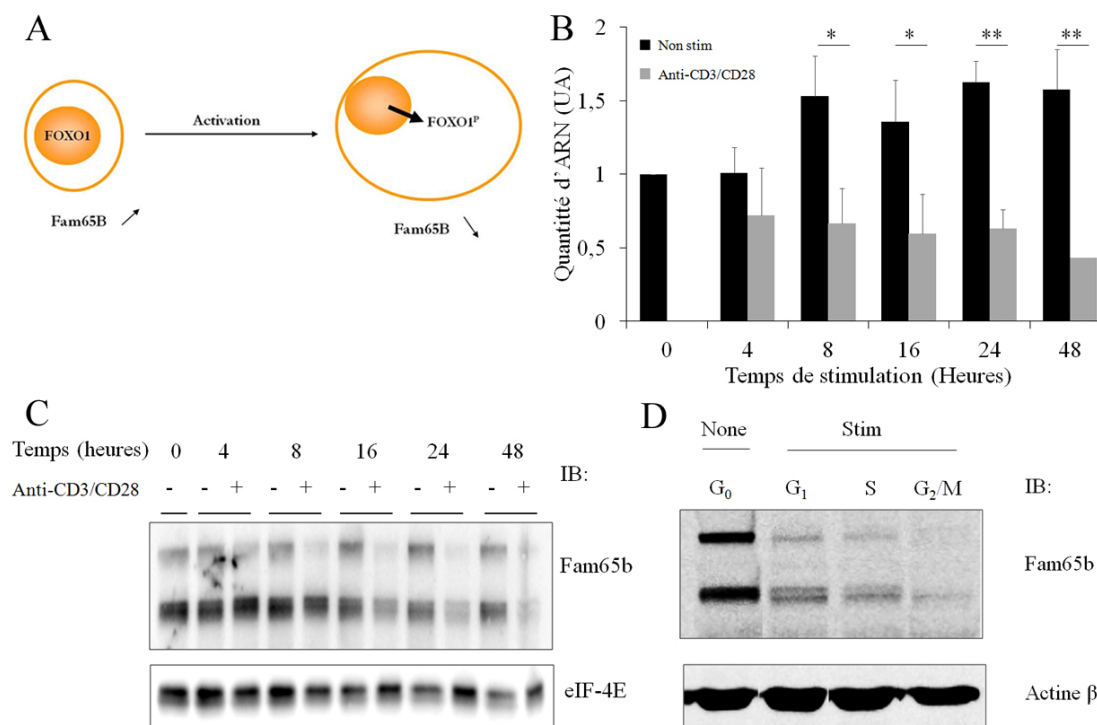


FIGURE 4.14 – L'expression de Fam65b diminue au cours de l'activation

(A) Schéma représentant l'évolution de l'expression de Fam65b au cours de l'activation de LT. (B et C) Cinétiques d'expression de Fam65b mesurées par RT-PCR et western blot (respectivement) dans des LT primaires humains maintenus en culture ou activés avec des billes couplées à des Ac anti-CD3 et anti-CD28. (D) Analyse par western blot de l'expression de Fam65b dans des LT primaires humains triés dans les différentes phases du cycle cellulaire. Stat : t test païré bilatéral

Afin de révéler l'importance fonctionnelle de cette diminution d'expression, nous avons suivi les conséquences du maintien de l'expression de Fam65b pendant l'activation des LT. Pour cela, nous avons transfecté des PBT avec un vecteur plasmidique permettant soit l'expression de la GFP soit de Fam65b fusionné à la GFP. Ces cellules ont ensuite été marquées avec une sonde fluorescente, le Cell Trace Violet (CTV), puis stimulées pendant 3 jours avec des billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. A chaque division, la cellule divise son contenu en deux cellules filles identiques. Ceci nous permet, en suivant la dilution de la sonde fluorescente par cytométrie en flux, de connaître le nombre de divisions

effectuées (Figure 4.15 A).

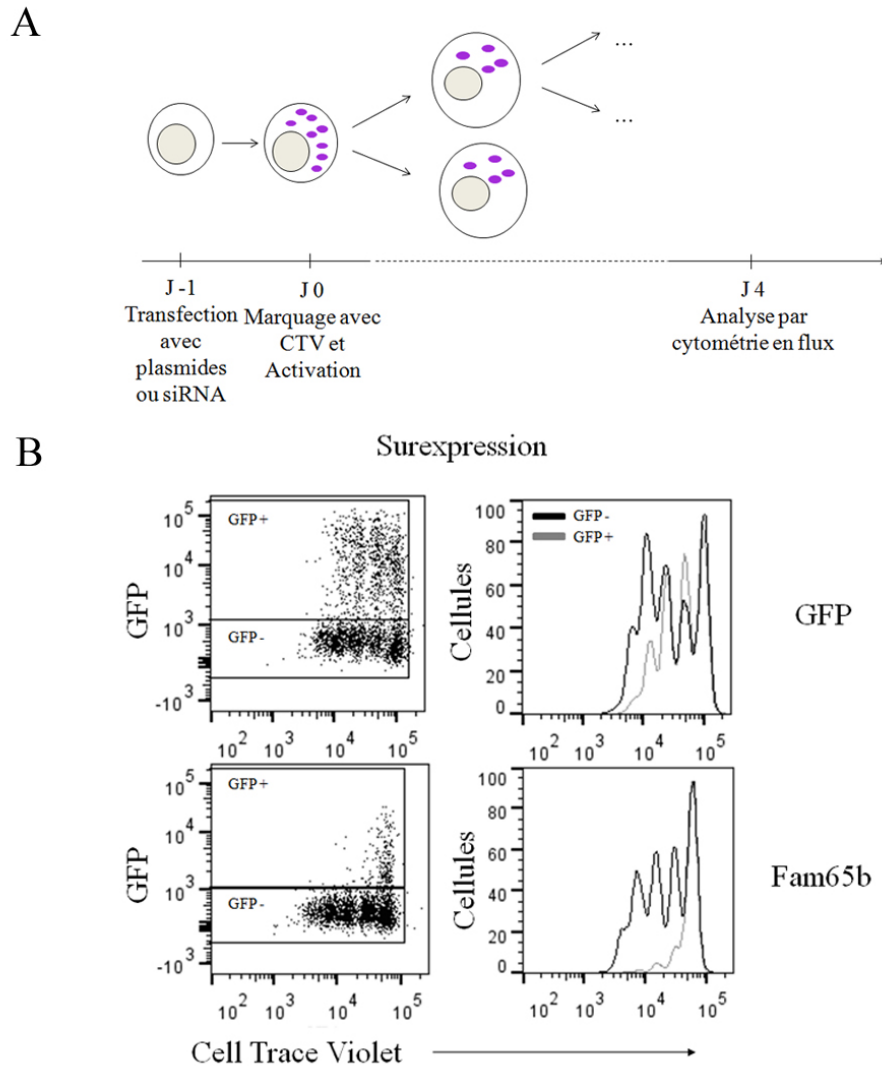


FIGURE 4.15 – L’expression de *Fam65b* est inversement corrélée avec la prolifération des lymphocytes T activés

(A) Représentation schématique de l’analyse de la prolifération grâce à la sonde fluorescente CTV. (B) Analyse par cytométrie en flux de la prolifération de LT primaires humains (CD3 totaux) transfectés avec des vecteurs codant la GFP ou *Fam65b*-GFP quatre jours après activation *in vitro* avec des billes couplées à des Ac anti-CD3 et anti-CD28. Les lignes grises représentent les cellules exprimant le vecteur. (C) Analyse par cytométrie en flux de la prolifération de LT primaires humains transfectés avec des siRNA contrôle (siCT, ligne noire) ou dirigés contre *Fam65b* (si*Fam65b*, ligne grise) et activés comme décrit en (B). Résultats représentatifs d’au moins trois expériences indépendantes. Stat : t test païré bilatéral

Les cellules transfectées par la GFP montrent plusieurs pics de division alors que les cellules *Fam65b*⁺ ne prolifèrent pas (Figure 4.15 B).

Cette inhibition de prolifération ne semble pas due à un problème de signalisation précoce. En effet, différents événements intervenant plus ou moins rapidement après stimulation comme la phosphorylation de Erk ainsi que la relocalisation vers le noyau de NFAT (événement très précoce après stimulation (Figure 4.16 A et B) et l'acquisition de marqueurs membranaires tel que CD69 (événements plus tardifs plusieurs heures après stimulation (Figure 4.16 B) ont été analysés.

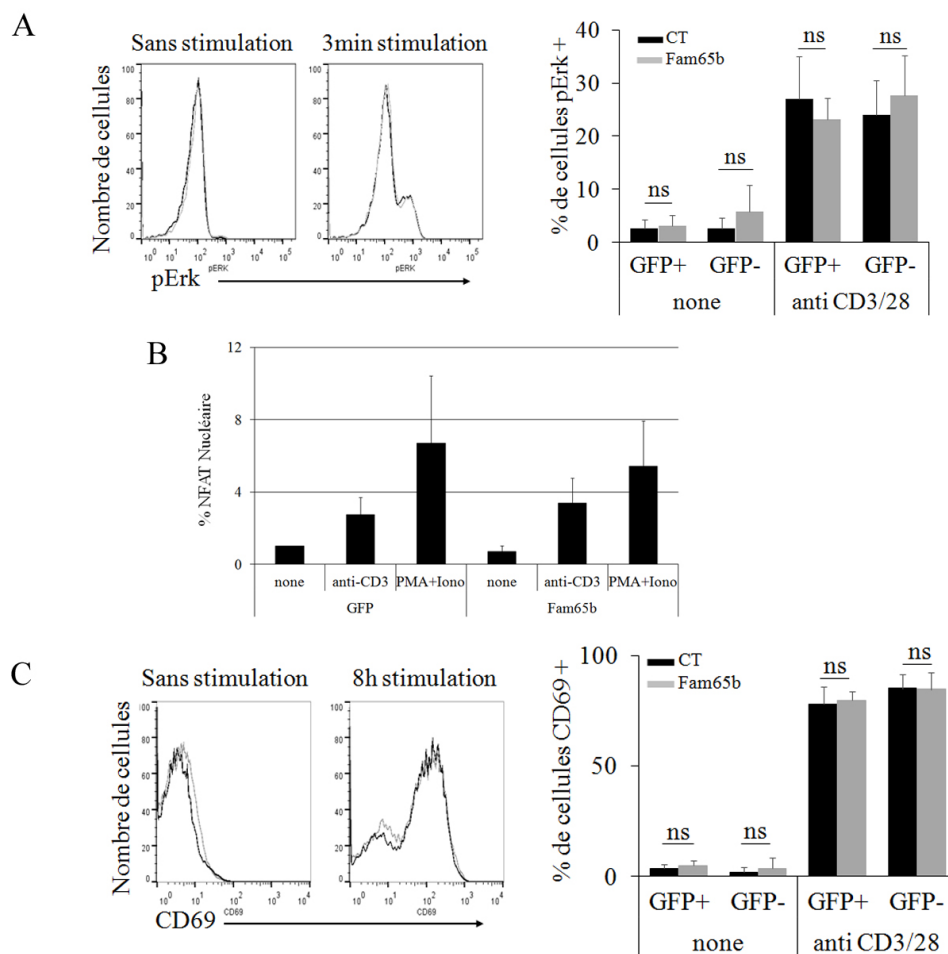


FIGURE 4.16 – L'inhibition de la prolifération par Fam65b ne joue pas sur la signalisation précoce

(A) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de pErk dans des PBT transfectés après 3min de stimulation avec des Ac anti-CD3 et anti-CD28. (B) Analyse du pourcentage de NFAT nucléaire par ImageStream dans des PBT transfectés et activés *in vitro*. (C) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de CD69 dans des PBT transfectés après 8h de culture en présence ou non de billes couplées à des Ac anti-CD3 et anti-CD28.

Il n'y a pas de différence dans la relocalisation nucléaire du facteur NFAT quelque soit le type de stimulation entre les cellules contrôle et les LT transfectés

avec Fam65b. De même, pour la phosphorylation de Erk et l'acquisition de CD69, aucune différence n'est observable.

D'autre part, comme approche complémentaire, nous avons également inhibé l'expression de Fam65b par des expériences d'ARN interférence (siRNA) afin d'étudier les effets de la diminution de l'expression de Fam65b précédant l'activation des LT primaires *via* une stimulation TCR. Les cellules Fam65b^{kd} (Fam65b « Knock-Down ») montrent alors une plus grande capacité de prolifération que les cellules contrôle (Figure 4.17).

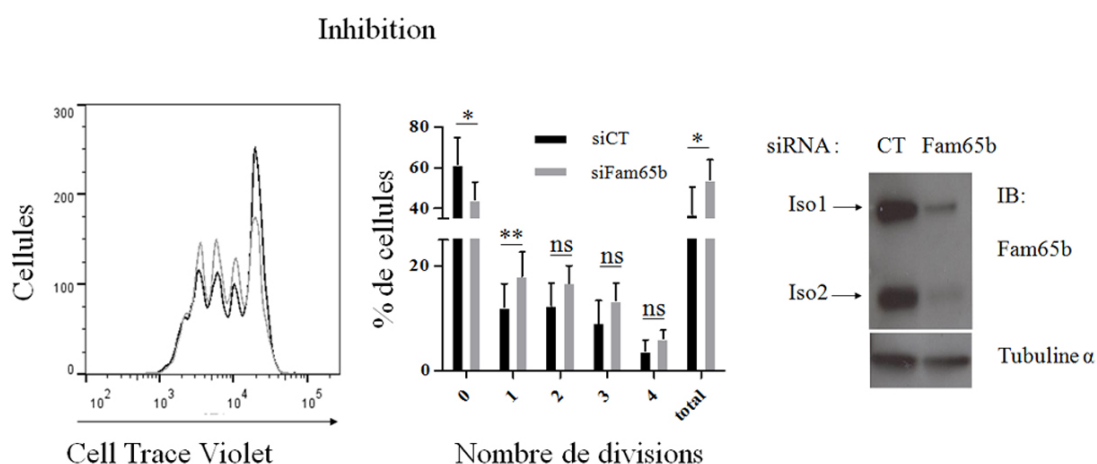


FIGURE 4.17 – L'inhibition de Fam65b favorise la prolifération des LT

Analyse par cytométrie en flux de la prolifération de LT primaires humains transfectés avec des siRNA contrôle (siCT, ligne noire) ou dirigés contre Fam65b (siFam65b, ligne grise) quatre jours après activation *in vitro* avec des billes couplées à des Ac anti-CD3 et anti-CD28. L'efficacité des siRNA est évaluée par western blot. Résultats représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes. Stat : t test païré bilatéral

Nous avons ensuite étudié la prolifération de cellules CD45RA⁺ après activation avec des doses croissantes de billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 suite à la déplétion de Fam65b par siRNA (Fam65b^{kd}).

En absence de stimulation aucune prolifération n'est observée. Cependant, les cellules Fam65b^{kd} prolifèrent à des doses sub-optimales de stimulation qui n'induisent que peu de prolifération des cellules contrôle (Figure 4.18).

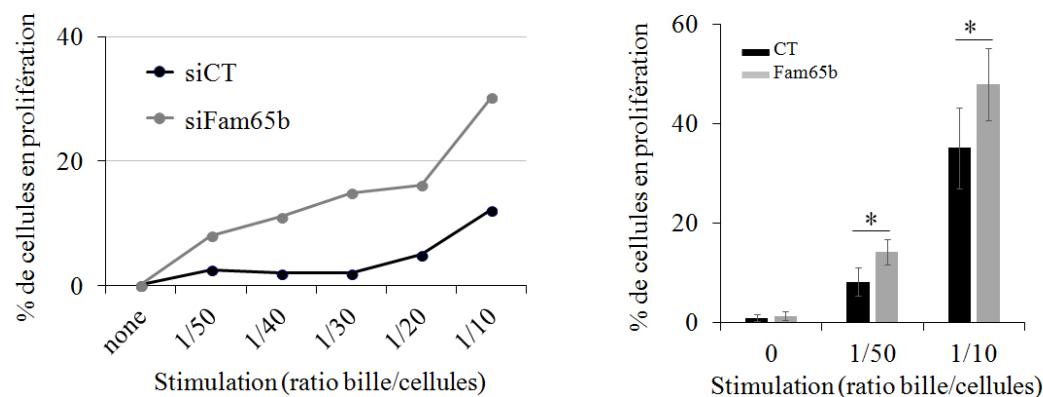


FIGURE 4.18 – L'expression de Fam65b régule le seuil d'activation des LT

Mesure de la dilution de CellTrace Violet par cytométrie en flux dans des LT primaires humains CD45RA⁺ transfectés avec des siRNA quatre jours après stimulation avec des doses croissantes de billes couplées à des Ac anti-CD3 et anti-CD28.

Les LT primaires périphériques ayant une capacité hétérogène de prolifération suivant leur état de différenciation, nous avons purifié les populations CD45RA⁺ (naïves donc seuil élevé) et CD45RO⁺ (mémoires donc seuil plus faible) de sang périphérique et comparé par western blot le niveau d'expression de Fam65b dans ces populations (Figure 4.19). Nous avons pu constater que le faible seuil d'activation des CD45RO⁺ corrèle avec une plus faible expression de Fam65b comparé aux cellules naïves CD45RA⁺.

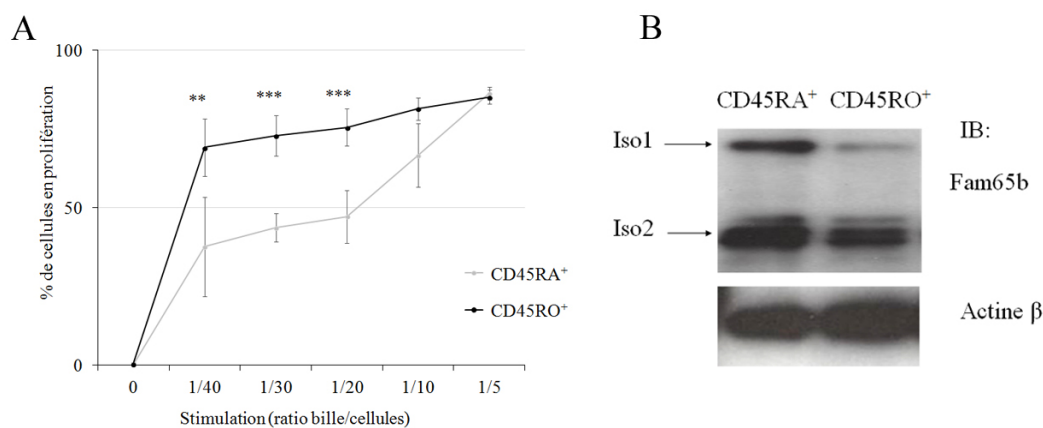


FIGURE 4.19 – Fam65b participe aux capacités fonctionnelles des LT mémoires

(A) Mesure de la dilution de CellTrace Violet par cytométrie en flux dans des LT primaires humains CD45RA⁺ ou CD45RO⁺ trois jours après stimulation avec des doses croissantes de billes couplées à des Ac anti-CD3 et anti-CD28. (B) Analyse de l'expression de Fam65b dans des LT primaires humains naïfs (CD45RA⁺) ou mémoires (CD45RO⁺) par western blot.

Ces résultats montrent qu'il existe une corrélation inverse entre le niveau d'expression de Fam65b dans la cellule et la capacité des LT primaires humains à proliférer suite à une stimulation du TCR. L'inhibition de l'expression de Fam65b est donc un pré-requis à la prolifération.

Chapitre 5

Etude du rôle de Fam65b dans un modèle de souris Fam65b^{ko}

De précédents résultats obtenus *in vitro* au laboratoire nous ont permis de voir que Fam65b lie et inhibe l'activité de RhoA ce qui bloque la migration des LT. De plus, nous avons également montré que Fam65b lie et inhibe HDAC6 et contrôle la prolifération des LT primaires et des cellules transformées. Nous avons donc voulu étudier le rôle de Fam65b dans un contexte plus physiologique. Plusieurs modèles murins existants semblent intéressants dans le cadre de cette étude. En effet, les souris invalidées pour les facteurs de transcription FoxO présentent un défaut de développement des LTreg, une infiltration lymphocytaire dans de nombreux organes, des centres germinatifs anormaux et développent une autoimmunité. Il existe également des souris transgéniques C3 transférase qui miment un défaut de fonction de la GTPase Rho. Ces souris présentent un défaut de maturation, de prolifération et de survie des LT se traduisant par une diminution massive de la cellularité au niveau du thymus et à la périphérie. Enfin, les souris invalidées pour HDAC6 présentent une hyperacétylation de la tubuline- α et une faible diminution de production d'Ac T dépendant. Bien que le développement des LT soit normal, les LTreg déficients pour HDAC6 ont une meilleure activité suppressive. L'ensemble de ces résultats nous ont donc amené à développer un modèle murin que j'ai commencé à caractériser.

5.1 Etablissement d'un modèle murin d'invalidation de Fam65b

Nous avons généré un modèle de souris « Knock-Out » (KO) pour Fam65b dans le lignage T. En effet, les souris Fam65b^{ko} ont été obtenues par croisement entre des souris dont les exons 3 et 4 du gène *fam65b* ont été encadrés de séquences lox et une souris exprimant la recombinaise Cre sous le promoteur CD4. Ainsi, la délétion sera effective dans tous les LT puisque lors du développement thymique tous les LT passent par un stade double positif et expriment à la fois les molécules

CD4 et CD8 (Figure 5.1 A). L'extinction de l'expression de *fam65b* dans les LT a été vérifiée par Western Blot (Figure 5.1 B).

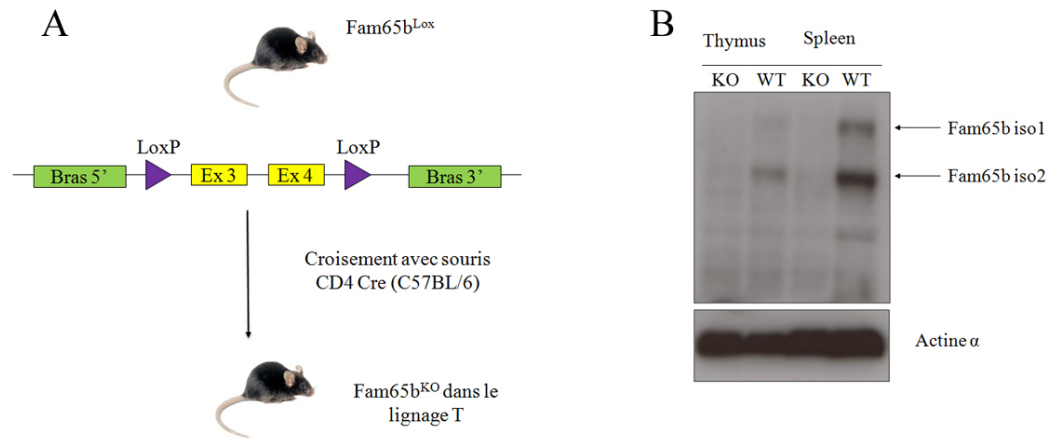


FIGURE 5.1 – Modèle de souris Fam65b^{ko} dans le lignage T

(A) Croisement permettant l'obtention de souris Fam65b^{ko}. (B) Vérification par Western Blot de l'inhibition de l'expression de Fam65b dans des LT purifiés issus du thymus et de la rate.

5.2 L'activité des partenaires de Fam65b est modifiée dans les LT des souris Fam65b^{ko}

Nous avons tout d'abord vérifié au niveau moléculaire les conséquences de l'inactivation de Fam65b sur l'activité de ses deux partenaires, RhoA et HDAC6.

5.2.1 L'activité de RhoA est augmentée dans les LT Fam65b^{ko}

Nous avons pu constater que dans les LT des souris Fam65b^{ko}, alors que la quantité de RhoA est identique aux souris WT (Figure 5.2 A), la quantité de RhoA actif, analysée par cytométrie en flux à l'aide d'un Ac spécifique de cette forme, est augmentée (Figure 5.2 B). L'inhibition de l'activité de RhoA par Fam65b est donc bien conservée dans ce modèle murin.

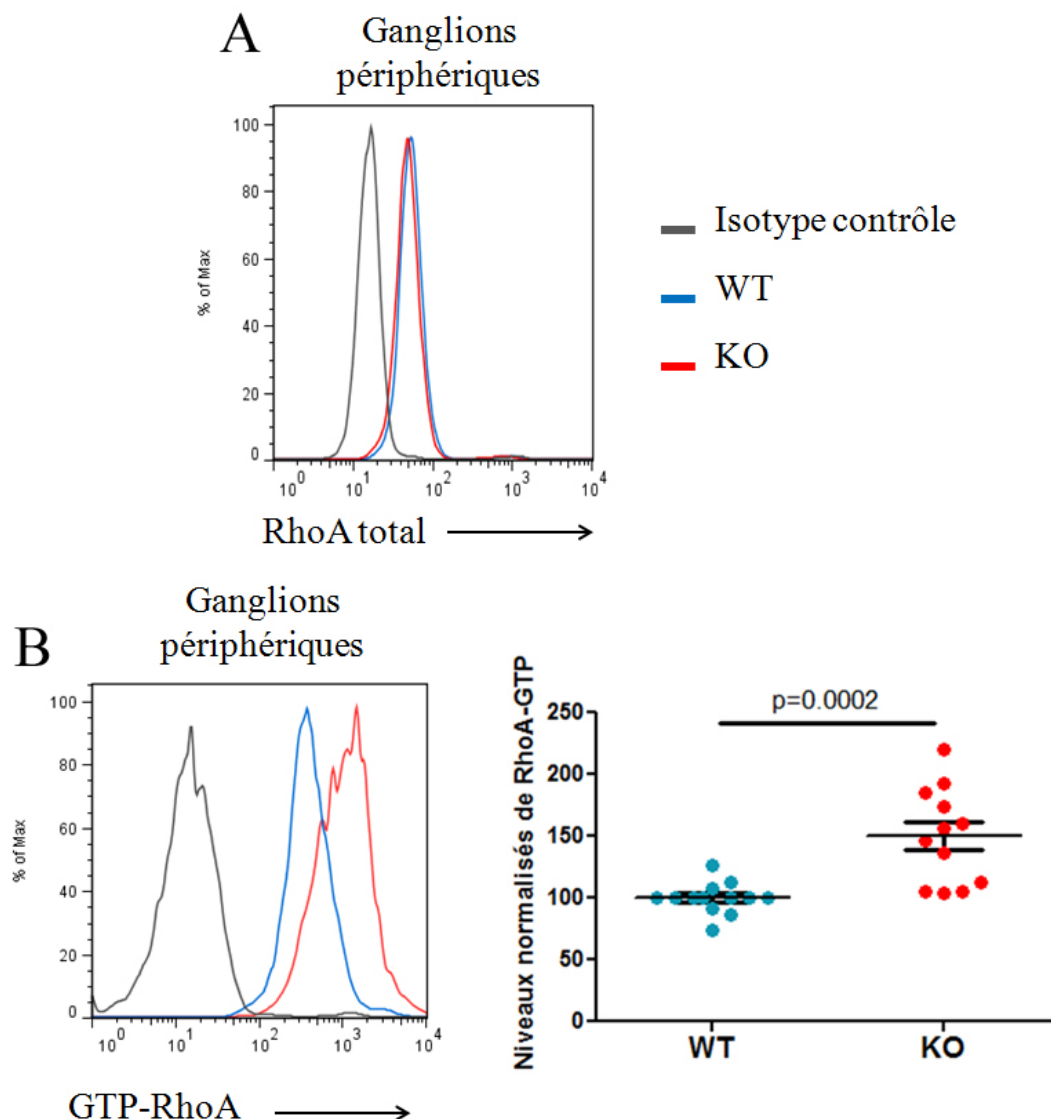


FIGURE 5.2 – Les LT Fam65b^{ko} ont une plus forte activité de RhoA

(A) Mesure de la quantité totale de RhoA par cytométrie en flux dans des LT purifiés des ganglions périphériques. (B) Mesure de la quantité de RhoA-GTP par cytométrie en flux dans des LT purifiés des ganglions périphériques (Panneau Gauche). Niveaux de RhoA-GTP issus de 8 expériences indépendantes, les moyennes de fluorescence de chaque expérience sont normalisées par rapport à la moyenne des valeurs des souris WT (Panneau Droite).

5.2.2 L'activité de HDAC6 est augmentée dans les LT Fam65b^{ko}

Nous avons également vérifié l'inhibition de HDAC6 par Fam65b dans ce modèle. Pour tester l'activité déacétylase de HDAC6, nous avons analysé la quantité de tubuline acétylée dans les ganglions périphériques de souris WT ou

Fam65b^{ko} par Western Blot (Figure 5.3). Les LT Fam65b^{ko} issus des ganglions expriment moins de tubuline acétylée. Fam65b inhibe donc HDAC6 dans les ganglions lymphatiques dans ce modèle. Il est important de noter que cette diminution de la tubuline acétylée s'accompagne d'une augmentation importante de la quantité de tubuline totale.

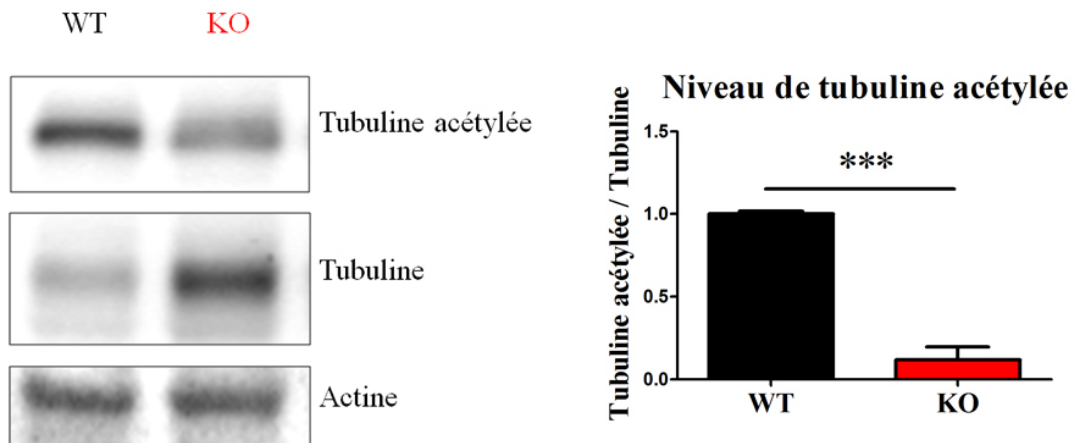


FIGURE 5.3 – Les LT Fam65b^{ko} issus des ganglions n'expriment plus de tubuline acétylée

Mesure par Western Blot du niveau d'acétylation de la tubuline dans des LT purifiés issus des ganglions périphériques (Panneau Gauche). Quantification des résultats de deux expériences indépendantes obtenus par Western Blot (Panneau Droite).

5.3 Vérification du rôle de Fam65b sur la prolifération de LT murins *in vitro*

Nous avons ensuite évalué si les LT issus de souris Fam65b^{ko} se comportait comme les LT Fam65b^{kd} humains. Pour cela, des LT issus des ganglions de souris WT et Fam65b^{ko} ont été marqués avec la sonde fluorescente CTV puis stimulés avec des doses croissantes d'Ac anti-CD3 soluble en présence de splénocytes de souris CD3ε^{ko} irradiés servant d'APC (Figure 5.4). La prolifération des LT est analysée après trois et quatre jours de stimulation. On retrouve ainsi plus de cellules Fam65b^{ko} dans chacun des pics de division.

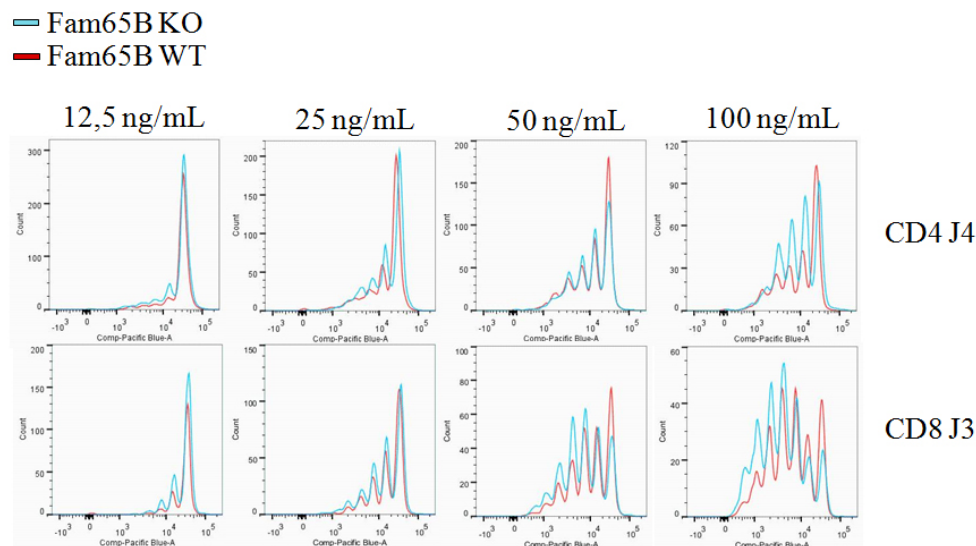


FIGURE 5.4 – Les LT *Fam65b^{ko}* ont un seuil d'activation diminué

Mesure de la dilution de CellTrace Violet par cytométrie en flux dans des LT WT (Rouge) et *Fam65b^{ko}* (Bleu) après stimulation *in vitro* en présence de doses croissantes d'Ac anti-CD3 soluble sur des APC.

5.4 Phénotype des souris *Fam65b^{ko}* à l'état de base

5.4.1 Evaluation de la cellularité

Dans un premier temps, nous avons évalué la cellularité totale des différents organes au niveau de base.

Seuls les ganglions des souris *Fam65b^{ko}* présentent une légère diminution dans leur cellularité (Figure 5.5). Celle-ci se retrouve dans le nombre de LT comptés dans les différents organes après purification (Figure 5.6).

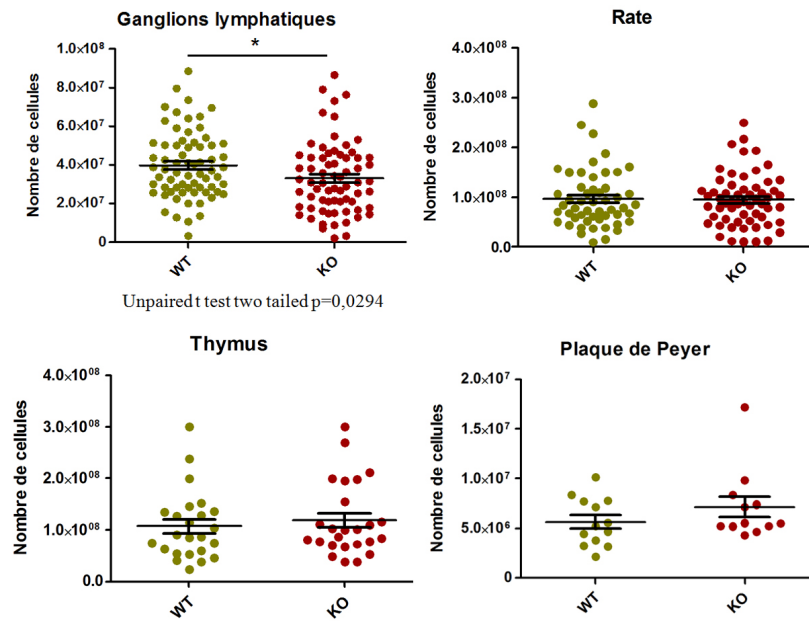


FIGURE 5.5 – **Evaluation de la cellularité des différents organes lymphoïdes**

Le nombre de cellules viables est compté sur lame de Malassez en présence de bleu Trypan après dilacération des organes sur un tamis. Les moyennes sont représentées par les barres noires. Stat : t test non païré bilatéral.

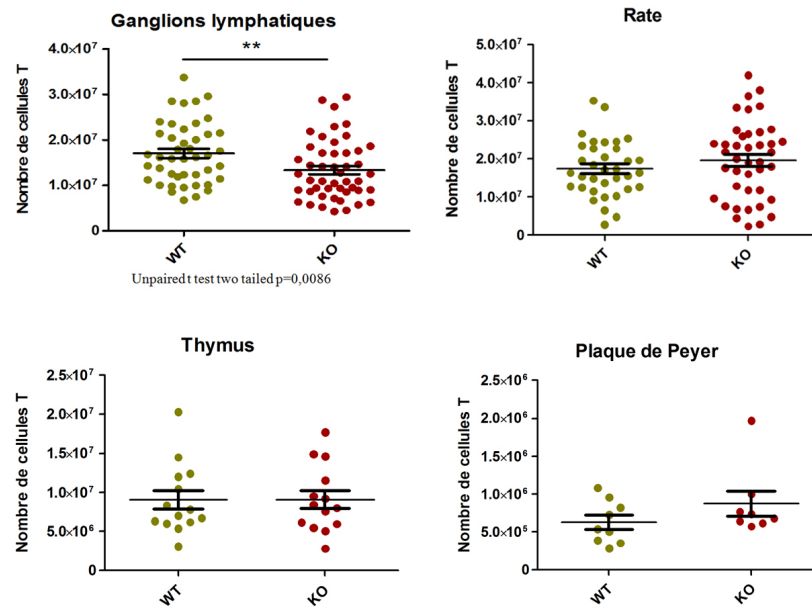


FIGURE 5.6 – **Evaluation du nombre de LT dans les différents organes lymphoïdes**

Le nombre de LT est compté après purification négative sur lame de Malassez en présence de bleu Trypan ou calculé à partir du pourcentage de cellules CD3⁺ obtenus par cytométrie en flux. Les moyennes sont représentées par les barres noires. Stat : t test non païré bilatéral.

Au niveau du thymus, aucune différence n'est observée dans la répartition des sous-populations de thymocytes (Double Négatif (DN), Double positif (DP), CD4, CD8). Au sein des LT périphériques, la proportion de LT CD4⁺, CD8⁺ et LTreg observée dans la rate et les ganglions n'est pas affectée (Figure 5.7).

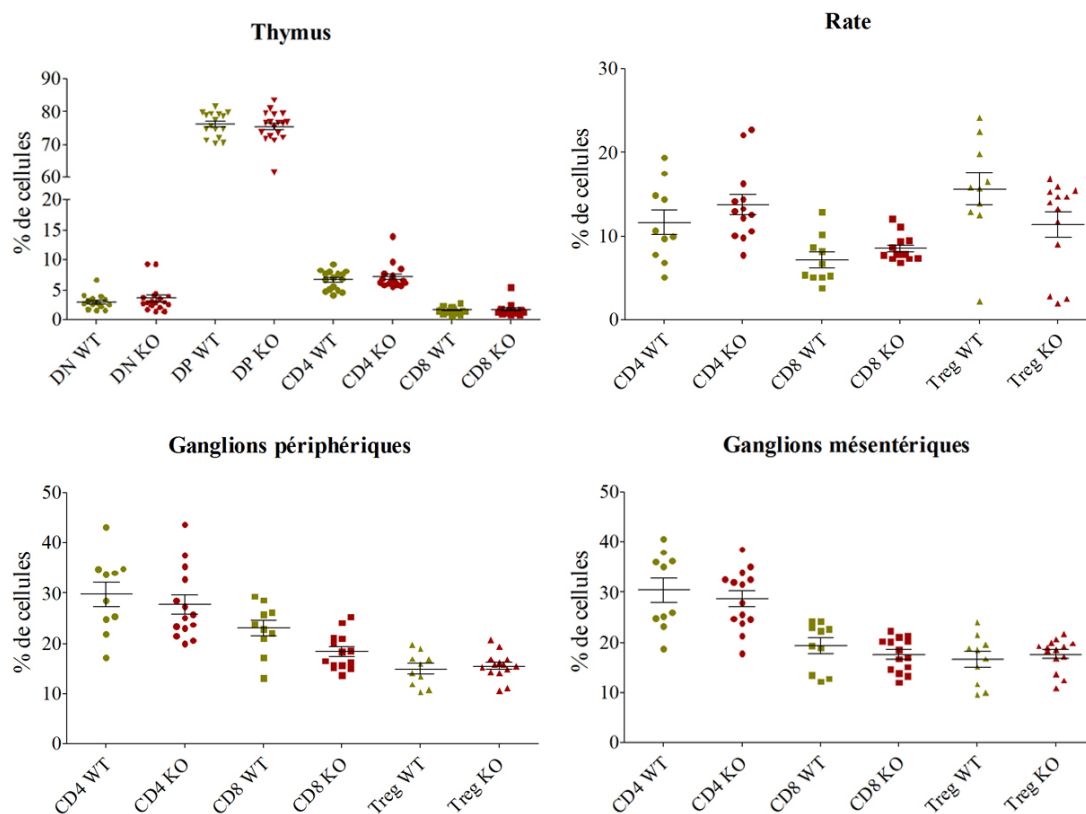


FIGURE 5.7 – Evaluation de la proportion des différentes sous-populations de LT dans les différents organes lymphoïdes

Les différentes sous-populations sont marquées avec des Ac spécifiques et analysées par cytométrie en flux. Stat : t test non païré bilatéral.

De plus, l'absence de *Fam65b* n'induit pas de phénotype activé dans les LT comme le montre l'analyse du marqueur CD69 (Figure 5.8).

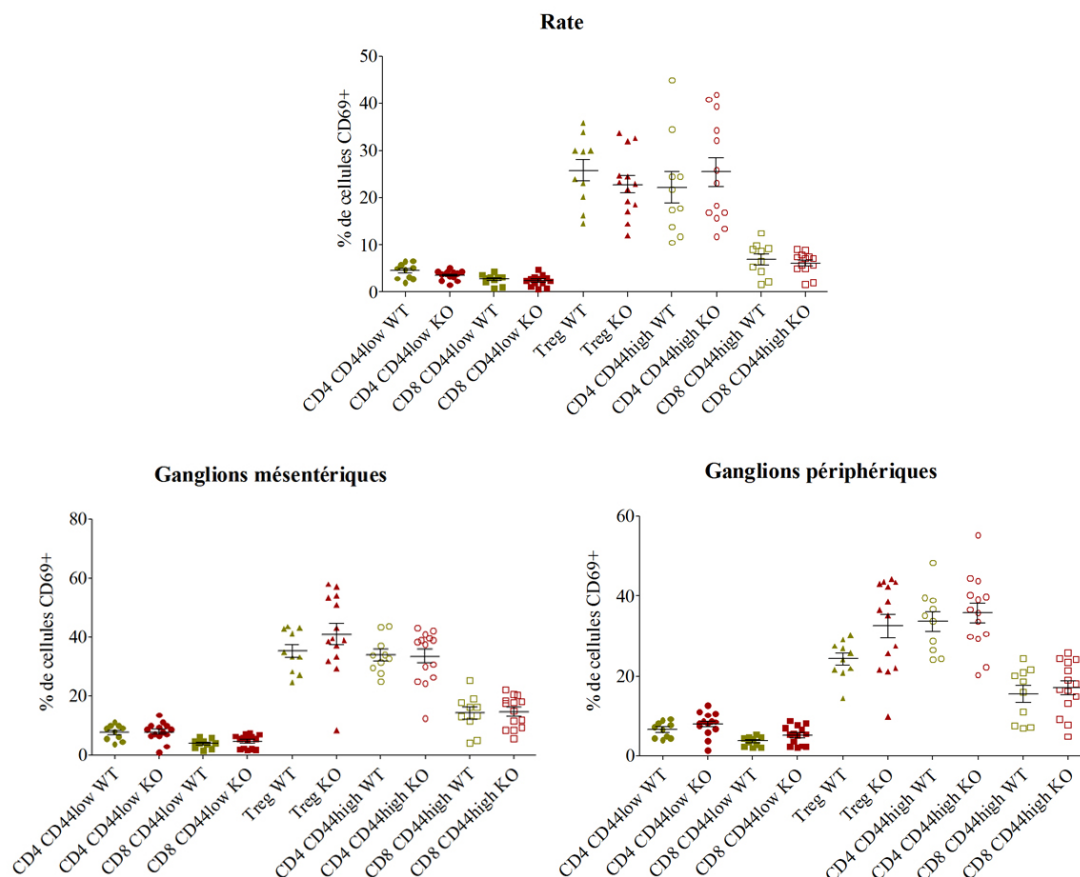


FIGURE 5.8 – **Evaluation de l'auto-activation des LT dans les différents organes lymphoïdes**

Mesure du pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD69 par cytométrie en flux. Stat : t test non pairé bilatéral.

Il ne semble donc pas y avoir de différences majeures dans le nombre de cellules T retrouvées au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Cependant, il existe un défaut majeur dans la quantité de cellules retrouvées dans le sang des souris (Figure 5.9). En effet, chez les souris *Fam65b^{ko}*, on retrouve environ deux fois moins de LT ($CD3^+$) aussi bien $CD4^+$ que $CD8^+$ en circulation dans le sang alors que les quantités de cellules B (B220) et myéloïdes ($CD11b$) sont identiques à celles observées dans les souris WT.

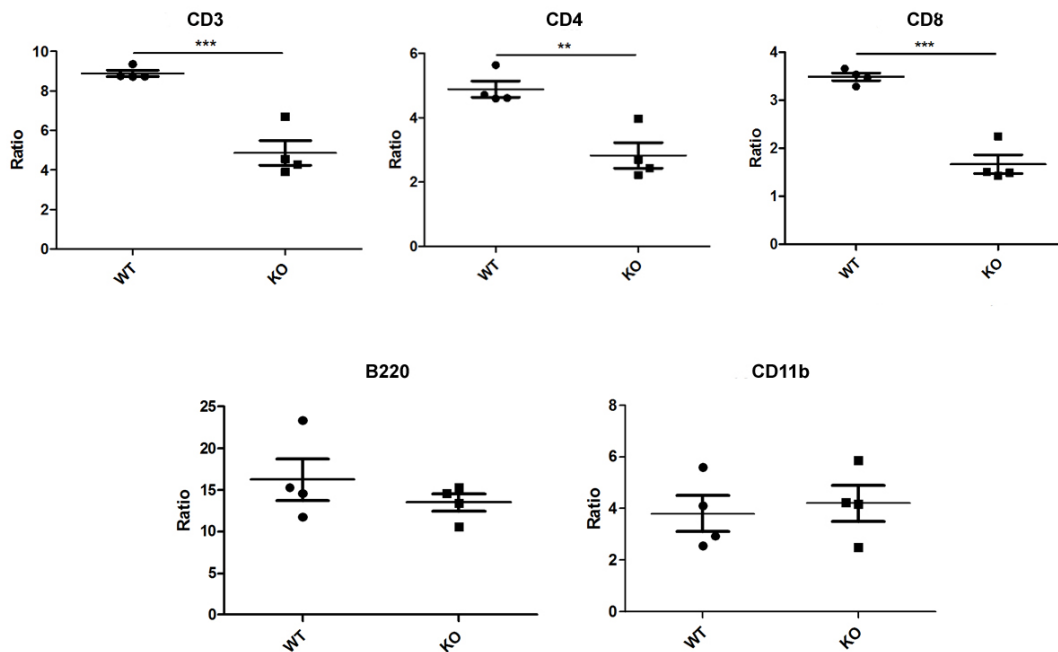


FIGURE 5.9 – **Evaluation de la composition cellulaire du sang des souris**

Chaque sous-population est marquée par des Ac spécifiques et analysée par cytométrie en flux. Pour chaque sous-population, la quantité de cellules est calculée en effectuant un ratio du nombre de cellules acquises en fonction d'un nombre de billes défini. Stat : t test non paillé bilatéral.

5.4.2 L'expression des marqueurs CD62L et CD44 est modifiée

Dans le but d'évaluer l'activation spontannée des LT de nos souris, nous avons analysé par cytométrie en flux l'expression des marqueurs CD44 (Figure 5.10 A), permettant de distinguer les cellules mémoires des cellules naïves, et CD62L (Figure 5.10 B), dont l'expression est caractéristique des cellules naïves.

La marquage CD44 laisse apparaître une différence au niveau de la population intermédiaire. En effet, le maximum d'intensité de cette population est plus faible dans les LT issus des souris *Fam65b^{ko}* que dans ceux des souris WT. De plus, on observe également une diminution du pourcentage de LT CD4⁺ exprimant CD44 dans la rate.

Le marquage CD62L révèle quant à lui une expression plus forte de ce marqueur à la surface des LT *Fam65b^{ko}* par rapport aux LT WT et ce quelque soit leur organe d'origine.

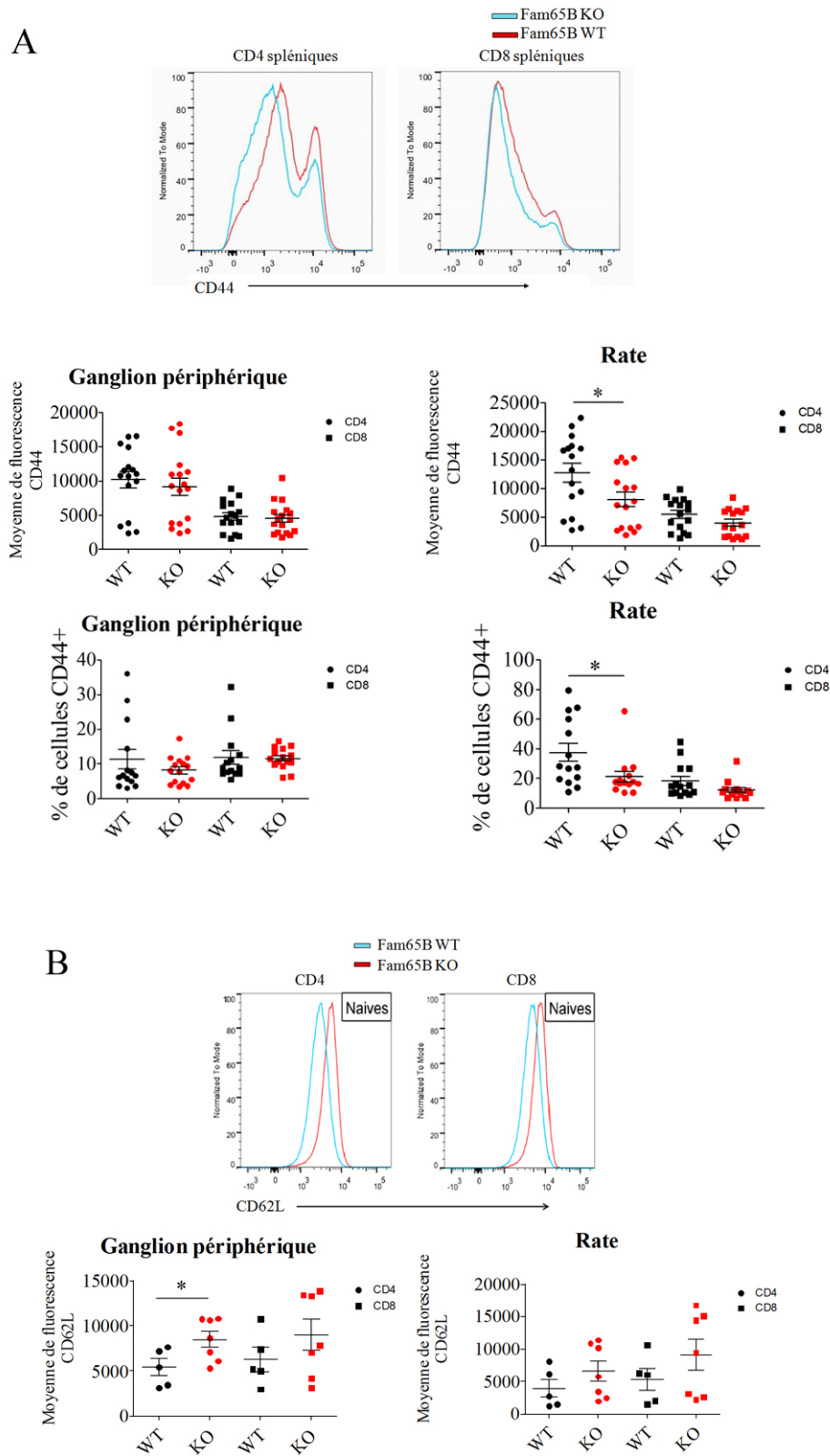


FIGURE 5.10 – Profil d'expression de CD44 et CD62L sur les LT

Mesure par cytométrie en flux du niveau d'expression de CD44 (A) et CD62L (B) à la surface de LT spléniques de souris WT et Fam65b^{ko}.

Les LT issus de souris Fam65b^{ko} expriment donc plus de CD62L et moins de CD44.

Nous nous sommes alors demandé si ces différences d'expression membranaire pouvaient être dues à un niveau de transcription différent entre les souris WT et Fam65b^{ko}. Nous avons donc mesuré la quantité d'ARNm de CD44 (Figure 5.11 A) et de CD62L (Figure 5.11 B) dans des LT CD4⁺ naïfs purifiés de ganglions lymphoïdes par RT-PCR. Les données obtenues à partir de quatre couples indépendants de souris WT et Fam65b^{ko} montrent qu'il n'y a pas de différence de transcription de CD44 et CD62L.

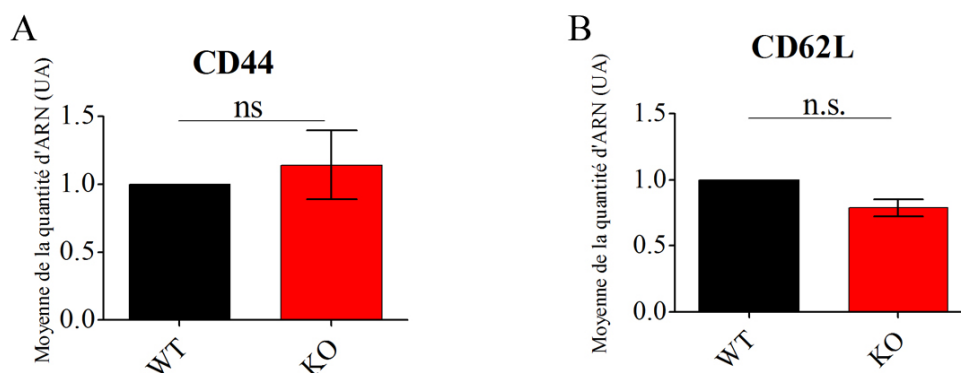


FIGURE 5.11 – Les niveaux de transcription de CD44 et CD62L sont identiques
Mesure du niveau de transcription par RT-PCR de CD44 (A) et CD62L (B) dans des LT CD4⁺ naïfs de quatre couples de souris indépendants. Les moyennes sont normalisées sur la quantité de transcrits observée dans les souris WT.

Les différences observées dans l'expression de CD44 et CD62L ne sont donc pas liées à leur régulation transcriptionnelle. Cependant, l'expression de ces protéines peut également être régulée directement à la membrane *via* protéolyse par action de métalloprotéases.

Ainsi, les souris Fam65b^{ko} ne présentent pas de problème phénotypique majeur à l'état de base. Seule une légère diminution du nombre de LT dans les ganglions et surtout dans les sang des souris Fam65b^{ko} a pu être observée.

5.4.3 La production d'Ig n'est pas modifiée dans le modèle Fam65b^{ko}

Les souris déficientes pour HDAC6 présentant une diminution de production d'Ac, nous avons également mesuré la quantité d'immunoglobulines sécrétées dans le sérum de souris WT et Fam65b^{ko} à l'aide d'un kit de dosage (Figure 5.12).

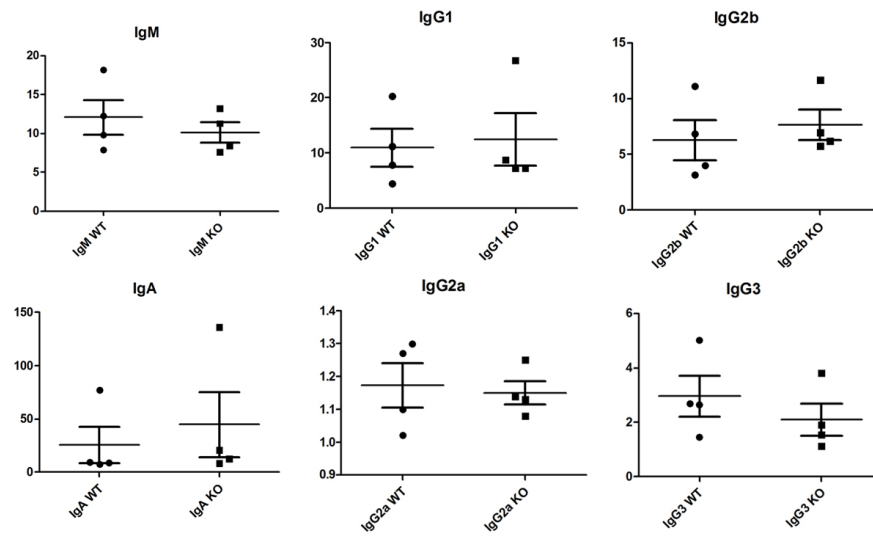


FIGURE 5.12 – La quantité d’immunoglobulines sécrétées dans le sérum n’est pas différente

Dosage des différents types d’immunoglobulines sécrétées dans le sérum effectué à l’aide d’un kit Milliplex.

Dans notre modèle de souris Fam65b^{ko} il n’y a pas de différence significative observable dans la quantité d’immunoglobulines sécrétées dans le sérum de souris saines.

Troisième partie

Discussion

Les travaux effectués au cours de ma thèse m'ont permis d'établir que Fam65b, une cible transcriptionnelle nouvellement identifiée de FoxO1, inhibe non seulement la migration mais également la prolifération des LT. J'ai pu mettre en évidence que la régulation de ces deux processus mettait en jeu des voies de signalisation différentes. En effet, alors que le blocage de la migration résulte de l'inhibition de la voie RhoA, l'arrêt de la prolifération met en jeu l'inhibition de la déacétylase HDAC6. J'ai également pu mettre au jour une corrélation entre le niveau d'expression de Fam65b et le seuil d'activation des LT. Certains éléments expérimentaux suggèrent l'implication de cette régulation dans les caractéristiques fonctionnelles des LT mémoires. J'ai enfin initié l'étude d'un modèle murin Fam65b^{ko}, établi au laboratoire.

Dans cette dernière partie, nous aborderons tout d'abord le rôle de Fam65b comme facteur de quiescence. Puis nous reviendrons sur les mécanismes moléculaires mis en jeu par Fam65b pour réguler des fonctions essentielles des LT. Enfin, nous discuterons les observations effectuées sur le modèle Fam65b^{ko}.

Fam65b, un facteur de quiescence

Les résultats obtenus dans les LT primaires humains montrant une expression forte de Fam65b dans les cellules en G₀, drastiquement réprimée au cours de la prolifération et ceux indiquant que le maintien de son expression bloque la prolifération permettent d'identifier Fam65b comme un réel facteur de quiescence. Toutefois, l'inhibition de l'expression de Fam65b dans des LT quiescents n'induit pas de prolifération spontanée des cellules en absence de stimulus comme cela a pu être observé dans les souris FoxO1^{ko} et FoxO3^{ko} (Gubbels Bupp et al., 2009; Kerdiles et al., 2009; Ouyang et al., 2009). Ces données confirment donc que la quiescence cellulaire est un état maintenu par de nombreux leviers moléculaires devant être levés pour permettre aux cellules de cycler. Fam65b serait donc l'un de ces leviers.

Bien qu'ayant mis en évidence que le niveau d'expression de Fam65b régule le potentiel prolifératif des LT, le mécanisme de cette régulation reste encore à établir. Nous avons vu dans l'introduction que les LT quiescents ont besoin d'un certain délai de latence, correspondant au passage de la fenêtre de restriction, avant d'entrer dans leur premier cycle de division. Ce délai peut être réduit en jouant sur plusieurs paramètres comme la force du signal TCR et la présence de facteurs de co-stimulation. Fam65b inhibant la prolifération consécutive à une stimulation du TCR, il est alors possible d'envisager que Fam65b puisse jouer son rôle d'inhibiteur de la prolifération au niveau de cette fenêtre de restriction. Ainsi, une plus faible expression de Fam65b favoriserait le passage de cette fenêtre de restriction.

Nous avons également vu au cours de l'introduction que la durée des phases « Gap » peut être réduite à partir du deuxième cycle de division (Mishima et al., 2014). Le mécanisme moléculaire régulant ce phénomène n'étant pas connu,

l'inhibition de l'expression de Fam65b pourrait être une clé dans la mise en place de ce mécanisme.

Nous avons observé que l'inhibition de son expression permet l'entrée en cycle des LT dans des conditions de stimulation sous optimales. Il semble donc qu'une plus faible expression de Fam65b rende les LT plus facilement activables. Fam65b agirait donc sur le seuil d'activation des LT. Dans les LT mémoires, nous avons observé une plus faible expression de Fam65b comparé aux LT naïfs. Or les LT mémoires ont un seuil d'activation inférieur à celui des LT naïfs (Pihlgren et al., 1996). Les résultats obtenus par Allam *et al.* (Allam et al., 2009) montrant que, dans les LT mémoires, l'activation de la voie PI3K/Akt est nécessaire pour diminuer l'expression protéique de FoxO1 pour maintenir ces LT dans un état plus « avancé » du cycle cellulaire, ainsi que les résultats que nous avons obtenus suggèrent que la régulation de l'expression de Fam65b *via* FoxO1 pourrait être l'un des mécanismes moléculaires impliqué dans la plus grande réactivité des LT mémoires. Il est également envisageable que la régulation du potentiel prolifératif par Fam65b intervienne dans une seconde caractéristique des LT mémoires, leur capacité d'auto-renouvellement. En effet, l'expression de Fam65b inhibant la prolifération, il est possible que l'expression réduite de Fam65b dans la population de LT mémoires soit favorable à ce processus de prolifération homéostatique.

L'induction de l'expression de Fam65b dans des cellules transformées, un exemple de signal contradictoire

L'expression de Fam65b a précédemment été testée au laboratoire dans un panel de lignées cellulaires. Ainsi, les lignées cellulaires CEM, 293T, HeLa, NIH3T3 ou encore Jurkat n'expriment pas Fam65b et sont en constante prolifération. L'expression forcée de Fam65b dans ces lignées cellulaires transformées ou immortalisées induit un arrêt du cycle cellulaire en perturbant leur mitose et conduit à la mort des cellules. Dans les cellules Jurkat, la phosphatase PTEN est inactive. Cette phosphatase déphosphoryle entre autres les Phosphatidyl-Inositol (3, 4, 5) triphosphates (PI(3,4,5)P3) et l'IP(1-3-4-5)4. L'accumulation de PI(3,4,5)P3 dans ces cellules induit une activation permanente de la sérine/thréonine kinase Akt, ce qui conduit à une exclusion nucléaire donc à une inhibition de l'activité du facteur de transcription FoxO1. Cette voie de signalisation, induisant la prolifération, est donc « ON » de façon constitutive. Or, comme nous l'avons vu, Fam65b est un facteur de quiescence. En forçant l'expression de Fam65b dans ces cellules en prolifération, nous bloquons une voie de signalisation constitutive. L'intégration de ces deux signaux opposés conduit à la mort des cellules. Cet exemple illustre bien le concept de signaux contradictoires évoqué dans l'introduction. Au niveau moléculaire, on peut envisager que l'activité constitutive d'Akt induise la cellule à se diviser. Pour se

diviser, la cellule doit mettre en place un fuseau mitotique qui ne peut se former correctement à cause de l'inactivation de HDAC6 par Fam65b.

Fam65b est impliqué dans la régulation de structures mécano-transductrices

Nous avons montré que, dans des LT, Fam65b inhibe la déacétylase HDAC6 responsable de la régulation de l'acétylation de la tubuline. Ce résultat a également été obtenu par une autre équipe dans des cellules myogéniques humaines (Balasubramanian et al., 2014). La tubuline est l'un des composants à la base de la structure des microtubules qui composent notamment le cil primaire. Cette excroissance membranaire est retrouvée à la surface de nombreuses cellules et est connue pour contrôler le cycle cellulaire. HDAC6, en déacétylant la tubuline, réduit la stabilité des microtubules et induit la réduction du cil pendant la mitose (Forcioli-Conti et al., 2016). On peut donc envisager que Fam65b, en inhibant HDAC6, stabilise le cil primaire et donc la quiescence (Figure 5.13).

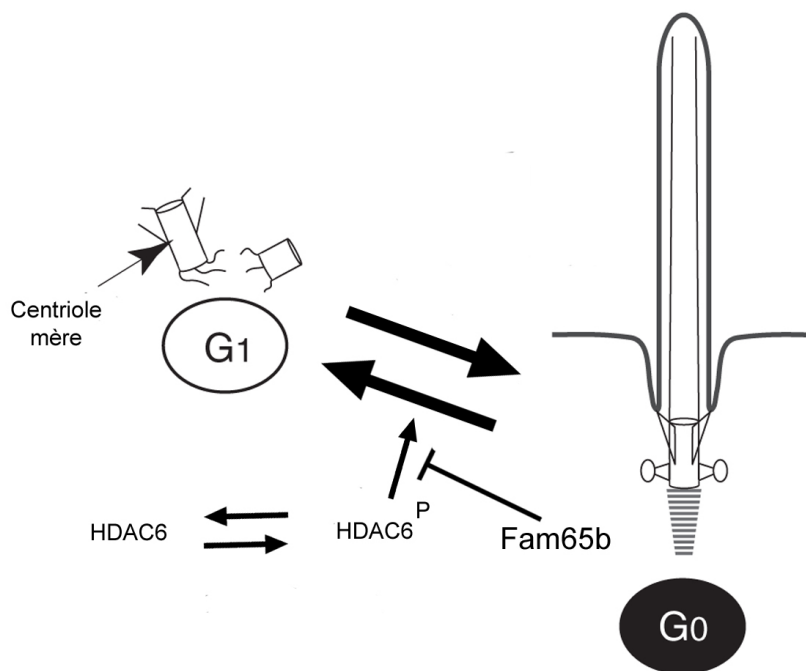


FIGURE 5.13 – Mécanisme de régulation du cil primaire par Fam65b

Le désassemblage du cil primaire est nécessaire pour permettre la libération du centrosome et l'initiation de la division cellulaire. Ce mécanisme est médié par l'activité de la déacétylase HDAC6. En inhibant HDAC6, Fam65b stabilise le cil primaire donc la quiescence des cellules.

Cette hypothèse est renforcée par deux travaux récents montrant que Fam65b est localisée à la membrane plasmique de cellules ciliées de l'oreille interne et que des mutations de Fam65b engendrent des syndrômes de surdité résultant d'un défaut de ce cil (Diaz-Horta et al., 2014; Zhao et al., 2016). Il est cependant surprenant de constater que, dans la seconde étude, la régulation du stéréocil par Fam65b semble impliquer son interaction avec la famille des Rho GTPases, alors même que nos résultats montrent que cette interaction n'intervient pas dans le potentiel anti-prolifératif de Fam65b.

D'autre part, bien qu'une étude, récente mais peu convaincante, décrive la présence d'un cil primaire dans les LT (Prosser and Morrison, 2015), ces cellules sont *a priori* décrite comme des cellules non ciliées (Finetti et al., 2011). L'implication du cil primaire dans la régulation de la prolifération par Fam65b peut donc à première vue paraître surprenante. Toutefois, un certain nombre de travaux ont montré le rôle de protéines spécifiquement impliquées dans la machinerie du cil primaire telles que IFT20 (Finetti et al., 2009; Finetti and Baldari, 2013) ou encore Hedgehog (Roche et al., 2013) dans le fonctionnement des LT.

Aspects moléculaires

L'interaction de Fam65b avec ses partenaires RhoA et HDAC6 est régulée par son état de phosphorylation. Nous avons montré que la phosphorylation de Fam65b est nécessaire pour former un complexe trimoléculaire avec HDAC6 et 14-3-3 et inhiber la prolifération. Au contraire, la phosphorylation de Fam65b empêche sa liaison avec RhoA. La localisation subcellulaire de Fam65b est également différente suivant son état de phosphorylation. L'étude des conséquences de la phosphorylation de Fam65b sur sa localisation subcellulaire montre que le mutant de Fam65b non phosphorylable (mutant Fam65b S(x9)A) est membranaire. De plus, l'abolition de l'interaction Fam65b/RhoA (mutant RL151-152AA) induit une localisation cytoplasmique de Fam65b. L'ensemble de ces résultats suggère donc une localisation membranaire de Fam65b non phosphorylé et lié à RhoA et une localisation cytoplasmique du complexe Fam65b phosphorylé/HDAC6/14-3-3. Comme le montre la figure 5.14, la régulation des processus de migration et de prolifération des cellules ferait intervenir une interaction de Fam65b avec différents partenaires, interaction elle-même dépendante de l'état de phosphorylation de Fam65b. Nous n'avons cependant pas encore identifié la kinase responsable de la phosphorylation de Fam65b. Ce mécanisme corrèle avec un changement de localisation subcellulaire de Fam65b.

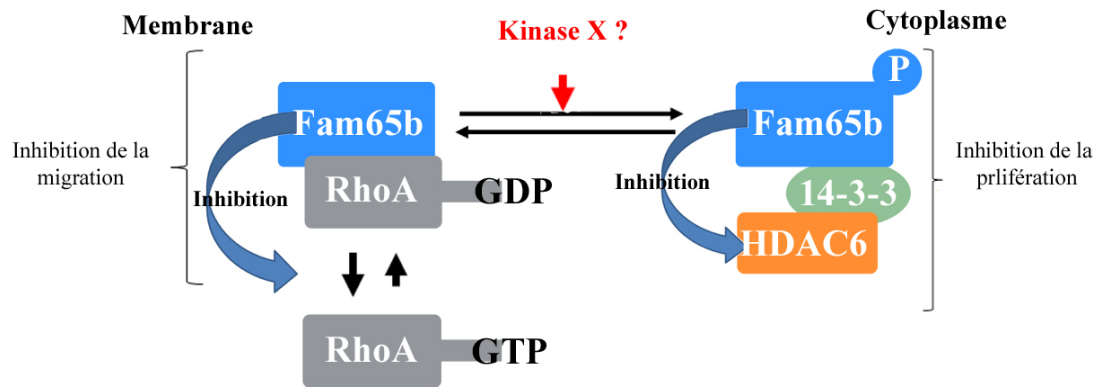


FIGURE 5.14 – Mécanismes moléculaires d'inhibition de la migration et de la prolifération par Fam65b

La liaison de Fam65b à RhoA au niveau membranaire empêche son chargement en GTP et inhibe la migration des cellules. La phosphorylation de Fam65b par une kinase (non identifiée) induit un décrochage de RhoA et une liaison au niveau du cytoplasme avec HDAC6 et 14-3-3 permettant l'inhibition de la prolifération.

Un phénotype moléculaire fort sans conséquence majeure *in vivo* ?

Ayant montré le rôle de Fam65b *in vitro* sur deux processus majeurs de la physiologie des LT, nous avons établi un modèle de souris invalidée pour ce gène afin d'étudier les conséquences de son expression dans un contexte plus intégré. Fam65b inhibant à la fois la migration et la prolifération, nous nous attendions à des modifications importantes dans ces souris Fam65b^{ko}, y compris à l'état de repos (« Steady state »). Deux modèles murins, établis préalablement, étaient tout particulièrement importants pour cette partie de mon travail : les souris où les gènes *foxo1* et *hdac6* ont été invalidés. Dans les souris FoxO1^{ko}, on observe une répartition anormale des cellules dans les organes et une activation spontanée des LT. Dans le modèle murin HDAC6^{ko}, bien qu'une hyperacétylation de la tubuline dans de nombreux tissus soit observée, les souris sont viables et leur système immunitaire est normal en absence de stimulation (de Zoeten et al., 2011).

L'absence de phénotype majeur dans la répartition des LT et de leur activation ne provient pas de phénomène de compensation, souvent observé dans des souris où un gène est invalidé de façon chronique, puisque l'activité de deux partenaires de Fam65b que nous avons identifiés est bien modifiée dans les LT des souris Fam65b^{ko}. En effet, nous avons observé que le niveau de tubuline acétylée est moins important dans les LT issus des ganglions des souris Fam65b^{ko}. Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus *in vitro* montrant que Fam65b inhibe HDAC6 et ceux obtenus dans le modèle murin HDAC6^{ko}. Nous avons également remarqué que dans les souris Fam65b^{ko}, le niveau de tubuline

totale est beaucoup plus important que dans les souris WT. Les microtubules sont des structures hautement dynamiques qui oscillent entre des phases d'élongation et de raccourcissement (Valiron et al., 2001). L'acétylation de la tubuline est associée à un état stable des microtubules. Fam65b par son activité inhibitrice sur HDAC6 pourrait donc participer à la régulation de la stabilité des microtubules. Quant à l'activation de RhoA, là encore, nos résultats montrent que l'absence de Fam65b induit une activation plus importante de cette Rho GTPase.

L'analyse plus fine de la répartition et du phénotype des LT issus des souris Fam65b^{ko} montre cependant quelques différences sur lesquelles nous allons revenir.

Régulation de l'expression des marqueurs CD62L et CD44

Au niveau du phénotype, si nous n'avons pas vu de variation dans la répartition des sous-populations de LT, nous avons pu observer, de façon surprenante, une augmentation de l'expression de CD62L et une diminution de l'expression de CD44. En inhibant l'expression de CD62L, Fam65b a ici un effet antagoniste aux facteurs de transcription FoxO. Cependant, la régulation de l'expression de cette molécule n'est pas que transcriptionnelle. En effet, l'expression membranaire de CD62L implique également un clivage protéolytique (Preece et al., 1996) et est partiellement dépendante de la phosphorylation des protéines ERM, elle-même dépendante de l'activité de RhoA (Ivetic et al., 2004). Il a été montré au laboratoire que les LT Fam65b^{ko} présentent une activité augmentée de RhoA. Il semble donc possible que ce niveau d'activation de RhoA entraîne un niveau de phosphorylation des protéines ERM plus élevé, soutenant donc un plus grand nombre de molécules CD62L à la membrane des cellules.

Les protéines ERM participent également à la stabilisation de CD44 à la membrane plasmique des cellules. On aurait donc pu penser que le mécanisme décrit ci-dessus pour CD62L agisse également sur la régulation de l'expression membranaire de CD44. Mais son expression peut aussi être régulée par l'action de métalloprotéases comme MMP-9. Ceci a notamment été montré dans des cellules cancéreuses mais pourrait s'appliquer aux LT, expliquant ainsi la diminution de l'expression de CD44 (Annabi et al., 2005b; Annabi et al., 2005a; Chetty et al., 2012).

Ce résultat surprenant en comparaison de l'activation spontanée des LT observée dans les souris FoxO^{ko} pourrait donc s'expliquer par le fait que, dans notre modèle, la diminution de l'expression de CD44 et l'augmentation de CD62L serait uniquement le résultat d'une augmentation de l'activation de RhoA et ne correspondrait pas à un état de moindre activation des LT Fam65b^{ko}.

Fam65b joue sur la prolifération et la migration

L'absence de modification de la répartition des LT dans les souris Fam65b^{ko} peut elle aussi être masquée par la conjonction de deux phénomènes. Nous avons en effet observé récemment que si il n'y a pas de différence visible dans les organes lymphoïdes classiquement analysés chez la souris (rate, ganglions périphériques et mésentériques...), il existe en fait une diminution importante des LT dans le sang des souris Fam65b^{ko}. Les souris qui n'expriment pas Fam65b ont environ deux fois moins de LT circulants. Il pourrait s'agir d'un défaut de production et/ou de sortie des thymocytes. Nous n'avons cependant observé aucune accumulation des cellules dans le thymus des souris Fam65b^{ko} ni de différence dans la composition des sous-populations de thymocytes. D'autres hypothèses à envisager sont une plus grande mortalité des cellules Fam65b^{ko} circulantes ou une migration plus importante des LT dans des organes non lymphoïdes, hypothèse qui corrèlerait avec l'expression plus importante de CD103 à la surface des LT issus des souris HDAC6^{ko}.

Même si nous n'avons pas encore expliqué la diminution des LT dans le sang des souris, il est intéressant de noter que ce défaut de cellularité observé dans le sang n'est pas retrouvé dans les organes lymphoïdes secondaires, où seule une légère diminution du nombre de LT est détectée dans les ganglions. De précédentes expériences, menées en collaboration avec le groupe de Jens Stein (Université de Berne), ont démontré que les LT Fam65b^{ko} ont une vitesse de migration intra-nodale plus faible résultant d'une trajectoire moins rectiligne comparée aux LT WT. Les LT Fam65b^{ko} verraient alors leur arrivée à proximité d'un canal lymphatique efférent retardée et seraient donc retenus plus longtemps dans les ganglions. Ce phénomène permettrait d'expliquer pourquoi la cellularité des organes lymphoïdes secondaires est sensiblement similaire entre les souris WT et Fam65b^{ko} alors que le nombre de cellules dans le sang est si différent.

Nous avons montré que Fam65b joue sur la prolifération et la migration. Ces deux fonctions sont intrinsèquement liées dans la physiologie des LT. En effet, un LT quiescent donc exprimant Fam65b doit être capable de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires afin de recevoir ses signaux de survie et d'être activé. Dès lors que le LT est stimulé par un Ag étranger, l'expression de Fam65b diminue, le LT perd sa capacité de migration dans les organes lymphoïdes et acquiert ses fonctions effectrices. Fam65b apparaît donc comme un effecteur des facteurs de transcription FoxO faisant un lien entre ces deux fonctions cellulaires majeures.

Un paradoxe reste cependant à éclaircir. En effet, de précédents résultats, obtenus *in vitro* lors d'expériences de Transwell, montrent que Fam65b par son inhibition de l'activité de RhoA diminue la migration de LT primaires humains. Fam65b apparaît alors comme un facteur de quiescence inhibant la migration et s'oppose alors aux facteurs de transcription FoxO qui induisent un programme

pro-quiescence et pro-migration. Les mécanismes régulant la migration dans nos deux systèmes expérimentaux pourraient faire intervenir un ensemble de partenaires différents expliquant le rôle antagoniste de Fam65b dans la régulation de la migration.

Conclusion générale

En conclusion, l'ensemble de ce travail a permis d'identifier Fam65b comme un nouveau marqueur de la quiescence cellulaire. Cette protéine bloque la prolifération en inhibant HDAC6 et augmente le seuil d'activation des LT. De plus, les résultats obtenus précédemment au laboratoire avaient permis de montrer que Fam65b inhibe la migration en modulant l'activité de la Rho GTPase RhoA. L'ensemble de ces résultats laisse apparaître Fam65b comme un nouvel effecteur de FoxO capable d'interagir avec divers partenaires afin de contrôler conjointement des fonctions cellulaires majeures comme la migration et la prolifération. Fam65b se présente donc comme un nouvel acteur important dans le contrôle de la réponse immune.

Quatrième partie

Matériels et Méthodes

Culture cellulaire

Les lymphocytes T humains ou PBT (Peripheral Blood T cells) sont isolés à partir d'un cône d'aphérèse de sang de donneurs sains (ESF, Site Saint Antoine-Crozatier, Paris) par centrifugation (1800 rpm, 20 min) sur gradient de Ficoll (Pancoll human, Biotech) puis déplétion négative sur billes magnétiques (Human T cell Enrichment Kit, Stem Cell). Les lymphocytes T naïfs (CD45RA⁺) et mémoires (CD45RO⁺) sont ensuite obtenus par déplétions négatives sur billes magnétiques (respectivement Anti Human CD45RO Particles et Anti Human CD45RA Particles, BD Biosciences). Les cellules ont ensuite été cultivées en milieu RPMI supplémenté de 10% de sérum humain AB, d'antibiotiques (pénicilline 50U/mL, Streptomycine 50µg/mL, Gibco), de glutamine (4mM, Gibco) et de sodium pyruvate (1mM, Gibco).

Les cellules Jurkat sont cultivées en milieu RPMI et les cellules HeLa et 293T en milieu DMEM, supplémentés de 10% de sérum de veau fœtal (Dominique Dutscher), d'antibiotiques (pénicilline 50U/mL, Streptomycine 50µg/mL, Gibco), de glutamine (4mM, Gibco) et de sodium pyruvate (1mM, Gibco).

Les cellules sont cultivées dans des flasques 25cm² ou 75cm² ventilées (Falcon, Becton Dickinson Biosciences) à 37°C avec 5% de CO₂ et 90% d'humidité.

Constructions et inhibiteurs pharmacologiques

Constructions plasmidiques Fam65b-Iso2 a été amplifié par PCR sur la base du vecteur Fam65b-V5 (Yoon et al., 2007). Le fragment de PCR ainsi obtenu a été introduit dans le vecteur pEGFP-N1 (Clontech). Fam65b-Iso1 a été amplifié par PCR sur la base d'ADNc de lymphocytes T humains et introduit de façon similaire dans pEGFP-N1. Les mutants ponctuels de Fam65b (RL151-152AA : Arg151 et Leu152 en Ala; S(x5)A : Ser 21, 37, 341, 523, 535 en Ala) ont été obtenus par mutagénèse dirigée (kit Quickchange, Agilent Technologies). Le vecteur Fam65b-mCherry a été construit en introduisant l'ORF de mCherry au niveau du site AgeI/NotI du vecteur Fam65b-pEGFP. Les constructions Fam65b WT et Fam65b S(x5)A Myc ont été obtenues en introduisant l'ORF de Fam65b dans le vecteur pEF au niveau du site SpeI/EcoRV. Les constructions plncx-Histone 2B-mCherry et plncx2-Tubuline-YFP ont été fournies par Clarisse Berlioz (Institut Cochin, France) et le vecteur pEGFP-N1-HDAC6 a été obtenu chez Addgene. Le plasmide 14-3-3-HA a été fourni par JL Andersen (Brigham Young University, Provo, UT).

Liste des primers utilisés :

pEGFP-Fam65b RL151-152AA (F) 5'-tgtatccagcgaGCcGCcaggatgggtgccagcaaatgaagca-3'
 pEGFP-Fam65b RL151-152AA (R) 5'-tgcttcattttgctggcaccatcctggGCgGCTcgtggtgataca-3'
 pEGFP-Fam65b S(x5)A
 S21A (F) 5'-atcattagaagccagGcctttgcggtttcagcgcc-3'
 S21A (R) 5'-gccgctgaaacccgcaaaggCctggcttctaataatgat-3'
 S37A (F) 5'-ggcgatccaggtgtaacGccttcattgaaaatt-3'
 S37A (R) 5'-aattttcaatgaaggCgttacacctggatcgcc-3'
 S523A (F) 5'-ctggtcaagaggctcacaGCTgcagaggtgccaatggcc-3'
 S523A (R) 5'-ggccattggcacctctgcAGCtgtgagcctcttgaccag-3'
 S535A (F) 5'-atggccacagacaggctgctcGCTgagggttctgttggtgga-3'
 S535A (R) 5'-tccaccaacagaaaccctcAGCgagcagcctgtctgtggccat-3'
 S341A (F) 5'-cccttcagaggagaatgGCCatgtacagccagggtacc-3'
 S341A (R) 5'-ggtaccctggctgtacatGCCattctcctctgaaggg-3'
 pmCherry-Fam65b (F) 5'-atacatACCGGTCCGACATGgtgagcaaggcgaggagga-3'
 pmCherry-Fam65b (R) 5'-atgtatGCGGCCGCTtactgtacagctcgtccatgccg-3'
 pEF-Fam65b Myc (F) 5'-atacatACTAGTatgttggtaggatccagctcttttcgcc-3'
 pEF-Fam65b Myc (R) 5'-gtcatgaatttggtgatattctaaaaaagGATATCatacat-3'

Inhibiteurs pharmacologiques L'antagoniste spécifique de HDAC6, CAY-10603, a été décrit et caractérisé par (Dhanyamraju et al., 2015).

La protéine phosphatase λ a été obtenue chez Millipore.

Souris Fam65b^{ko}

En collaboration avec la plateforme de recombinaison homologue de l'Institut Cochin, nous avons généré un modèle murin déficient pour Fam65b sur fond génétique C57BL/6 (« Backcross » réalisés en fonction du test MAX-BAX (Charles River Genetic Testing Service) permettant de déterminer les animaux ayant le plus fort pourcentage de similarité avec le fond génétique désiré, ici 99,61% de similarité avant le dernier « backcross »). Pour cela, deux séquences *loxP* ont été introduites par PCR de part et d'autre des exons 3 et 4 du gène *fam65b*. Les animaux possédant de tels sites sur leurs deux allèles ont ensuite été croisés avec des souris transgéniques exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur complet (promoteur/enhancer/silencer) du co-récepteur CD4 (Souris Fam65b^{ko}). La Cre étant exprimée dès le stade double positif (CD4⁺ CD8⁺) lors du développement thymique des LT, Fam65b est supprimé dans l'ensemble des LT matures. Des animaux possédant les sites *loxP* de part et d'autre des exons 3 et 4 mais n'exprimant pas la Cre sont utilisés comme contrôles (Souris WT) dans toutes les expériences présentées. Les souris WT et Fam65b^{ko} ont systématiquement été choisies, sauf indication contraire, dans la même portée et de même sexe. Les soins portés aux animaux ont été réalisés par les techniciens et vétérinaires de l'animalerie de l'Institut Cochin.

Isolement des LT à partir des organes lymphoïdes de souris

La rate, les ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques, le thymus et les plaques de Peyer ont été prélevés sur des souris sacrifiées puis dissociés à

l'aide du piston d'une seringue dans 1mL de PBS (Gibco) contenant 2% de sérum de veau fœtal. Les organes sont ensuite filtrés grâce à un tamis (BD Falcon) puis les cellules récoltées sont lavées (centrifugation 1800rpm, 2min, 4°C). Une lyse des globules rouges est effectuée sur les splénocytes par resuspension du culot cellulaire dans 1mL de tampon ACK (155mM NH₄Cl (Sigma), 10mM KHCO₃ (Sigma), 1mM EDTA (Invitrogen), pH=7.3) et incubation 2min à 4°C. La lyse est arrêtée par ajout de 9mL de PBS 2% SVF puis lavage des cellules. Les cellules sont comptées en bleu Trypan sur lame de Malassez puis les LT totaux sont purifiés par sélection négative (Mouse T Cell Isolation Kit, Stem Cell) selon le protocole du fournisseur.

Les cellules sont ensuite marquées pour être analysées par cytométrie en flux ou conservées sous forme de culot sec à -80°C pour le western blot.

Transfection des cellules

5.10⁶ PBT par cuve sont lavés dans du PBS et resuspendus dans 100μL de Human T Cell Nucleofactor Solution (Lonza). Ces cellules sont transfectées par nucléofection avec le programme U-014 (Amaxa Biosystems) par 5μg d'ADN plasmidique ou 2μL d'une solution de 100μM d'ARNi OTP SMART pool (Dharmacon) dirigés contre Fam65b humain ou des séquences non cibles comme contrôle.

5.10⁶ cellules Jurkat par cuve sont lavées dans du PBS et resuspendues dans 500μL de RPMI Medium 1640 sans rouge phénol 0% sérum (Gibco). Ces cellules sont transfectées par électroporation classique (Système BioRad à 270V et 950μF) avec 5μg d'ADN plasmidique.

Les cellules HeLa et 293T sont transfectées avec de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) suivant les instructions du fabricant.

Extraction ARN et qRT-PCR

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) puis dosés à l'aide d'un NanoDrop. La synthèse d'ADNc est effectuée à l'aide du kit Advantage RT for PCR Kit (Clontech Laboratories) en utilisant 1μg d'ARN total et des séquences primers hexamériques aléatoires dans un volume final de 20μL. La RT-PCR quantitative est effectuée à l'aide du kit Light Cycler Fast Start DNA Master plus SYBR Green kit (Roche Diagnostics). Les gènes d'intérêt sont détectés en utilisant des primers dessinés avec le logiciel Oligo6 (Molecular Biology Insights) et optimisés pour donner des amplicons uniques de 80-130 nucléotides.

Les séquences des primers sont les suivantes :

ppia (F)	5'-GGTGACTTCACACGCCATAATG-3'
ppia (R)	5'-ACAAGATGCCAGGACCCGTAT-3'
Fam65b (F)	5'-GCGGAGTTTAACCTCAGCAG-3'
Fam65b (R)	5'-CCTTCAGGTGTGACTTTGGC-3'

Cytométrie en flux

Marquage Annexine V, CD62L, CD69 et pErk sur LT primaires Le marquage Annexine V (BD Pharmingen, PE Annexin V Apoptosis Detection kit I) est effectué sur 1.10^6 cellules. Les cellules sont lavées en PBS puis reprises dans 100 μ L de Binding Buffer 1X (dilution dans de l'eau distillée au 1/10^{ème} du Binding Buffer contenu dans le kit) Après ajout de 5 μ L d'Ac, les cellules sont incubées 15 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. 400 μ L de Binding Buffer 1X sont ensuite ajoutés puis les cellules sont analysées dans l'heure.

Les marquages CD62L et CD69 sont effectués sur 1.10^5 cellules. Les cellules sont lavées en PBS et incubées 20 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante dans une dilution d'anticorps au 1/20^{ème} en PBS + 5% SVF (respectivement PE Mouse anti human CD62L, PE Mouse anti human CD69, BD Pharmingen). Après lavage en PBS + 5% SVF les cellules sont reprises dans du PBS afin d'être analysées.

Pour analyser la phosphorylation de Erk dans les PBT transfectés, 10^6 cellules sont fixées avec 4% de PFA pendant 10min, perméabilisées avec du méthanol à -20°C pendant 1h, incubées avec un Ac primaire anti-pErk (Cell Signaling Technology ref. 4370) en PBS 0,2% BSA pendant 30min à température ambiante puis avec un Ac secondaire (F(ab')₂-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Thermofisher ref. A-21246).

L'acquisition est effectuée sur un FACS Calibur à l'aide du logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences) ou sur un LSR Fortessa (BD Biosciences) à l'aide du logiciel d'acquisition Diva. L'analyse des résultats est réalisée sur le logiciel FlowJo (Tree Star).

Mesure de la prolifération par marquage au Cell Trace Violet Les PBT sont lavés deux fois en PBS pour se débarrasser de toutes traces de milieu de culture ou de sérum puis resuspendus à une concentration de 10^6 cellules par mL dans une solution de 5 μ M Cell Trace Violet (Invitrogen). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C à l'abri de la lumière pendant 20 minutes. Un volume de PBS 10% SVF froid correspondant à 5 fois le volume de charge est alors ajouté pour stopper l'absorption de Cell Trace par les cellules. Après centrifugation, les cellules sont resuspendues en RPMI 10% SAB à 10^6 cellules par mL et réparties dans une plaque 96 puits à fond rond (Falcon, 2.10^5 cellules par puits). Les LT sont stimulés par des billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 à raison d'une bille pour 5 cellules (Dynabeads, Life Technologies) puis placés à l'étuve.

Les LT murins purifiés sont lavés en RPMI sans sérum et resuspendus à une concentration de 2.10^6 cellules/mL. 1 μ L de Cell Trace Violet (5mM, Invitrogen) par mL de suspension cellulaire est ajouté puis les cellules sont incubées 20 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. Du SVF pur est ensuite ajouté volume à volume afin de stopper la réaction puis les cellules sont lavées deux fois en milieu de culture. Pour l'activation, $2,5.10^5$ splénocytes de souris CD3 ϵ^{ko} irradiés (20trs, 30 Grey) sont mélangées avec 5.10^4 LT marqués et une dose croissante d'Ac anti-CD3 (BD 553 057) soluble (Volume final 200 μ L) par puits dans une plaque 96 puits à fond

rond. Les cellules sont ensuite placées à l'étuve.

Les mesures sont effectuées sur un LSR II (BD Biosciences) à l'aide du logiciel d'acquisition Diva et l'analyse des résultats est effectuée sur le logiciel FlowJo (Tree Star).

Analyse du cycle cellulaire Les analyses de cycle sont effectuées sur 10^6 cellules. Les cellules sont lavées en PBS puis resuspendues dans 1mL de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 10 minutes à température ambiante. Après fixation, les cellules sont perméabilisées dans du PBS 1mM d'EDTA et 0,1% de Saponine et conservées dans ce même tampon à 4°C jusqu'au jour de la lecture. Le jour de l'analyse les cellules sont resuspendues dans du PBS 1mM EDTA additionné de 50 μ g/mL de Iodure de Propidium (Sigma) et de 200 μ g/mL de RNaseA (Sigma) puis incubées 30 minutes à 37°C. La lecture du cycle est réalisée sur un LSR Fortessa (BD Biosciences) à l'aide du logiciel d'acquisition Diva et l'analyse des résultats est effectuée sur le logiciel FlowJo (Tree Star).

Phénotypage des souris Les cellules resuspendues en PBS 2% SVF sont distribuées dans des plaques 96 puits à fond rond (Greiner Bioscience; 6.10^6 cellules par puits). Les cellules sont incubées pendant 15 min avec un Ac anti-CD16/32 purifié (Fc γ R II/III block; 2.4G2). Les cellules sont ensuite marquées avec les Ac de surface (CD4, CD8, CD69, CD44, CD62L, TCR β ou CD3 (BD Bioscience)) pendant 15min à 4°C. Puis le marquage intracellulaire FoxP3 est réalisé à l'aide du kit Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience).

L'acquisition est effectuée sur un LSR II (BD Biosciences) à l'aide du logiciel d'acquisition Diva. L'analyse des résultats est réalisée sur le logiciel FlowJo (Tree Star).

Evaluation de la quantité de RhoA actif *vs* total Les LT purifiés de ganglions de souris WT et Fam65b^{ko} sont lavés en PBS 5% SVF froid et fixés en PFA 4%. Les cellules sont alors incubées avec un Ac primaire anti-RhoA-GTP (NewEast Biosciences) ou anti-RhoA (Cytoskeleton) dilués dans un tampon de perméabilisation (PBS, 0,5% saponine, 5% SVF, 4mM NaN₃) pendant 30 minutes à 4°C. Après lavage, les cellules sont ensuite incubées avec un Ac secondaire couplé à un fluorochrome dilué dans le tampon de perméabilisation pendant 30 minutes à 4°C. L'acquisition est effectuée sur un FACScan (Becton Dickinson) à l'aide du logiciel CellQuest et les résultats sont analysés sur le logiciel FlowJo (Tree Star).

Microscopie

Analyse de la mitose Les expériences de Time-lapse sont effectuées sur des cellules HeLa cultivées sur des lamelles à l'aide d'un microscope Zeiss Axiovert 200 à 37°C. L'objectif 20X a été utilisé et les images acquises avec la caméra

CoolSnap HQ (Photometrics). Les images ont été analysées avec le logiciel Image J.

Analyse de la localisation de Fam65b Pour chaque cellule, une mesure de la fluorescence au niveau de la membrane et du cytoplasme est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ. Le ratio des valeurs obtenues permet de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine. Dans le cas où le ratio est supérieur à 1, la protéine est cytoplasmique. Dans le cas où le ratio est inférieur à 1, la protéine est membranaire. Dans le cas où le ratio est égal à 1, la fluorescence est répartie de façon uniforme entre le cytoplasme et la membrane.

L'acquisition se fait sur un microscope (Nikon TE2000) à épifluorescence équipé d'une caméra CCD 16 Bits (Cascade, Princeton Instruments). Grâce à une chambre thermostatée, l'ensemble de l'expérience peut être effectuée à 37°C. Pour la partie optique, nous avons utilisé un objectif 60x (Nikon, France). Les enregistrements ont été faits avec les logiciels MétaMorph et Metavue (Roper Scientific) ; les images sont traitées sur le logiciel ImageJ (Wayne Raband, USA).

Biochimie

Les cellules T primaires sont stimulées avec des billes couplées à des Ac anti-CD3 et anti-CD28 (1 bille pour 5 cellules, Dynabeads, Life Technologies) dans des plaques 96 puits à fond rond (Falcon, 2.10^5 cellules par puits). Les cellules sont ensuite lysées 30 minutes à 4°C dans un tampon de lyse (20mM Bicine, pH7.6 ; 0,6% CHAPS) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free, Roche) et de phosphatases (PhosSTOP, Roche). Les noyaux et débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 12 000rpm pendant 20 minutes à 4°C, et la quantité de protéines dans les surnageants évaluée par la méthode de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad). Les lysats sont dilués dans du tampon Laemmli (500mM tris pH 6,8 ; 10%SDS ; 10% glycérol ; 5% β -mercaptoéthanol ; 10% de bleu de bromophénol) et les protéines dénaturées 5 minutes à 100°C, puis 50 μ g de protéines sont déposés sur gel d'acrylamide 10%. Un marqueur de poids moléculaires (Fermentas) est également déposé. Les protéines séparées par électrophorèse sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare Life Sciences). Après 2h de saturation en TTBS (0,1% Tween 20 (Sigma), 10% TBS 10X) 5% lait, la membrane est incubée la nuit à 4°C avec un anticorps anti-Fam65b (Abnova) en TBS-Tween 20 0,1%-BSA 5% et anti-actine β (Sigma) ou anti-eIF-4E (Santa Cruz). Après un lavage rapide en TTBS puis 3 lavages en TTBS sur le système SNAP i.d. 2.0 (Millipore), la membrane est incubée pendant 10 minutes avec un anticorps secondaire couplé à la HRP (Jackson Laboratory). Après aspiration de la solution contenant l'anticorps secondaire, la membrane est lavée 3 fois en TTBS. La révélation s'effectue grâce à un kit ECL (GE Healthcare Life Sciences). La lumière émise est détectée à l'aide d'une caméra (Fusion FX7, Vilbert Lourmat).

Pour l'analyse du niveau de tubuline acétylée 5.10⁶ LT murins sont lavés en PBS et lysés pendant 30 min à 4°C dans 30 μ L de tampon RIPA (50mM Tris HCl

pH8, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 2mM EDTA) en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche) puis analysés par western blot comme décrit ci-dessus.

Pour l'immunoprécipitation, les cellules transfectées sont lavées dans du PBS froid et lysées dans 1mL de tampon de lyse (10mM HEPES pH7.5; 150mM KCl; 0,1% NP-40; 10 μ M SAHA (Sigma Aldrich); 40 μ M Tubacine (Sigma Aldrich); 50 μ M Nicotinamide (Sigma Aldrich); Complete EDTA-free (Roche); PhosSTOP (Roche)) pendant 30 minutes à 4°C. Les lysats sont collectés après centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes. 40 μ L de chaque lysat est conservé et utilisé comme contrôle. 20 μ L de billes couplées à un Ac anti-Myc (EZ myc beads, Sigma Aldrich) sont prélavées trois fois dans du tampon de lyse et ajoutées aux lysats. Après 2h d'incubation sur roue à 4°C, les billes sont lavées trois fois dans du tampon de lyse et resuspendues dans 100 μ L de TBS1X contenant 10 μ g/mL de peptide Myc pendant 30 minutes sous agitation à 4°C. Après centrifugation, 70 μ L du surnageant contenant les complexes protéiques sans les billes est récupéré et chauffé à 100°C pendant 5 minutes dans du Laemli 5X. Les échantillons sont ensuite soumis à un SDS-PAGE 12%, transférés sur membrane de nitrocellulose et analysés avec les différents Ac indiqués.

L'essai pull down est réalisé avec des billes contenant du RhoA-GST (Cytoskeleton) comme décrit par (Rougerie et al., 2013).

Tri des PBT et Western Blot

Les PBT sont stimulés par des billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Dynabeads, Life Technologies) à raison d'une bille pour 5 cellules en RPMI 10% SAB et réparties dans une plaque 96 puits à fond rond (2.10⁵ cellules par puits) puis placés à l'étuve. Après 3 jours de culture, les cellules sont marquées avec du DRAQ 5 (BioStatus) et triées à l'aide d'un cytomètre trieur de cellules ARIA3 (BD Biosciences). Les cellules sont lysées 30 minutes à 4°C dans un tampon de lyse (20mM Bicine, pH7.6; 0,6% CHAPS) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free, Roche) et de phosphatases (PhosSTOP, Roche). Les lysats sont dilués dans du tampon Laemmli (500mM tris pH 6,8; 10%SDS; 10% glycérol; 5% β -mercaptoéthanol; 10% de bleu de bromophénol) et les protéines dénaturées 5 minutes à 100°C. Les échantillons sont soumis à un SDS-PAGE et les protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose comme indiqué précédemment.

Statistiques

Les différences significatives entre les groupes ont été évaluées grâce à un t-test de Student, calculé avec le logiciel Prism 5 (GraphPad Software). La p value est représentée par : * p compris entre 0,05 et 0,01, ** p compris entre 0,01 et 0,001, *** p inférieur à 0,001, ns : non significatif.

Bibliographie

- Agace, W. W. (2006). Tissue-tropic effector T cells : generation and targeting opportunities. *Nature Reviews Immunology* 6, 682–692.
- Aitken, A., Baxter, H., Dubois, T., Clokie, S., Mackie, S., Mitchell, K., Peden, A. and Zemlickova, E. (2002). Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 351–360.
- Akashi, K., Kondo, M., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R. and Weissman, I. L. (1997). Bcl-2 Rescues T Lymphopoiesis in Interleukin-7 Receptor–Deficient Mice. *Cell* 89, 1033–1041.
- Aksoylar, H. I., Lampe, K., Barnes, M. J., Plas, D. R. and Hoebe, K. (2012). Loss of Immunological Tolerance in Gimap5-Deficient Mice Is Associated with Loss of Foxo in CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology* 188, 146–154.
- Al-Mubarak, B., Soriano, F. X. and Hardingham, G. E. (2009). Synaptic NMDAR activity suppresses FOXO1 expression via a cis-acting FOXO binding site : FOXO1 is a FOXO target gene. *Channels (Austin)* 3, 233–238.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Current Biology* 7, 261–269.
- Alexander, A., Cai, S.-L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K. H., Inoki, K., Guan, K.-L., Shen, J., Person, M. D., Kusewitt, D., Mills, G. B., Kastan, M. B. and Walker, C. L. (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *PNAS* 107, 4153–4158.
- Allam, A., Conze, D. B., Giardino Torchia, M. L., Munitic, I., Yagita, H., Sowell, R. T., Marzo, A. L. and Ashwell, J. D. (2009). The CD8+ memory T-cell state of readiness is actively maintained and reversible. *Blood* 114, 2121–2130.
- Andrews, R. K., Harris, S. J., McNally, T. and Berndt, M. C. (1998). Binding of Purified 14-3-3 ζ Signaling Protein to Discrete Amino Acid Sequences within the Cytoplasmic Domain of the Platelet Membrane Glycoprotein Ib-IX-V Complex [†]. *Biochemistry* 37, 638–647.
- Anikeeva, N. and Sykulev, Y. (2011). Mechanisms controlling granule-mediated cytolytic activity of cytotoxic T lymphocytes. *Immunologic Research* 51, 183–194.
- Annabi, B., Bouzeghrane, M., Currie, J.-C., Hawkins, R., Dulude, H., Daigneault, L., Ruiz, M., Wisniewski, J., Garde, S., Rabbani, S. A., Panchal, C., Wu, J. J.

- and Béliveau, R. (2005a). A PSP94-derived Peptide PCK3145 inhibits MMP-9 Secretion and Triggers CD44 Cell Surface Shedding : Implication in Tumor Metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 22, 429–439.
- Annabi, B., Bouzeghrane, M., Moundjian, R., Moghrabi, A. and Béliveau, R. (2005b). Probing the infiltrating character of brain tumors : inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCG : RhoA triggers CD44 cell surface shedding. *Journal of Neurochemistry* 94, 906–916.
- Aoki, M., Jiang, H. and Vogt, P. K. (2004). Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 13613–13617.
- Appleman, L. J., van Puijenbroek, A. A. F. L., Shu, K. M., Nadler, L. M. and Boussiotis, V. A. (2002). CD28 Costimulation Mediates Down-Regulation of p27kip1 and Cell Cycle Progression by Activation of the PI3K/PKB Signaling Pathway in Primary Human T Cells. *The Journal of Immunology* 168, 2729–2736.
- Araki, K., Turner, A. P., Shaffer, V. O., Gangappa, S., Keller, S. A., Bachmann, M. F., Larsen, C. P. and Ahmed, R. (2009). mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 460, 108–112.
- Arnold, C. P., Tan, R., Zhou, B., Yue, S.-B., Schaffert, S., Biggs, J. R., Doyonnas, R., Lo, M.-C., Perry, J. M., Renault, V. M., Sacco, A., Somervaille, T., Viatour, P., Brunet, A., Cleary, M. L., Li, L., Sage, J., Zhang, D.-E., Blau, H. M., Chen, C. and Chen, C.-Z. (2011). MicroRNA programs in normal and aberrant stem and progenitor cells. *Genome Res.* 21, 798–810.
- Ashworth, A. (2008). A Synthetic Lethal Therapeutic Approach : Poly(ADP) Ribose Polymerase Inhibitors for the Treatment of Cancers Deficient in DNA Double-Strand Break Repair. *Journal of Clinical Oncology* 26, 3785–3790.
- Au-Yeung, B. B., Levin, S. E., Zhang, C., Hsu, L.-Y., Cheng, D. A., Killeen, N., Shokat, K. M. and Weiss, A. (2010). A genetically selective inhibitor demonstrates a function for the kinase Zap70 in regulatory T cells independent of its catalytic activity. *Nature Immunology* 11, 1085–1092.
- Bachmaier, K., Krawczyk, C., Kozieradzki, I., Kong, Y. Y., Sasaki, T., Oliveira-dos Santos, A., Mariathasan, S., Bouchard, D., Wakeham, A., Itie, A., Le, J., Ohashi, P. S., Sarosi, I., Nishina, H., Lipkowitz, S. and Penninger, J. M. (2000). Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* 403, 211–216.
- Badovinac, V. P. (2000). Regulation of Antigen-Specific CD8+ T Cell Homeostasis by Perforin and Interferon-gamma. *Science* 290, 1354–1357.
- Badovinac, V. P., Porter, B. B. and Harty, J. T. (2004). CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature Immunology* 5, 809–817.
- Bai, A., Hu, H., Yeung, M. and Chen, J. (2007). Krüppel-Like Factor 2 Controls T Cell Trafficking by Activating L-Selectin (CD62L) and Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Transcription. *J Immunol* 178, 7632–7639.

- Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., Kirkland, J. L. and van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236.
- Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K. and Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249, 912–915.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120, 483–495.
- Balagopalan, L., Barr, V. A., Sommers, C. L., Barda-Saad, M., Goyal, A., Isakowitz, M. S. and Samelson, L. E. (2007). c-Cbl-Mediated Regulation of LAT-Nucleated Signaling Complexes. *Molecular and Cellular Biology* 27, 8622–8636.
- Balasubramanian, A., Kawahara, G., Gupta, V. A., Rozkalne, A., Beauvais, A., Kunkel, L. M. and Gussoni, E. (2014). Fam65b is important for formation of the HDAC6-dysferlin protein complex during myogenic cell differentiation. *The FASEB Journal* 28, 2955–2969.
- Balzano, C., Buonavista, N., Rouvier, E. and Golstein, P. (1992). CTLA-4 and CD28 : similar proteins, neighbouring genes. *Int. J. Cancer Suppl.* 7, 28–32.
- Barnes, K., Ingram, J. C., Porras, O. H., Barros, L. F., Hudson, E. R., Fryer, L. G. D., Foufelle, F., Carling, D., Hardie, D. G. and Baldwin, S. A. (2002). Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress : potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Cell. Sci.* 115, 2433–2442.
- Barros, L. F., Young, M., Saklatvala, J. and Baldwin, S. A. (1997). Evidence of two mechanisms for the activation of the glucose transporter GLUT1 by anisomycin : p38(MAP kinase) activation and protein synthesis inhibition in mammalian cells. *The Journal of Physiology* 504, 517–525.
- Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J. (1996). The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Current Opinion in Cell Biology* 8, 805–814.
- Beauséjour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P. and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence : roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22, 4212–4222.
- Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A. and Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-specific Memory CD8 T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 1541–1548.
- Berberi, N. F., O'Connor, A. K., Haycraft, C. J. and Yoder, B. K. (2009). The Primary Cilium as a Complex Signaling Center. *Current Biology* 19, R526–R535.
- Bernstein, B. E., Meissner, A. and Lander, E. S. (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell* 128, 669–681.
- Bird, J. J., Brown, D. R., Mullen, A. C., Moskowitz, N. H., Mahowald, M. A., Sider, J. R., Gajewski, T. F., Wang, C.-R. and Reiner, S. L. (1998). Helper T Cell Differentiation Is Controlled by the Cell Cycle. *Immunity* 9, 229–237.

- Birkenkamp, K. U. and Coffey, P. J. (2003). FOXO Transcription Factors as Regulators of Immune Homeostasis : Molecules to Die for? *J Immunol* 171, 1623–1629.
- Blagih, J., Krawczyk, C. M. and Jones, R. G. (2012). LKB1 and AMPK : central regulators of lymphocyte metabolism and function. *Immunological Reviews* 249, 59–71.
- Blanpain, C., Lowry, W. E., Geoghegan, A., Polak, L. and Fuchs, E. (2004). Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. *Cell* 118, 635–648.
- Blattman, J. N., Grayson, J. M., Wherry, E. J., Kaech, S. M., Smith, K. A. and Ahmed, R. (2003). Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nature Medicine* 9, 540–547.
- Boonen, G. J., van Dijk, A. M., Verdonck, L. F., van Lier, R. A., Rijksen, G. and Medema, R. H. (1999). CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 29, 789–798.
- Boyault, C., Zhang, Y., Fritah, S., Caron, C., Gilquin, B., Kwon, S. H., Garrido, C., Yao, T.-P., Vourc'h, C., Matthias, P. and Khochbin, S. (2007). HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes & Development* 21, 2172–2181.
- Boyman, O., Létourneau, S., Krieg, C. and Sprent, J. (2009). Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *European Journal of Immunology* 39, 2088–2094.
- Braun, A., Worbs, T., Moschovakis, G. L., Halle, S., Hoffmann, K., Bölter, J., Münk, A. and Förster, R. (2011). Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nature Immunology* 12, 879–887.
- Bromley, S. K., Mempel, T. R. and Luster, A. D. (2008). Orchestrating the orchestrators : chemokines in control of T cell traffic. *Nature Immunology* 9, 970–980.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E. (1999). Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* 96, 857–868.
- Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E. and Yaffe, M. B. (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *The Journal of Cell Biology* 156, 817–828.
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A. and Greenberg, M. E. (2001). Protein Kinase SGK Mediates Survival Signals by Phosphorylating the Forkhead Transcription Factor FKHL1 (FOXO3a). *Molecular and Cellular Biology* 21, 952–965.

- Bruniquel, D. and Schwartz, R. H. (2003). Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nature Immunology* *4*, 235–240.
- Bulavin, D. V., Higashimoto, Y., Demidenko, Z. N., Meek, S., Graves, P., Phillips, C., Zhao, H., Moody, S. A., Appella, E., Piwnica-Worms, H. and Fornace, A. J. (2003). Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry. *Nature Cell Biology* *5*, 545–551.
- Cairns, J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* *255*, 197–200.
- Campisi, J. (2011). Cellular senescence : putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev* *21*, 107–112.
- Cantrell, D. A. (2003). GTPases and T cell activation. *Immunological Reviews* *192*, 122–130.
- Carlson, C. M., Endrizzi, B. T., Wu, J., Ding, X., Weinreich, M. A., Walsh, E. R., Wani, M. A., Lingrel, J. B., Hogquist, K. A. and Jameson, S. C. (2006). Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* *442*, 299–302.
- Carrio, R., Rolle, C. E. and Malek, T. R. (2007). Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8+ memory T cells. *European Journal of Immunology* *37*, 3078–3088.
- Castrillon, D. H. (2003). Suppression of Ovarian Follicle Activation in Mice by the Transcription Factor Foxo3a. *Science* *301*, 215–218.
- Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* *401*, 616–620.
- Chandele, A., Joshi, N. S., Zhu, J., Paul, W. E., Leonard, W. J. and Kaeck, S. M. (2008). Formation of IL-7R high and IL-7R low CD8 T Cells during Infection Is Regulated by the Opposing Functions of GABP and Gfi-1. *The Journal of Immunology* *180*, 5309–5319.
- Chang, J. T., Palanivel, V. R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A. M., Banerjee, A., Longworth, S. A., Vinup, K. E., Mrass, P., Oliaro, J., Killeen, N., Orange, J. S., Russell, S. M., Weninger, W. and Reiner, S. L. (2007). Asymmetric T Lymphocyte Division in the Initiation of Adaptive Immune Responses. *Science* *315*, 1687–1691.
- Charvet, C., Canonigo, A. J., Becart, S., Maurer, U., Miletic, A. V., Swat, W., Deckert, M. and Altman, A. (2006). Vav1 Promotes T Cell Cycle Progression by Linking TCR/CD28 Costimulation to FOXO1 and p27kip1 Expression. *The Journal of Immunology* *177*, 5024–5031.
- Chen, M.-S., Ryan, C. E. and Piwnica-Worms, H. (2003). Chk1 Kinase Negatively Regulates Mitotic Function of Cdc25A Phosphatase through 14-3-3 Binding. *Molecular and Cellular Biology* *23*, 7488–7497.
- Cheng, T. (2004). Cell cycle inhibitors in normal and tumor stem cells. *Oncogene* *23*, 7256–7266.

- Cheng, T., Rodrigues, N., Dombkowski, D., Stier, S. and Scadden, D. T. (2000a). Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27kip1. *Nature Medicine* 6, 1235–1240.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y.-g., Dombkowski, D., Sykes, M. and Scadden, D. T. (2000b). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287, 1804–1808.
- Chetty, C., Vanamala, S. K., Gondi, C. S., Dinh, D. H., Gujrati, M. and Rao, J. S. (2012). MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells. *Cellular Signalling* 24, 549–559.
- Cheung, T. H., Quach, N. L., Charville, G. W., Liu, L., Park, L., Edalati, A., Yoo, B., Hoang, P. and Rando, T. A. (2012). Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature* 482, 524–528.
- Cheung, T. H. and Rando, T. A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 329–340.
- Christie, D. and Zhu, J. (2014). Transcriptional regulatory networks for CD4 T cell differentiation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 381, 125–172.
- Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E. and Burley, S. K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364, 412–420.
- Coats, S., Whyte, P., Fero, M. L., Lacy, S., Chung, G., Randel, E., Firpo, E. and Roberts, J. M. (1999). A new pathway for mitogen-dependent Cdk2 regulation uncovered in p27Kip1-deficient cells. *Current Biology* 9, 163–173.
- Coller, H. A. (2007). What’s taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 667–670.
- Compton, H. L. and Farrell, J. P. (2002). CD28 Costimulation and Parasite Dose Combine to Influence the Susceptibility of BALB/c Mice to Infection with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology* 168, 1302–1308.
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P.-Y. and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol* 6.
- Cornish, G. H. (2006). Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood* 108, 600–608.
- Cosentino, C., Grieco, D. and Costanzo, V. (2011). ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair : ATM activates the pentose phosphate pathway. *The EMBO Journal* 30, 546–555.
- Cousins, L., Graham, M., Tooze, R., Carter, C., Miller, J. R., Powrie, F. M., Macpherson, G. G. and Butcher, G. W. (2006). Eosinophilic Bowel Disease Controlled by the BB Rat-Derived Lymphopenia/Gimap5 Gene. *Gastroenterology* 131, 1475–1485.

- Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S. and Bustelo, X. R. (1997). Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. , Published online : 09 January 1997; | doi :10.1038/385169a0 385, 169–172.
- Cui, W., Joshi, N. S., Jiang, A. and Kaech, S. M. (2009). Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming : Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. *Vaccine* 27, 2177–2187.
- Cui, W. and Kaech, S. M. (2010). Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells : Effector and memory T-cell differentiation. *Immunological Reviews* 236, 151–166.
- Dakour, J., Li, H. and Morrish, D. W. (1997). PL48 : a novel gene associated with cytotrophoblast and lineage-specific HL-60 cell differentiation. *Gene* 185, 153–157.
- Dalal, S. N., Yaffe, M. B. and DeCaprio, J. A. (2004). 14-3-3 family members act coordinately to regulate mitotic progression. *Cell Cycle* 3, 672–677.
- Dao, M. A., Taylor, N. and Nolta, J. A. (1998). Reduction in levels of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip-1 coupled with transforming growth factor β neutralization induces cell-cycle entry and increases retroviral transduction of primitive human hematopoietic cells. *PNAS* 95, 13006–13011.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M. E. (1997). Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* 91, 231–241.
- Datta, S. R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S. W., Yaffe, M. B. and Greenberg, M. E. (2000). 14-3-3 Proteins and Survival Kinases Cooperate to Inactivate BAD by BH3 Domain Phosphorylation. *Molecular Cell* 6, 41–51.
- de la Vega, M., Burrows, J. F. and Johnston, J. A. (2011). Ubiquitination : Added complexity in Ras and Rho family GTPase function. *Small GTPases* 2, 192–201.
- de Zoeten, E. F., Wang, L., Butler, K., Beier, U. H., Akimova, T., Sai, H., Bradner, J. E., Mazitschek, R., Kozikowski, A. P., Matthias, P. and Hancock, W. W. (2011). Histone Deacetylase 6 and Heat Shock Protein 90 Control the Functions of Foxp3+ T-Regulatory Cells. *Molecular and Cellular Biology* 31, 2066–2078.
- Dejean, A. S., Beisner, D. R., Ch'en, I. L., Kerdiles, Y. M., Babour, A., Arden, K. C., Castrillon, D. H., DePinho, R. A. and Hedrick, S. M. (2009). Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nature Immunology* 10, 504–513.
- Dejean, A. S., Hedrick, S. M. and Kerdiles, Y. M. (2011). Highly Specialized Role of Forkhead Box O Transcription Factors in the Immune System. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 663–674.
- Delon, J. and Germain, R. N. (2000). Information transfer at the immunological synapse. *Current Biology* 10, R923–R933.

- Dhanyamraju, P. K., Holz, P. S., Finkernagel, F., Fendrich, V. and Lauth, M. (2015). Histone Deacetylase 6 Represents a Novel Drug Target in the Oncogenic Hedgehog Signaling Pathway. *Mol Cancer Ther* 14, 727–739.
- Dhawan, J. and Laxman, S. (2015). Decoding the stem cell quiescence cycle – lessons from yeast for regenerative biology. *J Cell Sci* 128, 4467–4474.
- Diaz-Horta, O., Subasioglu-Uzak, A., Grati, M., DeSmidt, A., Foster, J., Cao, L., Bademci, G., Tokgoz-Yilmaz, S., Duman, D., Cengiz, F. B., Abad, C., Mittal, R., Blanton, S., Liu, X. Z., Farooq, A., Walz, K., Lu, Z. and Tekin, M. (2014). FAM65B is a membrane-associated protein of hair cell stereocilia required for hearing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 9864–9868.
- Ding, L., Linsley, P. S., Huang, L. Y., Germain, R. N. and Shevach, E. M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* 151, 1224–1234.
- Donzelli, M. and Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Reports* 4, 671–677.
- Dowling, M. R., Kan, A., Heinzl, S., Zhou, J. H. S., Marchingo, J. M., Wellard, C. J., Markham, J. F. and Hodgkin, P. D. (2014). Stretched cell cycle model for proliferating lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 6377–6382.
- Eijkelenboom, A. and Burgering, B. M. T. (2013). FOXOs : signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 83–97.
- Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C. Y., Coffier, P. J. and Demoulin, J.-B. (2009). The Transcription of FOXO Genes Is Stimulated by FOXO3 and Repressed by Growth Factors. *Journal of Biological Chemistry* 284, 10334–10342.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629–635.
- Ewen, M. E., Xing, Y., Lawrence, J. B. and Livingston, D. M. (1991). Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* 66, 1155–1164.
- Fabre, S., Carrette, F., Chen, J., Lang, V., Semichon, M., Denoyelle, C., Lazar, V., Cagnard, N., Dubart-Kupperschmitt, A., Mangeney, M., Fruman, D. A. and Bismuth, G. (2008). FOXO1 Regulates L-Selectin and a Network of Human T Cell Homing Molecules Downstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *The Journal of Immunology* 181, 2980–2989.
- Fabre, S., Lang, V., Harriague, J., Jobart, A., Unterman, T. G., Trautmann, A. and Bismuth, G. (2005). Stable Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in the T Cell Immunological Synapse Stimulates Akt Signaling to FoxO1 Nuclear Exclusion and Cell Growth Control. *The Journal of Immunology* 174, 4161–4171.
- Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q., Sessa, W. C., Qin, J., Zhang, P., Su, B. and Jacinto, E. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls

folding and stability of Akt and protein kinase C. *The EMBO Journal* 27, 1932–1943.

Fausto, N. (2004). Liver regeneration and repair : Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 39, 1477–1487.

Feng, X., Ippolito, G. C., Tian, L., Wiehagen, K., Oh, S., Sambandam, A., Willen, J., Bunte, R. M., Maika, S. D., Harriss, J. V., Caton, A. J., Bhandoola, A., Tucker, P. W. and Hu, H. (2010). Foxp1 is an essential transcriptional regulator for the generation of quiescent naive T cells during thymocyte development. *Blood* 115, 510–518.

Feng, X., Wang, H., Takata, H., Day, T. J., Willen, J. and Hu, H. (2011). Transcription factor Foxp1 exerts essential cell-intrinsic regulation of the quiescence of naive T cells. *Nature Immunology* 12, 544–550.

Ferguson, A. R. and Engelhard, V. H. (2010). CD8 T Cells Activated in Distinct Lymphoid Organs Differentially Express Adhesion Proteins and Coexpress Multiple Chemokine Receptors. *The Journal of Immunology* 184, 4079–4086.

Finetti, F. and Baldari, C. T. (2013). Compartmentalization of signaling by vesicular trafficking : a shared building design for the immune synapse and the primary cilium. *Immunological Reviews* 251, 97–112.

Finetti, F., Paccani, S. R., Riparbelli, M. G., Giacomello, E., Perinetti, G., Pazour, G. J., Rosenbaum, J. and Baldari, C. T. (2009). Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat Cell Biol* 11, 1332–1339.

Finetti, F., Paccani, S. R., Rosenbaum, J. and Baldari, C. T. (2011). Intraflagellar transport : a new player at the immune synapse. *Trends Immunol* 32, 139–145.

Fischer, K.-D., Zmuidzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A. and Guidos, C. (1995). Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+CDS+thymocytes. , Published online : 30 March 1995; | doi :10.1038/374474a0 374, 474–476.

Fischer, S. F., Belz, G. T. and Strasser, A. (2008). BH3-only protein Puma contributes to death of antigen-specific T cells during shutdown of an immune response to acute viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 3035–3040.

Forcioli-Conti, N., Estève, D., Bouloumié, A., Dani, C. and Peraldi, P. (2016). The size of the primary cilium and acetylated tubulin are modulated during adipocyte differentiation : Analysis of HDAC6 functions in these processes. *Biochimie* 124, 112–123.

Forsberg, E. C., Passequé, E., Prohaska, S. S., Wagers, A. J., Koeva, M., Stuart, J. M. and Weissman, I. L. (2010). Molecular Signatures of Quiescent, Mobilized and Leukemia-Initiating Hematopoietic Stem Cells. *PLoS ONE* 5, e8785.

Fujita, N. (2002). Akt-dependent Phosphorylation of p27Kip1 Promotes Binding to 14-3-3 and Cytoplasmic Localization. *Journal of Biological Chemistry* 277, 28706–28713.

- Fukada, M., Hanai, A., Nakayama, A., Suzuki, T., Miyata, N., Rodriguez, R. M., Wetsel, W. C., Yao, T.-P. and Kawaguchi, Y. (2012). Loss of Deacetylation Activity of Hdac6 Affects Emotional Behavior in Mice. *PLoS ONE* 7, e30924.
- Fukada, S.-i., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y. and Takeda, S. (2007). Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells in Adult Skeletal Muscle. *Stem Cells* 25, 2448–2459.
- Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I. and Mori, N. (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochemical Journal* 349, 629–634.
- Galandrini, R., Henning, S. W. and Cantrell, D. A. (1997). Different Functions of the GTPase Rho in Prothymocytes and Late Pre-T Cells. *Immunity* 7, 163–174.
- Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y. A., Chin, L. and DePinho, R. A. (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature* 468, 701–704.
- Gao, K., Tang, W., Li, Y., Zhang, P., Wang, D., Yu, L., Wang, C. and Wu, D. (2015). Front-signal-dependent accumulation of the RHOA inhibitor FAM65B at leading edges polarizes neutrophils. *Journal of Cell Science* 128, 992–1000.
- Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. and Kirschner, M. W. (1991). cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* 67, 197–211.
- Gerard, A., Ghiotto, M., Fos, C., Guittard, G., Compagno, D., Galy, A., Lemay, S., Olive, D. and Nunes, J. A. (2009). Dok-4 Is a Novel Negative Regulator of T Cell Activation. *The Journal of Immunology* 182, 7681–7689.
- Gett, A. V. and Hodgkin, P. D. (1998). Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *PNAS* 95, 9488–9493.
- Giagulli, C., Scarpini, E., Ottoboni, L., Narumiya, S., Butcher, E. C., Constantin, G. and Laudanna, C. (2004). RhoA and ζ PKC Control Distinct Modalities of LFA-1 Activation by Chemokines. *Immunity* 20, 25–35.
- Gökirmak, T., Paul, A.-L. and Ferl, R. J. (2010). Plant phosphopeptide-binding proteins as signaling mediators. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 527–532.
- Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D. and Butz, E. A. (2002). Cytokine Requirements for Acute and Basal Homeostatic Proliferation of Naïve and Memory CD8⁺ T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 1515–1522.
- Gradilone, S. A., Radtke, B. N., Bogert, P. S., Huang, B. Q., Gajdos, G. B. and LaRusso, N. F. (2013). HDAC6 Inhibition Restores Ciliary Expression and Decreases Tumor Growth. *Cancer Research* 73, 2259–2270.
- Graves, P. R., Lovly, C. M., Uy, G. L. and Piwnicka-Worms, H. (2001). Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* 20, 1839–1851.

- Grayson, J. M., Murali-Krishna, K., Altman, J. D. and Ahmed, R. (2001). Gene Expression in Antigen-Specific CD8+ T Cells During Viral Infection. *The Journal of Immunology* 166, 795–799.
- Greer, S. N., Metcalf, J. L., Wang, Y. and Ohh, M. (2012). The updated biology of hypoxia-inducible factor : The updated biology of HIF. *The EMBO Journal* 31, 2448–2460.
- Grogan, J. L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D. A., Sedat, J. W. and Locksley, R. M. (2001). Early Transcription and Silencing of Cytokine Genes Underlie Polarization of T Helper Cell Subsets. *Immunity* 14, 205–215.
- Grusby, M., Johnson, R., Papaioannou, V. and Glimcher, L. (1991). Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 253, 1417–1420.
- Grusby, M. J., Auchincloss, H., Lee, R., Johnson, R. S., Spencer, J. P., Zijlstra, M., Jaenisch, R., Papaioannou, V. E. and Glimcher, L. H. (1993). Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3913–3917.
- Gubbels Bupp, M. R., Edwards, B., Guo, C., Wei, D., Chen, G., Wong, B., Masteller, E. and Peng, S. L. (2009). T cells require *Foxo1* to populate the peripheral lymphoid organs. *European Journal of Immunology* 39, 2991–2999.
- Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R. and Young, R. A. (2007). A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell* 130, 77–88.
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J. and Sabatini, D. M. (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Developmental Cell* 11, 859–871.
- Guittard, G., Gerard, A., Dupuis-Coronas, S., Tronchere, H., Mortier, E., Favre, C., Olive, D., Zimmermann, P., Payrastre, B. and Nunes, J. A. (2009). Cutting Edge : Dok-1 and Dok-2 Adaptor Molecules Are Regulated by Phosphatidylinositol 5-Phosphate Production in T Cells. *The Journal of Immunology* 182, 3974–3978.
- Guittard, G., Mortier, E., Tronchère, H., Firaguay, G., Gérard, A., Zimmermann, P., Payrastre, B. and Nunès, J. A. (2010). Evidence for a positive role of PtdIns5P in T-cell signal transduction pathways. *FEBS Letters* 584, 2455–2460.
- Gunzer, M., Schäfer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zänker, K. S., Bröcker, E.-B., Kämpgen, E. and Friedl, P. (2000). Antigen Presentation in Extracellular Matrix. *Immunity* 13, 323–332.
- Gurumurthy, S., Xie, S. Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R. Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., Park, P. J., Shirihai, O. S., Scadden, D. T. and Bardeesy, N. (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature* 468, 659–663.

- Guttilla, I. K. and White, B. A. (2009). Coordinate Regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 23204–23216.
- Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 4389–4394.
- Hamilton, S. E. and Jameson, S. C. (2012). CD8 T cell quiescence revisited. *Trends Immunol* *33*, 224–230.
- Hannon, G. J., Demetrick, D. and Beach, D. (1993). Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev.* *7*, 2378–2391.
- Harada, Y., Harada, Y., Elly, C., Ying, G., Paik, J.-H., DePinho, R. A. and Liu, Y.-C. (2010). Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* *207*, 1381–1391.
- Hatta, M. and Cirillo, L. A. (2007). Chromatin Opening and Stable Perturbation of Core Histone :DNA Contacts by FoxO1. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 35583–35593.
- Hellquist, A., Zucchelli, M., Kivinen, K., Saarialho-Kere, U., Koskenmies, S., Widen, E., Julkunen, H., Wong, A., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Skoog, T., Vendelin, J., Cunninghame-Graham, D. S., Vyse, T. J., Kere, J. and Lindgren, C. M. (2007). The human GIMAP5 gene has a common polyadenylation polymorphism increasing risk to systemic lupus erythematosus. *Journal of Medical Genetics* *44*, 314–321.
- Henning, S. W., Galandrini, R., Hall, A. and Cantrell, D. A. (1997). The GTPase Rho has a critical regulatory role in thymus development. *The EMBO Journal* *16*, 2397–2407.
- Henrickson, S. E., Mempel, T. R., Mazo, I. B., Liu, B., Artyomov, M. N., Zheng, H., Peixoto, A., Flynn, M., Senman, B., Junt, T., Wong, H. C., Chakraborty, A. K. and von Andrian, U. H. (2008a). In Vivo Imaging of T Cell Priming. *Science Signaling* *1*, pt2–pt2.
- Henrickson, S. E., Mempel, T. R., Mazo, I. B., Liu, B., Artyomov, M. N., Zheng, H., Peixoto, A., Flynn, M. P., Senman, B., Junt, T., Wong, H. C., Chakraborty, A. K. and von Andrian, U. H. (2008b). T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nature Immunology* *9*, 282–291.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.-C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 σ Is a p53-Regulated Inhibitor of G2/M Progression. *Molecular Cell* *1*, 3–11.
- Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Belloc, F., Praloran, V. and Ivanovic, Z. (2006). Very Low O₂ Concentration (0.1%) Favors G₀ Return of Dividing CD34⁺ Cells. *Stem Cells* *24*, 65–73.

- Hildeman, D. A., Zhu, Y., Mitchell, T. C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J. and Marrack, P. (2002). Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* 16, 759–767.
- Hirayama, E. and Kim, J. (2008). Identification and characterization of a novel neural cell adhesion molecule (NCAM)-associated protein from quail myoblasts : relationship to myotube formation and induction of neurite-like protrusions. *Differentiation* 76, 253–266.
- Hizawa, N., Yamaguchi, E., Jinushi, E., Konno, S., Kawakami, Y. and Nishimura, M. (2001). Increased total serum IgE levels in patients with asthma and promoter polymorphisms at CTLA4 and FCER1B*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108, 74–79.
- Hochweller, K., Wabnitz, G. H., Samstag, Y., Suffner, J., Hämmerling, G. J. and Garbi, N. (2010). Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5931–5936.
- Hosaka, T., Biggs, W. H., Tieu, D., Boyer, A. D., Varki, N. M., Cavenee, W. K. and Arden, K. C. (2004). Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 2975–2980.
- Hu, M. C.-T., Lee, D.-F., Xia, W., Golfman, L. S., Ou-Yang, F., Yang, J.-Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., Kobayashi, R. and Hung, M.-C. (2004). I κ B Kinase Promotes Tumorigenesis through Inhibition of Forkhead FOXO3a. *Cell* 117, 225–237.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F. and Yao, T.-P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458.
- Iezzi, G., Karjalainen, K. and Lanzavecchia, A. (1998). The Duration of Antigenic Stimulation Determines the Fate of Naive and Effector T Cells. *Immunity* 8, 89–95.
- Ishiguro, K., Ando, T., Maeda, O., Watanabe, O. and Goto, H. (2011). Cutting Edge : Tubulin Functions as an Adaptor in NFAT-Importin Interaction. *The Journal of Immunology* 186, 2710–2713.
- Ishikawa, H. and Marshall, W. F. (2011). Ciliogenesis : building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 222–234.
- Ivetic, A., Florey, O., Deka, J., Haskard, D. O., Ager, A. and Ridley, A. J. (2004). Mutagenesis of the Ezrin-Radixin-Moesin Binding Domain of L-selectin Tail Affects Shedding, Microvillar Positioning, and Leukocyte Tethering. *Journal of Biological Chemistry* 279, 33263–33272.
- Iyengar, S., Hildreth, J. E. and Schwartz, D. H. (1998). Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *J. Virol.* 72, 5251–5255.
- Jacobs, F. M. J., van der Heide, L. P., Wijchers, P. J. E. C., Burbach, J. P. H., Hoekman, M. F. M. and Smidt, M. P. (2003). FoxO6, a Novel Member of the

- FoxO Class of Transcription Factors with Distinct Shuttling Dynamics. *Journal of Biological Chemistry* 278, 35959–35967.
- Jacobs, S. R., Herman, C. E., MacIver, N. J., Wofford, J. A., Wieman, H. L., Hammen, J. J. and Rathmell, J. C. (2008). Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *The Journal of Immunology* 180, 4476–4486.
- Jaffe, A. B. and Hall, A. (2005). RHO GTPASES : Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 247–269.
- Jameson, S. C. (2002). Maintaining the norm : T-cell homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 2, 547–556.
- Jernigan, K. M., Blumenthal, R. and Puri, A. (2000). Varying effects of temperature, Ca^{2+} and cytochalasin on fusion activity mediated by human immunodeficiency virus type 1 and type 2 glycoproteins. *FEBS Letters* 474, 246–251.
- Jiang, K., Pereira, E., Maxfield, M., Russell, B., Godelock, D. M. and Sanchez, Y. (2003). Regulation of Chk1 Includes Chromatin Association and 14-3-3 Binding following Phosphorylation on Ser-345. *Journal of Biological Chemistry* 278, 25207–25217.
- Johnson, D. G. and Schneider-Broussard, R. (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front. Biosci.* 3, d447–448.
- Kaech, S. M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D. and Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature Immunology* 4, 1191–1198.
- Kaech, S. M., Wherry, E. J. and Ahmed, R. (2002). VACCINES : EFFECTOR AND MEMORY T-CELL DIFFERENTIATION : IMPLICATIONS FOR VACCINE DEVELOPMENT. *Nature Reviews Immunology* 2, 251–262.
- Kane, L. P., Lin, J. and Weiss, A. (2002). It's all Rel-ative : NF- κ B and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends in Immunology* 23, 413–420.
- Katayama, K., Fujita, N. and Tsuruo, T. (2005). Akt/Protein Kinase B-Dependent Phosphorylation and Inactivation of WEE1Hu Promote Cell Cycle Progression at G2/M Transition. *Molecular and Cellular Biology* 25, 5725–5737.
- Kerdiles, Y. M., Beisner, D. R., Tinoco, R., Dejean, A. S., Castrillon, D. H., DePinho, R. A. and Hedrick, S. M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nature Immunology* 10, 176–184.
- Kerdiles, Y. M., Stone, E. L., Beisner, D. L., McGargill, M. A., Ch'en, I. L., Stockmann, C., Katayama, C. D. and Hedrick, S. M. (2010). Foxo Transcription Factors Control Regulatory T Cell Development and Function. *Immunity* 33, 890–904.
- Kiel, M. J., He, S., Ashkenazi, R., Gentry, S. N., Teta, M., Kushner, J. A., Jackson, T. L. and Morrison, S. J. (2007). Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* 449, 238–242.

- Kieper, W. C., Burghardt, J. T. and Surh, C. D. (2004). A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J. Immunol.* *172*, 40–44.
- Kim, E. H., Sullivan, J. A., Plisch, E. H., Tejera, M. M., Jatzek, A., Choi, K. Y. and Suresh, M. (2012). Signal Integration by Akt Regulates CD8 T Cell Effector and Memory Differentiation. *The Journal of Immunology* *188*, 4305–4314.
- King, C. L., Xianli, J., June, C. H., Abe, R. and Lee, K. P. (1996). CD28-deficient mice generate an impaired Th2 response to *Schistosoma mansoni* infection. *European Journal of Immunology* *26*, 2448–2455.
- Kippin, T. E., Martens, D. J. and Kooy, D. v. d. (2005). p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev.* *19*, 756–767.
- Klionsky, D. J. and Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* *290*, 1717–1721.
- Koller, B. H., Marrack, P., Kappler, J. W. and Smithies, O. (1990). Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* *248*, 1227–1230.
- Kops, G. J., de Ruiter, N. D., De Vries-Smits, A. M., Powell, D. R., Bos, J. L. and Burgering, B. M. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* *398*, 630–634.
- Kops, G. J. P. L., Dansen, T. B., Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W. A., Coffey, P. J., Huang, T.-T., Bos, J. L., Medema, R. H. and Burgering, B. M. T. (2002a). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* *419*, 316–321.
- Kops, G. J. P. L., Medema, R. H., Glassford, J., Essers, M. A. G., Dijkers, P. F., Coffey, P. J., Lam, E. W.-F. and Burgering, B. M. T. (2002b). Control of Cell Cycle Exit and Entry by Protein Kinase B-Regulated Forkhead Transcription Factors. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 2025–2036.
- Kovacs, J. J., Murphy, P. J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.-T., Nicchitta, C. V., Yoshida, M., Toft, D. O., Pratt, W. B. and Yao, T.-P. (2005). HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Molecular Cell* *18*, 601–607.
- Kovalev, G. I., Franklin, D. S., Coffield, V. M., Xiong, Y. and Su, L. (2001). An Important Role of CDK Inhibitor p18INK4c in Modulating Antigen Receptor-Mediated T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology* *167*, 3285–3292.
- Kregel, K. C. and Zhang, H. J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging : basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *292*, R18–R36.
- Krummel, M. F. and Macara, I. (2006). Maintenance and modulation of T cell polarity. *Nature Immunology* *7*, 1143–1149.

- Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1999). Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev.* *13*, 1067–1072.
- Laine, A., Martin, B., Luka, M., Mir, L., Auffray, C., Lucas, B., Bismuth, G. and Charvet, C. (2015). Foxo1 Is a T Cell-Intrinsic Inhibitor of the ROR t-Th17 Program. *The Journal of Immunology* *195*, 1791–1803.
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M. and Bertoglio, J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J* *15*, 510–519.
- Lanzavecchia, A., Iezzi, G. and Viola, A. (1999). From TCR Engagement to T Cell Activation. *Cell* *96*, 1–4.
- Laronga, C., Yang, H.-Y., Neal, C. and Lee, M.-H. (2000). Association of the Cyclin-dependent Kinases and 14-3-3 Sigma Negatively Regulates Cell Cycle Progression. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 23106–23112.
- Latner, D. R., Kaech, S. M. and Ahmed, R. (2004). Enhanced Expression of Cell Cycle Regulatory Genes in Virus-Specific Memory CD8+ T Cells. *Journal of Virology* *78*, 10953–10959.
- Lauper, N., Beck, A. R., Cariou, S., Richman, L., Hofmann, K., Reith, W., Slingerland, J. M. and Amati, B. (1998). Cyclin E2 : a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. *Oncogene* *17*, 2637–2643.
- Lea, N. C., Orr, S. J., Stoeber, K., Williams, G. H., Lam, E. W.-F., Ibrahim, M. A. A., Mufti, G. J. and Thomas, N. S. B. (2003). Commitment Point during G0->G1 That Controls Entry into the Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology* *23*, 2351–2361.
- Lee, J., Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (2001). Positive Regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 Proteins. *Molecular Biology of the Cell* *12*, 551–563.
- Lee, W. T., Pasos, G., Cecchini, L. and Mittler, J. N. (2002). Continued Antigen Stimulation Is Not Required During CD4+ T Cell Clonal Expansion. *The Journal of Immunology* *168*, 1682–1689.
- Lehtinen, M. K., Yuan, Z., Boag, P. R., Yang, Y., Villén, J., Becker, E. B., DiBacco, S., de la Iglesia, N., Gygi, S., Blackwell, T. K. and Bonni, A. (2006). A Conserved MST-FOXO Signaling Pathway Mediates Oxidative-Stress Responses and Extends Life Span. *Cell* *125*, 987–1001.
- Levine, A. J. (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* *88*, 323–331.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C. and Altieri, D. C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* *396*, 580–584.
- Li, G., Margueron, R., Ku, M., Chambon, P., Bernstein, B. E. and Reinberg, D. (2010). Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev.* *24*, 368–380.

- Li, Y., Graham, C., Lacy, S., Duncan, A. M. and Whyte, P. (1993). The adenovirus E1A-associated 130-kD protein is encoded by a member of the retinoblastoma gene family and physically interacts with cyclins A and E. *Genes Dev.* **7**, 2366–2377.
- Lin, L., Hron, J. D. and Peng, S. L. (2004). Regulation of NF- κ B, Th Activation, and Autoinflammation by the Forkhead Transcription Factor Foxo3a. *Immunity* **21**, 203–213.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L. A. and Elledge, S. J. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* **14**, 1448–1459.
- Liu, Y., Elf, S. E., Miyata, Y., Sashida, G., Liu, Y., Huang, G., Di Giandomenico, S., Lee, J. M., Deblasio, A., Menendez, S., Antipin, J., Reva, B., Koff, A. and Nimer, S. D. (2009). p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell* **4**, 37–48.
- Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M. and Alt, F. W. (2005). DNA Repair, Genome Stability, and Aging. *Cell* **120**, 497–512.
- Luo, C. T., Liao, W., Dadi, S., Toure, A. and Li, M. O. (2016). Graded Foxo1 activity in Treg cells differentiates tumour immunity from spontaneous autoimmunity. *Nature* **529**, 532–536.
- Macintyre, A. N., Finlay, D., Preston, G., Sinclair, L. V., Waugh, C. M., Tamas, P., Feijoo, C., Okkenhaug, K. and Cantrell, D. A. (2011). Protein Kinase B Controls Transcriptional Programs that Direct Cytotoxic T Cell Fate but Is Dispensable for T Cell Metabolism. *Immunity* **34**, 224–236.
- Mackintosh, C. (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochemical Journal* **381**, 329–342.
- MacRae, T. H. (1997). Tubulin Post-Translational Modifications. *Enzymes and Their Mechanisms of Action. European Journal of Biochemistry* **244**, 265–278.
- Madsen, L., Labrecque, N., Engberg, J., Dierich, A., Svejgaard, A., Benoist, C., Mathis, D. and Fugger, L. (1999). Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10338–10343.
- Malek, T. R. and Castro, I. (2010). Interleukin-2 Receptor Signaling : At the Interface between Tolerance and Immunity. *Immunity* **33**, 153–165.
- Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M., Hieshima, K., Springer, T., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J. and von Andrian, U. (2001). Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 871–878.
- Maraskovsky, E., O'Reilly, L. A., Teepe, M., Corcoran, L. M., Peschon, J. J. and Strasser, A. (1997). Bcl-2 Can Rescue T Lymphocyte Development in Interleukin-7 Receptor-Deficient Mice but Not in Mutant rag-1/- Mice. *Cell* **89**, 1011–1019.
- Martin, B. (2006). Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4+ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood* **108**, 270–277.

- Masopust, D. (2001). Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Science* 291, 2413–2417.
- Matsuyama, A. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal* 21, 6820–6831.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K. and Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 11285–11290.
- Matter, M., Mumprecht, S., Pinschewer, D. D., Pavelic, V., Yagita, H., Krautwald, S., Borst, J. and Ochsenbein, A. F. (2005). Virus-induced polyclonal B cell activation improves protective CTL memory via retained CD27 expression on memory CTL. *European Journal of Immunology* 35, 3229–3239.
- Mayol, X. and Graña, X. (1997). pRB, p107 and p130 as transcriptional regulators : role in cell growth and differentiation. *Prog Cell Cycle Res* 3, 157–169.
- Mayol, X. and Grana, X. (1998). The p130 pocket protein : keeping order at cell cycle exit/re-entrance transitions. *Front. Biosci.* 3, d11–24.
- Mayol, X., Graña, X., Baldi, A., Sang, N., Hu, Q. and Giordano, A. (1993). Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* 8, 2561–2566.
- Mayya, V., Lundgren, D. H., Hwang, S.-I., Rezaul, K., Wu, L., Eng, J. K., Rodionov, V. and Han, D. K. (2009). Quantitative Phosphoproteomic Analysis of T Cell Receptor Signaling Reveals System-Wide Modulation of Protein-Protein Interactions. *Science Signaling* 2, ra46–ra46.
- Meletis, K., Wirta, V., Hede, S.-M., Nistér, M., Lundeberg, J. and Frisén, J. (2006). p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development* 133, 363–369.
- Mempel, T. R., Henrickson, S. E. and von Andrian, U. H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154–159.
- Michalek, R. D. and Rathmell, J. C. (2010). The metabolic life and times of a T-cell : T-cell metabolism and death. *Immunological Reviews* 236, 190–202.
- Michelini, R. H., Doedens, A. L., Goldrath, A. W. and Hedrick, S. M. (2013). Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 1189–1200.
- Mishima, T., Toda, S., Ando, Y., Matsunaga, T. and Inobe, M. (2014). Rapid proliferation of activated lymph node CD4+ T cells is achieved by greatly curtailing the duration of gap phases in cell cycle progression. *Cellular and Molecular Biology Letters* 19.
- Mittrucker, H.-W., Kursar, M., Kohler, A., Hurwitz, R. and Kaufmann, S. H. E. (2001). Role of CD28 for the Generation and Expansion of Antigen-Specific CD8+ T Lymphocytes During Infection with *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Immunology* 167, 5620–5627.

- Mohrin, M., Bourke, E., Alexander, D., Warr, M. R., Barry-Holson, K., Le Beau, M. M., Morrison, C. G. and Passegué, E. (2010). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Promotes Error-Prone DNA Repair and Mutagenesis. *Cell Stem Cell* **7**, 174–185.
- Morin, S., Giroux, V., Favre, C., Bechah, Y., Auphan-Anezin, N., Roncagalli, R., Mège, J.-L., Olive, D., Malissen, M. and Nunes, J. (2015). In the absence of its cytosolic domain, the CD28 molecule still contributes to T cell activation. *Cell Mol Life Sci* **72**, DOI 10.1007/s00018–NaN015.
- Mortensen, M., Soilleux, E. J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A. J., Glanville, J., Knight, S., W. Jacobsen, S.-E., Kranc, K. R. and Simon, A. K. (2011). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *The Journal of Experimental Medicine* **208**, 455–467.
- Mortenson, J. B., Heppler, L. N., Banks, C. J., Weerasekara, V. K., Whited, M. D., Piccolo, S. R., Johnson, W. E., Thompson, J. W. and Andersen, J. L. (2015). Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Promotes the Pro-survival Activity of 14-3-3 ζ via Deacetylation of Lysines within the 14-3-3 ζ Binding Pocket. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 12487–12496.
- Mounier, R., Chrétien, F. and Chazaud, B. (2011). Blood Vessels and the Satellite Cell Niche. In *Current Topics in Developmental Biology* vol. 96, pp. 121–138. Elsevier.
- Munitic, I., Ryan, P. E. and Ashwell, J. D. (2005). T Cells in G1 Provide a Memory-Like Response to Secondary Stimulation. *The Journal of Immunology* **174**, 4010–4018.
- Murali-Krishna, K. (1999). Persistence of Memory CD8 T Cells in MHC Class I-Deficient Mice. *Science* **286**, 1377–1381.
- Murphy, M. A., Schnall, R. G., Venter, D. J., Barnett, L., Bertoncello, I., Thien, C. B. F., Langdon, W. Y. and Bowtell, D. D. L. (1998). Tissue Hyperplasia and Enhanced T-Cell Signalling via ZAP-70 in c-Cbl-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 4872–4882.
- Muslin, A. J., Tanner, J., Allen, P. M. and Shaw, A. S. (1996). Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. *Cell* **84**, 889–897.
- Nakada, D., Saunders, T. L. and Morrison, S. J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* **468**, 653–658.
- Naramura, M., Jang, I.-K., Kole, H., Huang, F., Haines, D. and Gu, H. (2002). c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nature Immunology* **3**, 1192–1199.
- Navarro, M. N., Goebel, J., Feijoo-Carnero, C., Morrice, N. and Cantrell, D. A. (2011). Phosphoproteomic analysis reveals an intrinsic pathway for the regulation of histone deacetylase 7 that controls the function of cytotoxic T lymphocytes. *Nature Immunology* **12**, 352–361.

- Nogales, E. (2000). Structural Insights into Microtubule Function. *Annual Review of Biochemistry* 69, 277–302.
- Nolz, J. C., Starbeck-Miller, G. R. and Harty, J. T. (2011). Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking : parallels and distinctions. *Immunotherapy* 3, 1223–1233.
- Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. (2003). 14-3-3 Interacts Directly with and Negatively Regulates Pro-apoptotic Bax. *Journal of Biological Chemistry* 278, 2058–2065.
- North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M. and Verdin, E. (2003). The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase. *Molecular Cell* 11, 437–444.
- Núñez-Andrade, N., Iborra, S., Trullo, A., Moreno-Gonzalo, O., Calvo, E., Catalán, E., Menasche, G., Sancho, D., Vázquez, J., Yao, T.-P., Martín-Cófreces, N. B. and Sánchez-Madrid, F. (2016). HDAC6 regulates the dynamics of lytic granules in cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Cell Science* 129, 1305–1311.
- Obsil, T., Ghirlando, R., Anderson, D. E., Hickman, A. B. and Dyda, F. (2003). Two 14-3-3 Binding Motifs Are Required for Stable Association of Forkhead Transcription Factor FOXO4 with 14-3-3 Proteins and Inhibition of DNA Binding. *Biochemistry* 42, 15264–15272.
- Obsil, T. and Obsilova, V. (2011). Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 1946–1953.
- Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E. and Obsil, T. (2005). 14-3-3 Protein Interacts with Nuclear Localization Sequence of Forkhead Transcription Factor FoxO4. *Biochemistry* 44, 11608–11617.
- O'Connor, L., Huang, D. C., O'Reilly, L. A. and Strasser, A. (2000). Apoptosis and cell division. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 257–263.
- Oh, H.-M., Yu, C.-R., Golestaneh, N., Amadi-Obi, A., Lee, Y. S., Eseonu, A., Mahdi, R. M. and Egwuagu, C. E. (2011). STAT3 Protein Promotes T-cell Survival and Inhibits Interleukin-2 Production through Up-regulation of Class O Forkhead Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry* 286, 30888–30897.
- Ohgaki, H. and Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science* 100, 2235–2241.
- Osborne, L. C., Dhanji, S., Snow, J. W., Priatel, J. J., Ma, M. C., Miners, M. J., Teh, H.-S., Goldsmith, M. A. and Abraham, N. (2007). Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R α mutant mice. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 619–631.
- Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R. A. and Li, M. O. (2009). An Essential Role of the Forkhead-Box Transcription Factor Foxo1 in Control of T Cell Homeostasis and Tolerance. *Immunity* 30, 358–371.

- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J.-h., DePinho, R. A. and Li, M. O. (2010). Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Nature Immunology* 11, 618–627.
- Ouyang, W. and Li, M. O. (2011). Foxo : in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance. *Trends in Immunology* 32, 26–33.
- Ouyang, W., Liao, W., Luo, C. T., Yin, N., Huse, M., Kim, M. V., Peng, M., Chan, P., Ma, Q., Mo, Y., Meijer, D., Zhao, K., Rudensky, A. Y., Atwal, G., Zhang, M. Q. and Li, M. O. (2012). Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control Treg cell function. *Nature* 491, 554–559.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 11, 961–971.
- Paik, J.-H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J. W., Carrasco, D. R., Jiang, S., Gilliland, D. G., Chin, L., Wong, W. H., Castrillon, D. H. and DePinho, R. A. (2007). FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell* 128, 309–323.
- Pajcini, K. V., Corbel, S. Y., Sage, J., Pomerantz, J. H. and Blau, H. M. (2010). Transient inactivation of Rb and ARF yields regenerative cells from postmitotic mammalian muscle. *Cell Stem Cell* 7, 198–213.
- Pardee, A. B. (1974). A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1286–1290.
- Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.-A., Sackstein, R. and Down, J. D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 5431–5436.
- Pearce, E. L. (2010). Metabolism in T cell activation and differentiation. *Current Opinion in Immunology* 22, 314–320.
- Pearce, E. L., Walsh, M. C., Cepas, P. J., Harms, G. M., Shen, H., Wang, L.-S., Jones, R. G. and Choi, Y. (2009). Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* 460, 103–107.
- Pellegrini, M., Belz, G., Bouillet, P. and Strasser, A. (2003). Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 14175–14180.
- Peng, S. L. (2007). Immune regulation by Foxo transcription factors. *Autoimmunity* 40, 462–469.
- Perego, L. and Berruti, G. (1997). Molecular cloning and tissue-specific expression of the mouse homologue of the rat brain 14-3-3 θ protein : Characterization of its cellular and developmental pattern of expression in the male germ line. *Molecular Reproduction and Development* 47, 370–379.
- Petosa, C., Masters, S. C., Bankston, L. A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H. and Liddington, R. C. (1998). 14-3-3 Binds a Phosphorylated Raf Peptide and an

- Unphosphorylated Peptide via Its Conserved Amphipathic Groove. *Journal of Biological Chemistry* 273, 16305–16310.
- Pham, T. H., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C. G. and Cyster, J. G. (2008). S1P1 Receptor Signaling Overrides Retention Mediated by G α i-Coupled Receptors to Promote T Cell Egress. *Immunity* 28, 122–133.
- Pihlgren, M., Dubois, P. M., Tomkowiak, M., Sjögren, T. and Marvel, J. (1996). Resting Memory CD8+ T Cells are Hyperreactive to Antigenic Challenge In Vitro. *J Exp Med* 184, 2141–2152.
- Pines, J. and Hunter, T. (1989). Isolation of a human cyclin cDNA : Evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* 58, 833–846.
- Pipkin, M. E., Sacks, J. A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M. G., Bevan, M. J. and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity* 32, 79–90.
- Plas, D. R. and Thompson, C. B. (2003). Akt Activation Promotes Degradation of Tuberin and FOXO3a via the Proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 278, 12361–12366.
- Preece, G., Murphy, G. and Ager, A. (1996). Metalloproteinase-mediated regulation of L-selectin levels on leucocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 11634–11640.
- Prlic, M. and Bevan, M. J. (2008). Exploring regulatory mechanisms of CD8+ T cell contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 16689–16694.
- Prosser, S. L. and Morrison, C. G. (2015). Centrin2 regulates CP110 removal in primary cilium formation. *J Cell Biol* 208, 693–701.
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L. and Sellers, W. R. (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* 2, 81–91.
- Rando, T. A. (2006). Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 441, 1080–1086.
- Rando, T. A. (2007). The Immortal Strand Hypothesis : Segregation and Reconstruction. *Cell* 129, 1239–1243.
- Rao, R. R., Li, Q., Bupp, M. R. G. and Shrikant, P. A. (2012). Transcription Factor Foxo1 Represses T-bet-Mediated Effector Functions and Promotes Memory CD8+ T Cell Differentiation. *Immunity* 36, 374–387.
- Rao, R. R., Li, Q., Odunsi, K. and Shrikant, P. A. (2010). The mTOR Kinase Determines Effector versus Memory CD8+ T Cell Fate by Regulating the Expression of Transcription Factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* 32, 67–78.
- Rao, S., Gerondakis, S., Woltring, D. and Shannon, M. F. (2003). c-Rel Is Required for Chromatin Remodeling Across the IL-2 Gene Promoter. *The Journal of Immunology* 170, 3724–3731.

- Rathmell, J. C., Heiden, M. G., Harris, M. H., Frauwirth, K. A. and Thompson, C. B. (2000). In the Absence of Extrinsic Signals, Nutrient Utilization by Lymphocytes Is Insufficient to Maintain Either Cell Size or Viability. *Molecular Cell* 6, 683–692.
- Ratner, S., Sherrod, W. S. and Lichlyter, D. (1997). Microtubule retraction into the uropod and its role in T cell polarization and motility. *J Immunol* 159, 1063–1067.
- Reczek, C. R. and Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology* 33, 8–13.
- Rena, G., Prescott, A. R., Guo, S., Cohen, P. and Unterman, T. G. (2001). Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targetting. *Biochemical Journal* 354, 605–612.
- Renault, V. M., Thekkat, P. U., Hoang, K. L., White, J. L., Brady, C. A., Kenzelmann Broz, D., Venturelli, O. S., Johnson, T. M., Oskoui, P. R., Xuan, Z., Santo, E. E., Zhang, M. Q., Vogel, H., Attardi, L. D. and Brunet, A. (2011). The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. *Oncogene* 30, 3207–3221.
- Rhee, I. and Veillette, A. (2012). Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nature Immunology* 13, 439–447.
- Roberts, M. R. and Bowles, D. J. (1999). Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol.* 119, 1243–1250.
- Roche, M. d. l., Ritter, A. T., Angus, K. L., Dinsmore, C., Earnshaw, C. H., Reiter, J. F. and Griffiths, G. M. (2013). Hedgehog Signaling Controls T Cell Killing at the Immunological Synapse. *Science* 342, 1247–1250.
- Rolli-Derkinderen, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., Baron, C., Henrion, D., Loirand, G. and Pacaud, P. (2005). Phosphorylation of Serine 188 Protects RhoA from Ubiquitin/Proteasome-Mediated Degradation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 96, 1152–1160.
- Rosenblum, M. D., Way, S. S. and Abbas, A. K. (2016). Regulatory T cell memory. *Nature Reviews Immunology* 16, 90–101.
- Rossi, D. J., Jamieson, C. H. and Weissman, I. L. (2008). Stems Cells and the Pathways to Aging and Cancer. *Cell* 132, 681–696.
- Rougerie, P., Largeteau, Q., Megrelis, L., Carrette, F., Lejeune, T., Toffali, L., Rossi, B., Zeghouf, M., Cherfils, J., Constantin, G., Laudanna, C., Bismuth, G., Mangeney, M. and Delon, J. (2013). Fam65b Is a New Transcriptional Target of FOXO1 That Regulates RhoA Signaling for T Lymphocyte Migration. *The Journal of Immunology* 190, 748–755.
- Rutter, G. A., da SILVA XAVIER, G. and Leclerc, I. (2003). Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochemical Journal* 375, 1–16.

- Ryoo, I.-g., Lee, S.-h. and Kwak, M.-K. (2016). Redox Modulating NRF2 : A Potential Mediator of Cancer Stem Cell Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 1–14.
- Salih, D. A. and Brunet, A. (2008). FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 126–136.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (2014). Pillars article : two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999. 401 : 708–712. *J. Immunol.* 192, 840–844.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K. and Linn, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* 73, 39–85.
- Sanchez, Y. (1997). Conservation of the Chk1 Checkpoint Pathway in Mammals : Linkage of DNA Damage to Cdk Regulation Through Cdc25. *Science* 277, 1497–1501.
- Sanchez-Madrid, F. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *The EMBO Journal* 18, 501–511.
- Sarkar, S., Teichgraber, V., Kalia, V., Polley, A., Masopust, D., Harrington, L. E., Ahmed, R. and Wherry, E. J. (2007). Strength of Stimulus and Clonal Competition Impact the Rate of Memory CD8 T Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* 179, 6704–6714.
- Saveliev, A., Vanes, L., Ksionda, O., Rapley, J., Smerdon, S. J., Rittinger, K. and Tybulewicz, V. L. J. (2009). Function of the Nucleotide Exchange Activity of Vav1 in T Cell Development and Activation. *Sci. Signal.* 2, ra83–ra83.
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. and Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 1, 426–432.
- Schmidt, M., Fernandez de Mattos, S., van der Horst, A., Klomp maker, R., Kops, G. J. P. L., Lam, E. W.-F., Burgering, B. M. T. and Medema, R. H. (2002). Cell Cycle Inhibition by FoxO Forkhead Transcription Factors Involves Downregulation of Cyclin D. *Molecular and Cellular Biology* 22, 7842–7852.
- Schwartz, R. H. (2003). T C ELL A NERGY *. *Annual Review of Immunology* 21, 305–334.
- Sekimoto, T., Fukumoto, M. and Yoneda, Y. (2004). 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27Kip1. *The EMBO Journal* 23, 1934–1942.
- Sena, L. A. and Chandel, N. S. (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell* 48, 158–167.
- Serrador, J. M., Cabrero, J. R., Sancho, D., Mittelbrunn, M., Urzainqui, A. and Sánchez-Madrid, F. (2004). HDAC6 Deacetylase Activity Links the Tubulin Cytoskeleton with Immune Synapse Organization. *Immunity* 20, 417–428.

- Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K. P., Kündig, T. M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P. S., Thompson, C. B. and Mak, T. W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* *261*, 609–612.
- Shima, H., Takubo, K., Tago, N., Iwasaki, H., Arai, F., Takahashi, T. and Suda, T. (2010). Acquisition of G0 state by CD34-positive cord blood cells after bone marrow transplantation. *Experimental Hematology* *38*, 1231–1240.
- Shin, J.-H., Janer, M., McNeney, B., Blay, S., Deutsch, K., Sanjeevi, C. B., Kockum, I., Lernmark, Å. and Graham, J. (2007). IA-2 autoantibodies in incident type I diabetes patients are associated with a polyadenylation signal polymorphism in GIMAP5. *Genes and Immunity* *8*, 503–512.
- Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdičková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., Cyster, J. G. and Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* *440*, 540–544.
- Shiyanov, P., Bagchi, S., Adami, G., Kokontis, J., Hay, N., Arroyo, M., Morozov, A. and Raychaudhuri, P. (1996). p21 Disrupts the interaction between cdk2 and the E2F-p130 complex. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 737–744.
- Shrivastav, M., De Haro, L. P. and Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research* *18*, 134–147.
- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., DeBerardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C. and Sadek, H. A. (2010). The Distinct Metabolic Profile of Hematopoietic Stem Cells Reflects Their Location in a Hypoxic Niche. *Cell Stem Cell* *7*, 380–390.
- Sinclair, L. V., Finlay, D., Feijoo, C., Cornish, G. H., Gray, A., Ager, A., Okkenhaug, K., Hagenbeek, T. J., Spits, H. and Cantrell, D. A. (2008). Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nature Immunology* *9*, 513–521.
- Singla, V. (2006). The Primary Cilium as the Cell's Antenna : Signaling at a Sensory Organelle. *Science* *313*, 629–633.
- Singleton, K. L., Roybal, K. T., Sun, Y., Fu, G., Gascoigne, N. R. J., Oers, N. S. C. v. and Wülfing, C. (2009). Spatiotemporal Patterning During T Cell Activation Is Highly Diverse. *Sci. Signal.* *2*, ra15–ra15.
- Slingerland, J. and Pagano, M. (2000). Regulation of the Cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *Journal of Cellular Physiology* *183*, 10–17.
- Smirnov, D. A., Brady, L., Halasa, K., Morley, M., Solomon, S. and Cheung, V. G. (2012). Genetic variation in radiation-induced cell death. *Genome Research* *22*, 332–339.
- Smith, K., Seddon, B., Purbhoo, M. A., Zamoyska, R., Fisher, A. G. and Merkenschlager, M. (2001). Sensory adaptation in naive peripheral CD4 T cells. *J. Exp. Med.* *194*, 1253–1261.
- Spencer, S. L., Cappell, S. D., Tsai, F.-C., Overton, K. W., Wang, C. L. and Meyer, T. (2013). The Proliferation-Quiescence Decision Is Controlled by a Bifurcation in CDK2 Activity at Mitotic Exit. *Cell* *155*, 369–383.

- Sprent, J. and Surh, C. D. (2011). Normal T cell homeostasis : the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat. Immunol.* *12*, 478–484.
- Sprent, J. and Tough, D. (1994). Lymphocyte life-span and memory. *Science* *265*, 1395–1400.
- Stahl, M., Dijkers, P. F., Kops, G. J. P. L., Lens, S. M. A., Coffey, P. J., Burgering, B. M. T. and Medema, R. H. (2002). The Forkhead Transcription Factor FoxO Regulates Transcription of p27Kip1 and Bim in Response to IL-2. *The Journal of Immunology* *168*, 5024–5031.
- Štefanová, 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.
- Steinman, R. A. (2002). Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene* *21*, 3403–3413.
- Stittrich, A.-B., Haftmann, C., Sgouroudis, E., Köhl, A. A., Hegazy, A. N., Panse, I., Riedel, R., Flossdorf, M., Dong, J., Fuhrmann, F., Heinz, G. A., Fang, Z., Li, N., Bissels, U., Hatam, F., Jahn, A., Hammoud, B., Matz, M., Schulze, F.-M., Baumgrass, R., Bosio, A., Mollenkopf, H.-J., Grün, J., Thiel, A., Chen, W., Höfer, T., Loddenkemper, C., Löhning, M., Chang, H.-D., Rajewsky, N., Radbruch, A. and Mashreghi, M.-F. (2010). The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. *Nature Immunology* *11*, 1057–1062.
- Stock, A. T., Jones, C. M., Heath, W. R. and Carbone, F. R. (2006). Cutting Edge : Central Memory T Cells Do Not Show Accelerated Proliferation or Tissue Infiltration in Response to Localized Herpes Simplex Virus-1 Infection. *The Journal of Immunology* *177*, 1411–1415.
- Stokoe, D. (1997). Dual Role of Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the Activation of Protein Kinase B. *Science* *277*, 567–570.
- Stoll, S. (2002). Dynamic Imaging of T Cell-Dendritic Cell Interactions in Lymph Nodes. *Science* *296*, 1873–1876.
- Storz, P. (2011). Forkhead Homeobox Type O Transcription Factors in the Responses to Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* *14*, 593–605.
- Strasser, A. and Pellegrini, M. (2004). T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends in Immunology* *25*, 610–615.
- Sullivan, J. A., Kim, E. H., Plisch, E. H., Peng, S. L. and Suresh, M. (2012). FOXO3 Regulates CD8 T Cell Memory by T Cell-Intrinsic Mechanisms. *PLoS Pathogens* *8*, e1002533.
- Sumita, K., Lo, Y.-H., Takeuchi, K., Senda, M., Kofuji, S., Ikeda, Y., Terakawa, J., Sasaki, M., Yoshino, H., Majd, N., Zheng, Y., Kahoud, E. R., Yokota, T., Emerling, B. M., Asara, J. M., Ishida, T., Locasale, J. W., Daikoku, T., Anastasiou, D., Senda, T. and Sasaki, A. T. (2016). The Lipid Kinase PI5P4K β Is an Intracellular GTP Sensor for Metabolism and Tumorigenesis. *Molecular Cell* *61*, 187–198.

- Takada, K. and Jameson, S. C. (2009a). Naive T cell homeostasis : from awareness of space to a sense of place. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 823–832.
- Takada, K. and Jameson, S. C. (2009b). Self-class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. *The Journal of Experimental Medicine* *206*, 2253–2269.
- Takizawa, C. G. and Morgan, D. O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1–Cdk1 and Cdc25C. *Current Opinion in Cell Biology* *12*, 658–665.
- Tamás, P., Hawley, S. A., Clarke, R. G., Mustard, K. J., Green, K., Hardie, D. G. and Cantrell, D. A. (2006). Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca^{2+} in T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* *203*, 1665–1670.
- Tan, Y.-J., Beerheide, W. and Ting, A. E. (1999). Biophysical Characterization of the Oligomeric State of Bax and Its Complex Formation with Bcl-XL. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *255*, 334–339.
- Tarakhovsky, A., Turner, M., Schaal, S., Mee, P. J., Duddy, L. P., Rajewsky, K. and Tybulewicz, V. L. J. (1995). Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. , Published online : 30 March 1995 ; | doi :10.1038/374467a0 *374*, 467–470.
- Tewari, K., Walent, J., Svaren, J., Zamoyska, R. and Suresh, M. (2006). Differential requirement for Lck during primary and memory CD8+ T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 16388–16393.
- Tkachenko, E., Sabouri-Ghomi, M., Pertz, O., Kim, C., Gutierrez, E., Machacek, M., Groisman, A., Danuser, G. and Ginsberg, M. H. (2011). Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pacemaker in migrating cells. *Nature Cell Biology* *13*, 660–667.
- Tough, D. F. and Sprent, J. (1994). Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* *179*, 1127–1135.
- Tran, H. (2002). DNA Repair Pathway Stimulated by the Forkhead Transcription Factor FOXO3a Through the Gadd45 Protein. *Science* *296*, 530–534.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E. C. and Greenberg, M. E. (2003). The Many Forks in FOXO's Road. *Sci. STKE* *2003*, re5–re5.
- Tubo, N. J. and Jenkins, M. K. (2014). TCR signal quantity and quality in CD4+ T cell differentiation. *Trends in Immunology* *35*, 591–596.
- Turner, M., Mee, P., Walters, A. E., Quinn, M. E., Mellor, A. L., Zamoyska, R. and Tybulewicz, V. L. (1997). A Requirement for the Rho-Family GTP Exchange Factor Vav in Positive and Negative Selection of Thymocytes. *Immunity* *7*, 451–460.
- Tybulewicz, V. L. J. and Henderson, R. B. (2009). Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* *9*, 630–644.

- Tzivion, G. and Avruch, J. (2002). 14-3-3 Proteins : Active Cofactors in Cellular Regulation by Serine/Threonine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 3061–3064.
- Underhill, D. M., Bassetti, M., Rudensky, A. and Aderem, A. (1999). Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J. Exp. Med.* *190*, 1909–1914.
- Valenzuela-Fernandez, A. (2005). Histone Deacetylase 6 Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Molecular Biology of the Cell* *16*, 5445–5454.
- Valiron, O., Caudron, N. and Job, D. (2001). Microtubule dynamics. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* *58*, 2069–2084.
- van der Brug, M. P., Goodenough, S. and Wilce, P. (2002). Kainic acid induces 14-3-3 ζ expression in distinct regions of rat brain. *Brain Research* *956*, 110–115.
- van der Heide, L. P., Jacobs, F. M. J., Burbach, J. P. H., Hoekman, M. F. M. and Smidt, M. P. (2005). FoxO6 transcriptional activity is regulated by Thr²⁶ and Ser¹⁸⁴, independent of nucleo-cytoplasmic shuttling. *Biochemical Journal* *391*, 623–629.
- van der Merwe, P. A., Bodian, D. L., Daenke, S., Linsley, P. and Davis, S. J. (1997). CD80 (B7-1) Binds Both CD28 and CTLA-4 with a Low Affinity and Very Fast Kinetics. *The Journal of Experimental Medicine* *185*, 393–404.
- van der Vos, K. E. and Coffey, P. J. (2008). FOXO-binding partners : it takes two to tango. *Oncogene* *27*, 2289–2299.
- van der Windt, G. J., Everts, B., Chang, C.-H., Curtis, J. D., Freitas, T. C., Amiel, E., Pearce, E. J. and Pearce, E. L. (2012). Mitochondrial Respiratory Capacity Is a Critical Regulator of CD8+ T Cell Memory Development. *Immunity* *36*, 68–78.
- van Zeijl, M. J., Testerink, C., Kijne, J. W. and Wang, M. (2000). Subcellular differences in post-translational modification of barley 14-3-3 proteins. *FEBS Letters* *473*, 292–296.
- Vang, T., Abrahamsen, H., Myklebust, S., Enserink, J., Prydz, H., Mustelin, T., Amarzguioui, M. and Tasken, K. (2004). Knockdown of C-terminal Src kinase by siRNA-mediated RNA interference augments T cell receptor signaling in mature T cells. *European Journal of Immunology* *34*, 2191–2199.
- Vardhana, S., Choudhuri, K., Varma, R. and Dustin, M. L. (2010). Essential Role of Ubiquitin and TSG101 Protein in Formation and Function of the Central Supramolecular Activation Cluster. *Immunity* *32*, 531–540.
- Veiga-Fernandes, H. and Rocha, B. (2004). High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division. *Nature Immunology* *5*, 31–37.
- Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A. and Rocha, B. (2000). Response of naïve and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat. Immunol.* *1*, 47–53.

- Vella, A. T., Dow, S., Potter, T. A., Kappler, J. and Marrack, P. (1998). Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 3810–3815.
- Verdel, A. and Khochbin, S. (1999). Identification of a New Family of Higher Eukaryotic Histone Deacetylases : COORDINATE EXPRESSION OF DIFFERENTIATION-DEPENDENT CHROMATIN MODIFIERS. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 2440–2445.
- Viola, A. and Lanzavecchia, A. (1996). T Cell Activation Determined by T Cell Receptor Number and Tunable Thresholds. *Science* *273*, 104–106.
- Vivien, L. (2001). T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *International Immunology* *13*, 763–768.
- Vogt, P. K. (2012). Retroviral oncogenes : a historical primer. *Nature Reviews Cancer* *12*, 639–648.
- Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H. and Mak, T. W. (1995). Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctla-4. *Science* *270*, 985–988.
- Watts, T. H. (2005). TNF/TNFR FAMILY MEMBERS IN COSTIMULATION OF T CELL RESPONSES. *Annual Review of Immunology* *23*, 23–68.
- Webb, A. E. and Brunet, A. (2014). FOXO transcription factors : key regulators of cellular quality control. *Trends in Biochemical Sciences* *39*, 159–169.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* *81*, 323–330.
- Wells, A. D. and Morawski, P. A. (2014). New roles for cyclin-dependent kinases in T cell biology : linking cell division and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 261–270.
- White, R. (1997). Regulation of RNA polymerases I and III by the retinoblastoma protein : a mechanism for growth control? *Trends in Biochemical Sciences* *22*, 77–80.
- Whitmire, J. K., Eam, B. and Whitton, J. L. (2008). Tentative T Cells : Memory Cells Are Quick to Respond, but Slow to Divide. *PLoS Pathogens* *4*, e1000041.
- Wiehagen, K. R., Corbo, E., Schmidt, M., Shin, H., Wherry, E. J. and Maltzman, J. S. (2010). Loss of tonic T-cell receptor signals alters the generation but not the persistence of CD8+ memory T cells. *Blood* *116*, 5560–5570.
- Williams, M. A. and Bevan, M. J. (2007). Effector and Memory CTL Differentiation. *Annual Review of Immunology* *25*, 171–192.
- Wofford, J. A., Wieman, H. L., Jacobs, S. R., Zhao, Y. and Rathmell, J. C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* *111*, 2101–2111.
- Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A. and Kuchroo, V. K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* *496*, 513–517.

- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. and Cantley, L. C. (1997). The Structural Basis for 14-3-3 :Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell* *91*, 961–971.
- Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D. H., Pamer, E. G., Kuwano, H. and Yoshikai, Y. (2002). Overexpression of IL-15 In Vivo Increases Antigen-Driven Memory CD8+ T Cells Following a Microbe Exposure. *The Journal of Immunology* *168*, 1198–1203.
- Yajima, T., Yoshihara, K., Nakazato, K., Kumabe, S., Koyasu, S., Sad, S., Shen, H., Kuwano, H. and Yoshikai, Y. (2006). IL-15 Regulates CD8+ T Cell Contraction during Primary Infection. *The Journal of Immunology* *176*, 507–515.
- Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y. and Fukamizu, A. (2008). Arginine Methylation of FOXO Transcription Factors Inhibits Their Phosphorylation by Akt. *Molecular Cell* *32*, 221–231.
- Yamamoto, M., Kondo, E., Takeuchi, M., Harashima, A., Otani, T., Tsuji-Takayama, K., Yamasaki, F., Kumon, H., Kibata, M. and Nakamura, S. (2011). miR-155, a Modulator of FOXO3a Protein Expression, Is Underexpressed and Cannot Be Upregulated by Stimulation of HOZOT, a Line of Multifunctional Treg. *PLoS ONE* *6*, e16841.
- Yang, J.-Y., Zong, C. S., Xia, W., Yamaguchi, H., Ding, Q., Xie, X., Lang, J.-Y., Lai, C.-C., Chang, C.-J., Huang, W.-C., Huang, H., Kuo, H.-P., Lee, D.-F., Li, L.-Y., Lien, H.-C., Cheng, X., Chang, K.-J., Hsiao, C.-D., Tsai, F.-J., Tsai, C.-H., Sahin, A. A., Muller, W. J., Mills, G. B., Yu, D., Hortobagyi, G. N. and Hung, M.-C. (2008). ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nature Cell Biology* *10*, 138–148.
- Yee, A. S., Shih, H. H. and Tevosian, S. G. (1998). New perspectives on retinoblastoma family functions in differentiation. *Front. Biosci.* *3*, D532–547.
- Yoon, S., Molloy, M. J., Wu, M. P., Cowan, D. B. and Gussoni, E. (2007). C6ORF32 is upregulated during muscle cell differentiation and induces the formation of cellular filopodia. *Developmental Biology* *301*, 70–81.
- Youle, R. J. and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family : opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *9*, 47–59.
- Yüce, Ö., Piekny, A. and Glotzer, M. (2005). An ECT2–centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *The Journal of Cell Biology* *170*, 571–582.
- Zetterberg, A. and Larsson, O. (1985). Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 5365–5369.
- Zhang, J., Bardos, T., Li, D., Gal, I., Vermes, C., Xu, J., Mikecz, K., Finnegan, A., Lipkowitz, S. and Glantz, T. T. (2002). Cutting Edge : Regulation of T Cell Activation Threshold by CD28 Costimulation Through Targeting Cbl-b for Ubiquitination. *The Journal of Immunology* *169*, 2236–2240.

- Zhang, K. and Waxman, D. J. (2010). PC3 prostate tumor-initiating cells with molecular profile FAM65B^{high}/MFI2^{low}/LEF1^{low} increase tumor angiogenesis. *Molecular Cancer* 9, 319.
- Zhang, R., Alt, F. W., Davidson, L., Orkin, S. H. and Swat, W. (1995). Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the *vav* proto-oncogene. , Published online : 30 March 1995 ; | doi :10.1038/374470a0 374, 470–473.
- Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J. T., Yang, X.-J., Dent, S. R., Yao, T.-P., Lane, W. S. and Seto, E. (2007). HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Molecular Cell* 27, 197–213.
- Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.-L., Chua, K., Lombard, D., Mizeracki, A., Matthias, G., Alt, F. W., Khochbin, S. and Matthias, P. (2008). Mice Lacking Histone Deacetylase 6 Have Hyperacetylated Tubulin but Are Viable and Develop Normally. *Molecular and Cellular Biology* 28, 1688–1701.
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S. and Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *The EMBO Journal* 22, 1168–1179.
- Zhao, B., Wu, Z. and Müller, U. (2016). Murine Fam65b forms ring-like structures at the base of stereocilia critical for mechanosensory hair cell function. *eLife* 5.
- Zhao, Y., Wang, Y. and Zhu, W.-G. (2011). Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. *J Mol Cell Biol* 3, 276–282.
- Zhou, B. B. and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response : putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.
- Zhu, L., Heuvel, S. v. d., Helin, K., Fattaey, A., Ewen, M., Livingston, D., Dyson, N. and Harlow, E. (1993). Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 7, 1111–1125.
- Zijlstra, M., Bix, M., Simister, N. E., Loring, J. M., Raulet, D. H. and Jaenisch, R. (1990). β 2-Microglobulin deficient mice lack CD4⁺ cytolytic T cells. , Published online : 19 April 1990 ; | doi :10.1038/344742a0 344, 742–746.
- Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K. I. and Suda, T. (2011). p57Kip2 and p27Kip1 Cooperate to Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence through Interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell* 9, 247–261.

Annexe A

Article 1 : Fam65b controls the proliferation of transformed and primary T cells

Publié dans *Oncotarget* en 2016

FAM65B controls the proliferation of transformed and primary T cells

Jeanne Froehlich^{1,2,3}, Margaux Versapuech^{1,2,3}, Laura Megrelis^{1,2,3}, Quitterie Largeteau^{1,2,3}, Sylvain Meunier⁴, Corinne Tanchot⁴, Georges Bismuth^{1,2,3}, Jérôme Delon^{1,2,3,*}, Marianne Mangeney^{1,2,3,*}

¹Inserm, Institut Cochin, Paris, France

²Cnrs, Paris, France

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁴Inserm, PARCC, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Marianne Mangeney, **email:** marianne.mangeney@inserm.fr

Keywords: cell proliferation, cell cycle, signaling, T lymphocytes, leukemia

Received: April 13, 2016

Accepted: August 10, 2016

Published: August 20, 2016

ABSTRACT

Cell quiescence is controlled by regulated genome-encoded programs that actively express genes which are often down-regulated or inactivated in transformed cells. Among them is FoxO1, a transcription factor that imposes quiescence in several cell types, including T lymphocytes. In these cells, the FAM65B encoding gene is a major target of FOXO1. Here, we show that forced expression of FAM65B in transformed cells blocks their mitosis because of a defect of the mitotic spindle, leading to G2 cell cycle arrest and apoptosis. Upon cell proliferation arrest, FAM65B is engaged in a complex containing two proteins well known to be involved in cell proliferation i.e. the HDAC6 deacetylase and the 14.3.3 scaffolding protein. In primary T cells, FAM65B is down-regulated upon T cell receptor engagement, and maintaining its expression blocks their proliferation, establishing that the decrease of FAM65B expression is required for proliferation. Conversely, inhibiting FAM65B expression in naive T lymphocytes decreases their activation threshold. These results identify FAM65B as a potential new target for controlling proliferation of both transformed and normal cells.

INTRODUCTION

Before encountering foreign antigens, naive T lymphocytes do not proliferate. It was initially assumed that this “default” state reflected the absence of activating signals [1]. It is now known that the steady-state maintenance of naive T cells is an active state and depends on a combination of signals from the IL-7 receptor and the T cell antigen receptor (TCR) triggered by major histocompatibility complex (MHC) molecules loaded with self-peptides [2, 3]. Paradoxically, the same signals lead to a loss of quiescence of naive T cells in some situations such as lymphopenia, and result in entry into the cell cycle (lymphopenia-induced proliferation) and acquisition of memory-like markers [2, 3]. Therefore, naive T cells are somehow restrained in proliferation, but this restraint can be alleviated by external cues. The molecular mechanisms underlying such restraint have proven elusive.

The forkhead box O1 (FoxO1) transcription factor is involved in the maintenance of the quiescence state of T cells [4]. The FoxO family is the mammalian orthologue of the *c-elegans* protein DAF16, and has an evolutionarily conserved function in the adaptation of proliferation-to-nutrient availability [5]. In quiescent T cells, FoxO1 is nuclear, and binds DNA. This DNA binding drives the transcription of several genes that encode proteins involved in cell mobility, cell survival and quiescence. Upon TCR stimulation, FOXO1 is phosphorylated by Akt kinase under the control of the phospho-inositide 3 kinase (PI3K) pathway, leading to its nuclear exclusion and an arrest of its transcriptional activity [6, 7]. Conditional deletion of Foxo1 in mouse T cells results in spontaneous activation of T cells with an activated-memory phenotype [8].

We previously identified family with sequence similarity 65, member B (FAM65B; previously known as C6ORF32, KIAA0386 or PL48), as a transcriptional

target of FOXO1 in T cells [7, 9]. Two main isoforms of FAM65B proteins are expressed in T cells and have been functionally characterized as an atypical inhibitor of the small G protein RhoA [9, 10]. FAM65B has also been described to induce neurite-like outgrowths in HEK293 and C2C12 cells probably through an action on microtubules [11]. This step appears to be involved in myoblast fusion and differentiation [12]. More recently, the protein has been shown to be a component of hair cell stereocilia, an actin-rich structure required for hearing [13]. The FAM65B protein does not seem to be endowed with intrinsic enzymatic properties. Instead, its functional effect in cell mobility seems to rely on its interaction with the small G protein RhoA [9, 10], whereas its role in myoblast differentiation is dependent on its interaction with a complex containing the histone deacetylase HDAC6 and 14.3.3 proteins [10, 12]. The 14.3.3 proteins are a family of regulatory signaling molecules that interact with other proteins in a phosphorylation-dependent manner and function as adapter or scaffold proteins in signal transduction pathways [14]. Although 14.3.3 proteins act in cell signaling, cell cycle control, and apoptotic cell death, a large group of 14.3.3-binding partners have been described to regulate cytoskeleton architecture [15].

We now report that FAM65B can act as a molecular switch controlling quiescence of normal T cells and proliferation of malignant cell lines. Analyzing the mechanism responsible for this effect, we show that proliferating cells are blocked in mitosis due to a defect of the mitotic spindle triggered by FAM65B overexpression. We also demonstrate at the molecular level that FAM65B forms a molecular complex with HDAC6 and 14.3.3, and that this tripartite complex is required for proliferation arrest. We also show that quiescent T lymphocytes express high levels of FAM65B and that a rapid down-regulation of the molecule is necessary to enable T cells to divide in response to TCR engagement. Accordingly, we also show that FAM65B cellular levels set the activation threshold of T cells required to start a substantial proliferation.

RESULTS

FAM65B inhibits the proliferation of human leukemic T cells

FAM65B is transcriptionally controlled by FOXO1 [9]. In the Jurkat leukemic T cell line, where the PI3K pathway is constitutively active, FOXO1 is permanently shut-down and so degraded [16] (Supplementary Figure S1A, lane 2), and the two isoforms of FAM65B are not expressed ([7, 9], Supplementary Figure S1B, lane 1). We therefore used these cells to follow how FAM65B re-expression could affect their growth. Cells were transfected with expression constructs coding for GFP alone as a control, or for FAM65B isoform 2 fused to GFP. Having confirmed that FAM65B re-expression did not alter

FOXO1 expression level (Supplementary Figure S1A, lane 2 and 3), we monitored the proliferation by counting the total viable cell number daily, and quantifying the percentage of GFP⁺ cells by flow cytometry. In contrast to control cells, the number of FAM65B expressing cells did not increase over time (Figure 1A). The same effect was observed when FAM65B isoform 1 fused to GFP was expressed (data not shown). Analysis of the cell cycle demonstrated that FAM65B expression results in a G2/M accumulation after 3 days of culture, with $47 \pm 7\%$ (mean $\pm$ SD) of FAM65B positive vs $22 \pm 1.4\%$ of control cells in G2/M phase (Figure 1B and 1C). In addition, annexin V labelling revealed that the percentage of dying cells was significantly increased by FAM65B (Figure 1D).

FAM65B is a mitotic inhibitor that alters the formation of the mitotic spindle

In order to study in detail the mechanism of this FAM65B-induced growth arrest, we used the classic model of adherent HeLa cancer cell line. HeLa cells, as all cell lines that we have tested including HEK293, NIH3T3 and CEM cells, do not express FAM65B (data not shown). We first show that, as observed in Jurkat cells, FAM65B expression led to an increase of HeLa cells in G2/M phase (55% vs 29% in control cells; Figure 2A). Next, in order to analyze how FAM65B might disturb the mitotic process, we co-transfected HeLa cells with vectors coding for GFP alone or FAM65B-GFP, and histone H2B-mCherry, to monitor the dynamics of DNA reorganization during mitosis. Whereas cells transfected with GFP alone completed mitosis in 43 ± 9 min, the time required for mitosis of FAM65B-expressing cells was more variable and longer (94 ± 65 min, Figure 2B and 2D). Chromosomes in the control cell were perfectly aligned on the metaphase plate 16 ± 5 min after initiation of cell division, as determined by cell rounding (Figure 2C and 2D). In contrast, FAM65B-expressing cells were not able to align chromosomes correctly, leading to abnormal anaphases with frequent lagging chromatids after more than 20 min for 37% of the cells, and more than 40 min for 14% of the cells (Figure 2C and 2D).

Chromosome movements during mitosis rely upon a complex macromolecular machinery known as the mitotic spindle. The spindle has three principal components, centrosomes, microtubules composed of α -tubulin, and chromosomes [17]. Since FAM65B is described as regulating the elongation of microtubules [18], we supposed that FAM65B expression might perturb the formation of the mitotic spindle. To test this hypothesis, we co-transfected HeLa cells with vectors coding for GFP alone or FAM65B-GFP, and α -tubulin-mCherry, to follow the microtubule network during mitosis. We observed that, whereas cells transfected with GFP alone were able to form a mitotic spindle, FAM65B-expressing cells presented an aberrant tubulin network with an absence of

clear mitotic spindle (Figure 2E). These results show that FAM65B expression disturbs the formation of the mitotic spindle, resulting in mitotic failure.

The FAM65B/HDAC6/14.3.3 tripartite complex is required for proliferation arrest

We then examined the implication of known targets of FAM65B in the molecular mechanism of growth arrest. We have previously shown that FAM65B binds directly and inhibits RhoA [9], a protein that has been involved in cytokinesis [19]. We hypothesized that the effect of FAM65B on proliferation could be due to this interaction. Therefore, we constructed a plasmid coding for a mutant version of FAM65B unable to bind RhoA (RL151-152AA, [10] and Figure 3A). Upon transfection, this mutant was still able to inhibit proliferation of Jurkat T cells as efficiently as the wild type FAM65B protein, thus showing that the anti-proliferative activity of FAM65B was not due to its RhoA inhibitory activity (Figure 3B).

It has been shown that the phosphorylated form of FAM65B can interact with 14.3.3, a family of proteins that

bind to phospho-Serine and phospho-Threonine residues and play important roles in various processes, including in coordinating cell cycle progression [14]. As FAM65B has been described as a phosphorylated protein in neutrophils [10], we examined its phosphorylation status in Jurkat T cells by treating whole cell extracts with λ -phosphatase. We observed a decrease of the apparent molecular weight of the protein (Supplementary Figure S1B), suggesting that FAM65B is also phosphorylated in these cells. A previous report has shown that a mutant form of FAM65B with serine residues mutated to alanine at positions 21, 37, 341, 523, and 535, (hereafter called FAM65B S(x5) A) did not bind 14.3.3 anymore [10], see also Figure 3C). We therefore investigated whether this mutant could have an anti-proliferative effect. We observed that the S(x5) A phosphorylation mutant of FAM65B lost its capacity to inhibit the proliferation of Jurkat cells (Figure 3D). Therefore, the phosphorylation of FAM65B and its interaction with 14.3.3 is required for its anti-proliferative activity.

It has been stated that (i) 14.3.3 is a molecular partner of HDAC6 [20], (ii) inhibition of the deacetylase

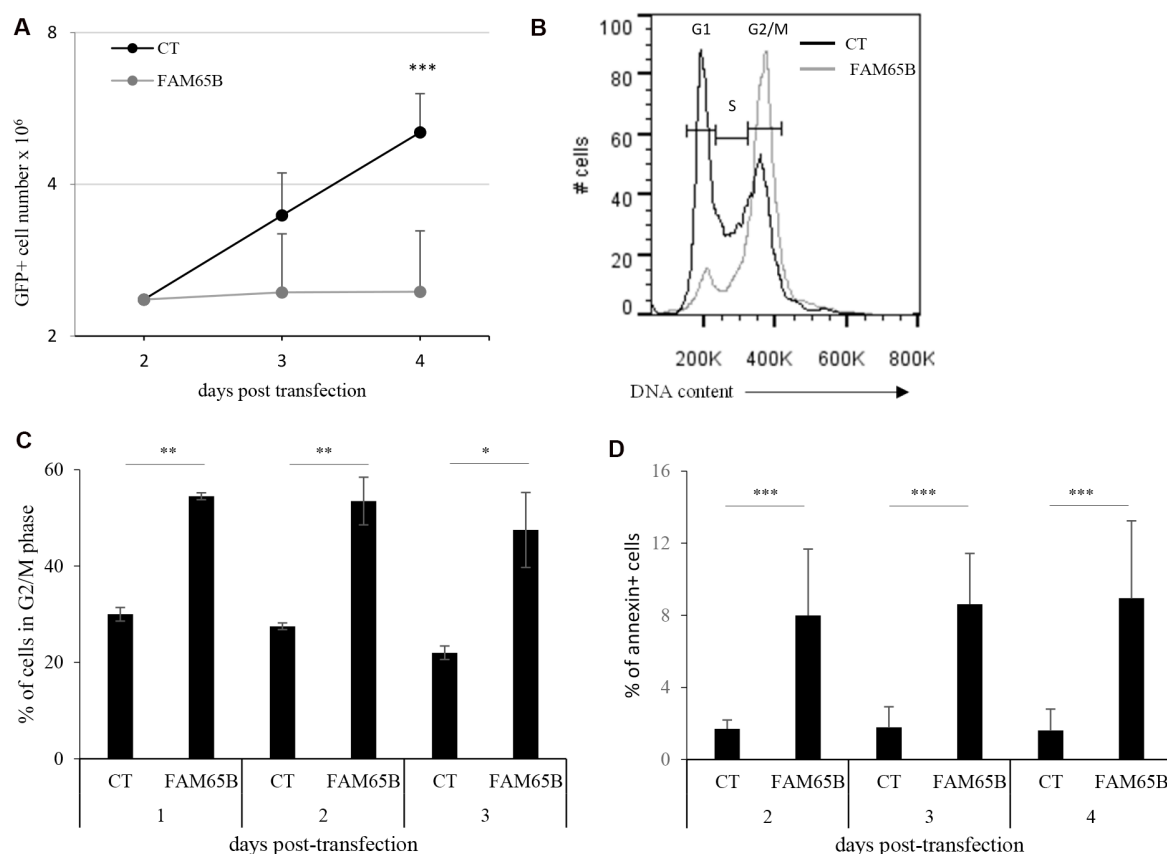


Figure 1: FAM65B expression inhibits cell proliferation by perturbing mitosis stage. (A) Jurkat cells were transfected either with GFP or FAM65B fused with GFP expression vectors and their proliferation was measured by counting the total viable cell number at the indicated time points. (B) The cell cycle profile was evaluated by flow cytometry three days after transfection. (C) The proportion of transfected Jurkat cells in G2/M phase was estimated daily by flow cytometry. (D) The proportion of annexin V-labeled cells was measured daily by flow cytometry. Results are shown as means $\pm$ SD of at least three individual experiments. Statistical analysis: Paired two-tailed Student's *t*-test.

activity of HDAC6 leads to inhibition of cell proliferation, and (iii) FAM65B inhibits the deacetylase activity of HDAC6 [12]. We therefore speculated that the anti-proliferative effect of FAM65B might rely on its capacity to inhibit HDAC6 through its interaction with 14.3.3. To test this hypothesis, we first tried to reverse the anti-proliferative effect of FAM65B by an excess of HDAC6 in FAM65B-arrested Jurkat cells. The results showed that an excess of HDAC6 was able to partially override the FAM65B-induced proliferation arrest (Figure 3E). Conversely, inhibition of HDAC6 with a pharmacological inhibitor dose-dependently inhibited the growth of Jurkat cells and induced a marked G2/M arrest, mimicking the effect of FAM65B (Supplementary Figure S2A), in a similar fashion to what is normally observed with etoposide (Supplementary Figure S3). We next assessed the interaction between FAM65B, 14.3.3, and HDAC6, and the role of FAM65B phosphorylation in these interactions. To do this, we co-transfected HDAC6 and 14.3.3 with wild type or S(x5)A form of FAM65B. Whereas HDAC6 and 14.3.3 co-immunoprecipitate with the wild-type form of FAM65B (Figure 3F, lane 1), the

mutated form of FAM65B was unable to interact with these two partners (Figure 3F, lane 2). These results suggest that the anti-proliferative property of FAM65B results from the capacity of its phosphorylated form to interact with HDAC6 and 14.3.3.

FAM65B controls T cell proliferation upon TCR stimulation

We next analysed the consequences of the regulation of cell division by FAM65B upon physiological T cell activation. We first followed the expression level of FAM65B in T cells upon TCR triggering to see whether it was subject to variations after stimulation. FAM65B expression was quantified at the transcript and protein levels, following *in vitro* stimulation of primary human T lymphocytes with anti-CD3 and -CD28 coated beads. FAM65B transcripts decreased quickly upon TCR stimulation (Figure 4A), in line with a general and early block in FOXO1-mediated transcription upon antigen recognition [6]. Both FAM65B isoforms show a simultaneous loss, which was complete 24 hours after the

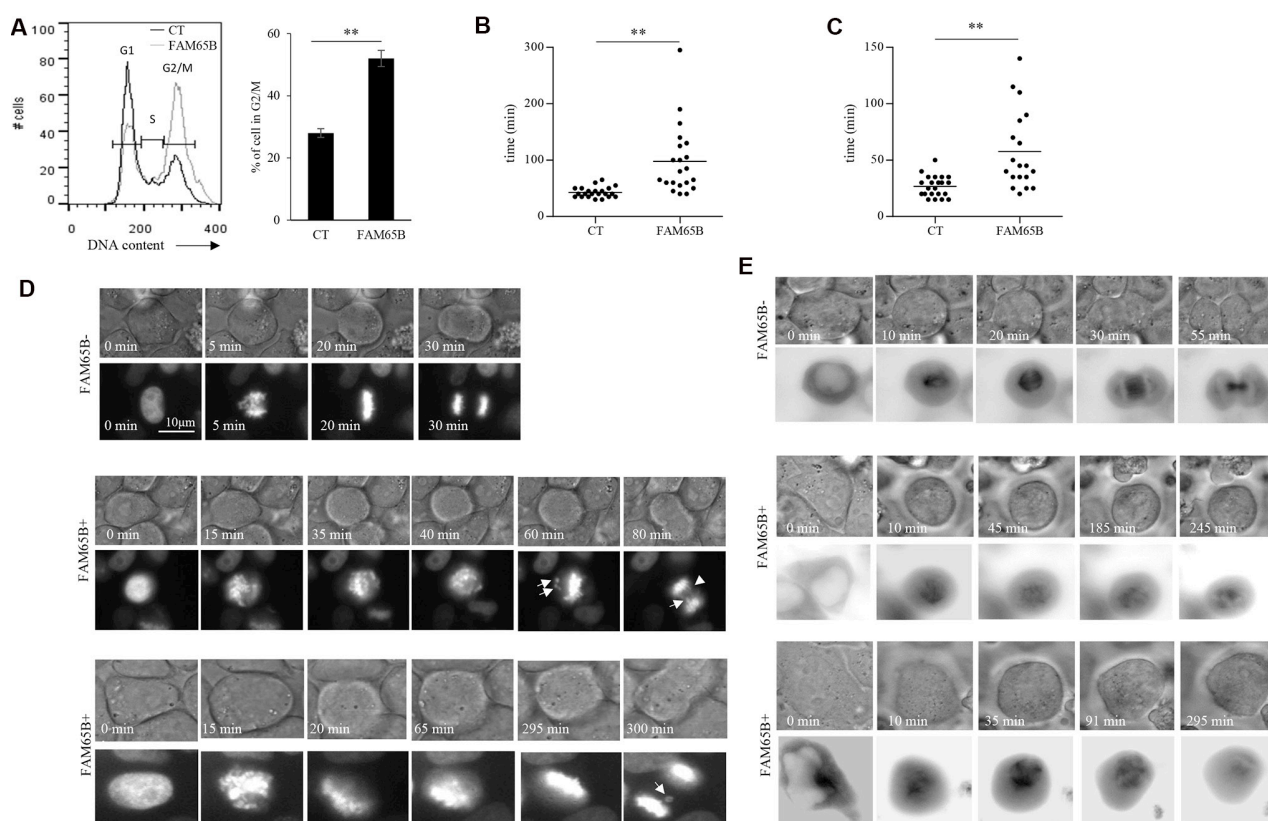


Figure 2: FAM65B expression disrupts the formation of the mitotic spindle, resulting in mitotic failure. (A) The cell cycle of HeLa cells transfected with GFP alone or FAM65B fused with GFP expression vectors was analyzed by flow cytometry two days after transfection. Results are representative of three experiments. The time required for each HeLa cell co-transfected with Histone H2B-mCherry and GFP ($n = 22$) or FAM65B-GFP ($n = 27$) expressing vectors to complete a division (B and D) or to align chromosomes (C) was evaluated by time-lapse microscopy. Statistical analysis: Paired two-tailed Student's *t*-test. (E) HeLa cells were co-transfected with α -tubulin-GFP and m-Cherry ($n = 14$) or FAM65B-mCherry ($n = 20$), and their capacity to form a mitotic spindle was followed by time-lapse microscopy.

onset of stimulation (Figure 4B). This observation is not related to cell culture as the level of FAM65B is constant in non-stimulated cells. To reveal the functional importance of this decrease, we next followed the consequences of maintaining FAM65B expression during activation. Primary human T cells were transfected with a plasmid coding for FAM65B-GFP (or GFP alone as a control), activated with anti-CD3 and -CD28 coated beads, and cell proliferation was monitored by analyzing cell trace violet (CTV) dilution of GFP⁺ cells. We observed that expression of FAM65B totally inhibits the proliferation induced by TCR engagement (Figure 4C). ERK phosphorylation (Figure 4D) and CD69 expression (Figure 4E) upon TCR stimulation was similarly induced in both conditions, excluding any major defect in early TCR signaling upon FAM65B expression. Again, we also observed that addition of an HDAC6 inhibitor on primary T cells stimulated with anti-CD3 and -CD28 coated-beads has the same effects than FAM65B, leading to an inhibition of proliferation with no cell death (Supplementary

Figure S2B). With a complementary approach, we used RNA interference (RNAi) to study the consequences of decreasing FAM65B expression prior to TCR stimulation of primary human peripheral blood T cells (Figure 5A). We observed that FAM65B-depleted cells proliferated more than control cells (Figure 5B).

Primary peripheral T cells have a heterogeneous capacity to proliferate based on CD45RA expression ([21] and Supplementary Figure S4). We purified naive CD45RA⁺ (high activation threshold) and CD45RO⁺ (low activation threshold) populations from peripheral blood T cells, and sought to determine whether the lower activation threshold of CD45RO⁺ T cells was associated with decreased FAM65B expression levels. Indeed, our results show that these cells express a lower level of FAM65B than naive CD45RA⁺ cells (Figure 5C).

We then studied the proliferation of CD45RA⁺ cells upon activation with increasing doses of anti-CD3 and -CD28 coated-beads after FAM65B depletion. For all experiments, the depletion of FAM65B was

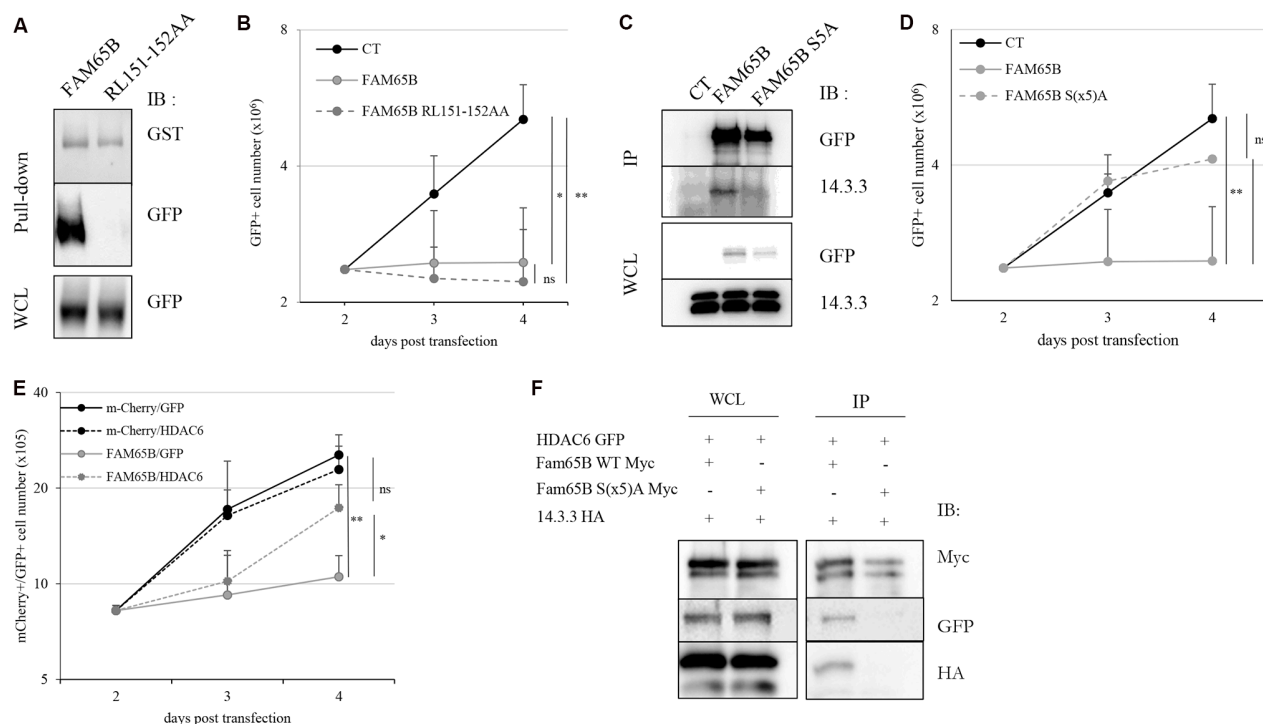


Figure 3: The anti-proliferative property of FAM65B results from its capacity to interfere with HDAC6 and 14.3.3.

(A) Lysates from HEK293T cells transfected with FAM65B-GFP or FAM65B RL151-152AA-GFP mutant were subjected to a pull-down assay using beads bearing GST-RhoA. (B) The proliferation of transfected Jurkat cells with GFP alone (Control: CT) and wild type or mutant RL151-152AA forms of FAM65B expression vectors was measured by daily counting the number of viable cells. Results are shown as means ± SD of at least three individual experiments. (C) HEK293T cells were transfected with pEF-Myc vector expressing either no protein (Control: CT), FAM65B or its mutant S(x5)A form fused to GFP. Whole cell lysates (WCL) and anti-Myc immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting. (D) The proliferation of transfected Jurkat cells with either GFP alone (Control: CT), wild type or mutant S(x5)A of FAM65B expression vectors was measured by counting daily the number of viable cells. Results are shown as means ± SD of at least three individual experiments. (E) The proliferation of Jurkat cells co-transfected with mCherry or FAM65B-mCherry and GFP or HDAC6-GFP was measured by counting the number of viable cells every day. Results are shown as means ± SD of at least three individual experiments. (F) HEK293T cells were co-transfected with HDAC6-GFP, 14.3.3-HA and pEF-Myc vector expressing either FAM65B or its mutant S(x5)A form. Whole cell lysates and anti-Myc immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting.

verified by intracellular staining and flow cytometry analysis (Supplementary Figure S5). In the absence of stimulation, no proliferation was observed. However, FAM65B-depleted cells were induced to proliferate at sub-optimal doses of activators that induced only marginal proliferation of control T lymphocytes expressing FAM65B (Figure 5D). These results show that there is an inverse correlation between the cellular levels of FAM65B and the capacity of human primary T cells to proliferate in response to an activation signal. They ultimately suggest that the decrease of FAM65B expression is a pre-requisite for T-cell proliferation.

DISCUSSION

We show here that FAM65B, a major transcriptional target of FOXO1, known as a quiescence factor, inhibits the proliferation of transformed cell lines through perturbation of mitosis. Our data suggest that this effect is linked to the capacity of FAM65B to inhibit the HDAC6/14.3.3 cell proliferation control pathway. In primary T cells, we observed that FAM65B expression regulates cell proliferation. Finally, our results indicate that the level of expression of FAM65B might also set the activation threshold of sub-populations of T cells.

Our work establishes that inhibition of FAM65B expression is required for cell proliferation as its ectopic

expression in proliferating cells induces cell cycle arrest and death. Therefore, FAM65B could be considered as a *bona fide* quiescence factor. It was initially thought that cells spontaneously become quiescent. It is now believed that quiescence is a cellular state controlled by environmental cues and required for tissue physiology, as demonstrated for instance in the hematopoietic system [22]. As a consequence, much recent work has focused on the active regulation of this state [23]. Although the link between loss of quiescence and proliferation is intuitive, some observations obtained in the T cell model are intriguing. Indeed, one notable feature observed upon TCR stimulation is a comparatively long time period (> 24 h) before the first cell division, as compared with the subsequent cell divisions that involve rapid doubling (every 5–6 hrs) [24]. The state through which naive T cells transit, from quiescence to the entry in the first cell cycle, is not fully characterized even if some metabolic events have been involved [25]. FAM65B was initially reported to be expressed in syncytia, both in placenta and in muscle [11, 18, 26]. In syncytia, multinucleated cells result from cell-cell fusion induced by endogenous retroviral envelopes [27, 28]. Interestingly, it has recently been established that the cell-cell fusion induced by viruses led to cell cycle arrest and senescence, i.e. irreversible quiescence [29]. In addition, terminal differentiation of HL-60 cells led to both cell cycle arrest and FAM65B expression [26]. We

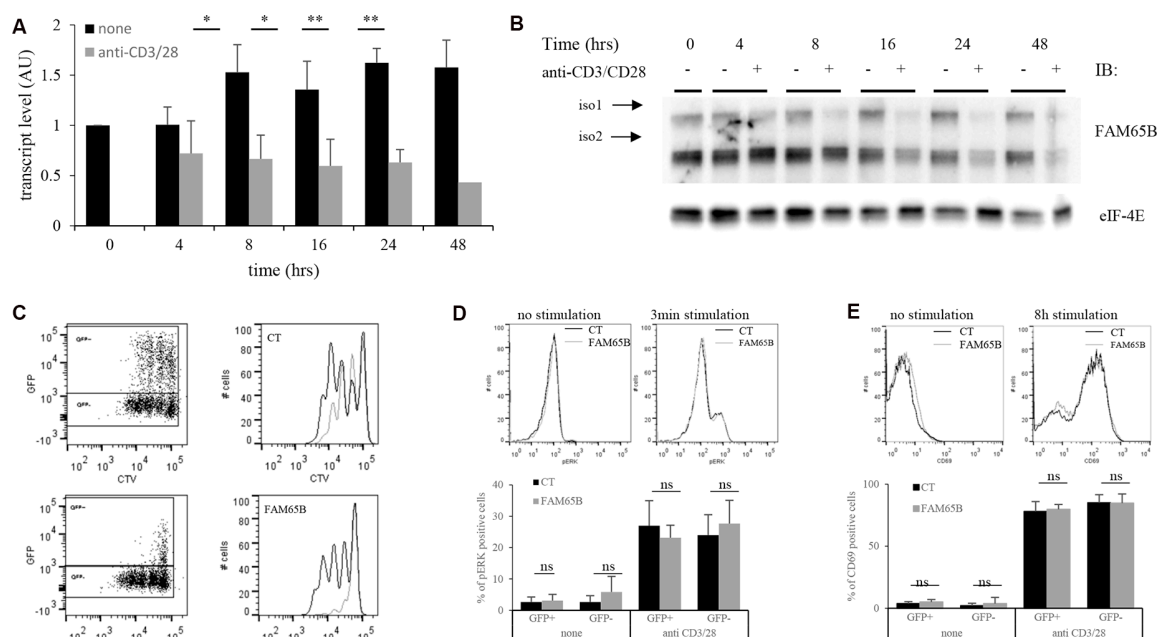


Figure 4: FAM65B expression is inversely correlated with the proliferative potential of activated T cells. Primary human T cells were stimulated *in vitro* for several hours using anti-CD3 and -CD28 coated-beads. FAM65B expression was quantified at both the transcript (A) and the protein (B) levels. (C) Primary human T cells were transfected with GFP (Control: CT) or FAM65B-GFP expression vector then stained with Cell Trace Violet (CTV) and stimulated *in vitro* as described in (A) for 4 days. In the histograms, the grey lines correspond to the GFP⁺ cells and the black lines to the GFP⁻ cells. Note that in CT conditions, GFP⁺ cells proliferate slightly less efficiently than GFP⁻ cells. This is likely to be an effect of the transfection *per se*. (D) ERK phosphorylation and (E) CD69 expression of transfected cells stimulated or not with anti-CD3 and -CD28 was analyzed by flow cytometry after 3 minutes and 8 hours of culture, respectively.

now report that FAM65B is highly expressed in naive T lymphocytes, a cell population that is characterized by a reversible quiescent state, and is down-regulated upon cell cycle entry. The expression of FAM65B can therefore be considered as a molecular marker of quiescence, whether or not it can be reversed.

FoxO1 is known to control cell proliferation through multiple mechanisms. FoxO factors stabilize G1 and G2/M checkpoints by the activation of a number of cell cycle regulatory proteins, including p130, members of the Cip/Kip and INK4 CKI families, cyclin G and Gadd45a. In addition, FoxO factors can also facilitate cell cycle arrest through the inhibition of the D-type cyclins and FoxM, a subgroup of Fox transcription factors that is known to positively drive G2/M phase transition [30]. In this study, we show that FAM65B, a transcriptional target of FOXO1, induces G2/M arrest. As previously proposed [12, 18], one mechanism to explain this effect might be an inhibition of the microtubule network by FAM65B, and especially a regulation of tubulin acetylation by FAM65B. Indeed, we know that FAM65B inhibits the deacetylase activity of HDAC6, a histone deacetylase

of class II that functions as a tubulin deacetylase [12]. This hypothesis about a role of HDAC6 in the effects of FAM65B is further validated by our results showing that the cell cycle arrest induced by FAM65B can be overcome by an excess of HDAC6. It should also be noted that pharmacological inhibitors of HDAC6, which are used in clinical trials for the treatment of myeloma [31–33], mimic the anti-mitotic effect of FAM65B. In previous studies, HDAC6 activity was established as a requirement for efficient oncogenic transformation. Without HDAC6 expression, fibroblasts were more resistant to both Ras- and ErbB2-dependent transformations [34]. The absence of FAM65B expression in transformed cell lines, consecutive to the inhibition of FOXO1 transcriptional activity, might also participate in the deregulation of HDAC6 required for the transformation process. Thus, as observed in our experiments with transformed cells, the perturbed mitosis induced by FAM65B could be the result of a defective microtubule organization downstream of HDAC6, culminating in a failure of the mitotic spindle during mitosis. Interestingly, FAM65B was recently localized to the plasma membrane of the stereocilia of

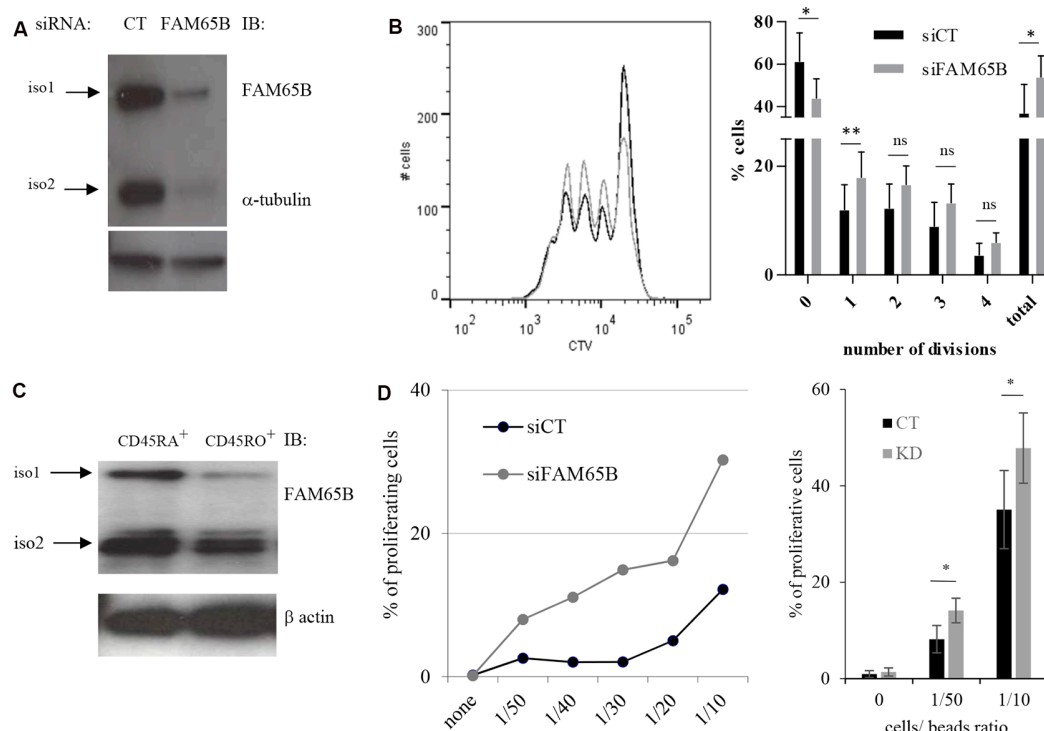


Figure 5: FAM65B expression is inversely correlated with the T cells activation threshold. (A) The efficiency of FAM65B knock-down in human primary T cells was checked by immunoblotting with anti-FAM65B and anti- α -tubulin as a loading control. (B) Human primary T cells were transfected with control (siCT) or FAM65B (siFAM65B) siRNA, then stained with CTV and stimulated *in vitro* for 3 days using anti-CD3 and -CD28 coated-beads. The proliferation of transfected cells was analyzed by flow cytometry after 3 days of stimulation. The percentage of cells exhibiting 0, 1, 2, 3, 4 divisions or the addition of them (total) is quantified as the mean $\pm$ SD obtained from four donors. (C) Naive (CD45RA⁺) or activated/memory (CD45RO⁺) populations were purified from peripheral blood T cells. FAM65B expression was then analyzed by immunoblotting. (D) Primary human CD45RA⁺ T cells transfected with siFAM65B or siCT were stained with CTV and stimulated *in vitro* using variable doses of anti-CD3 and anti-CD28 -coated beads. The proliferation of the transfected cells was analyzed by flow cytometry after 3 days of stimulation. Results are representative of at least three individual experiments

both inner and outer hair cells, and mutations of FAM65B leads to deafness syndromes, suggesting that the lack of functional FAM65B could hinder the development of the mechanotransduction apparatus, through perturbation of the primary cilium [13]. Indeed, HDAC6 has been notably implicated in cell proliferation *via* the regulation of the primary cilium [35, 36], which is known to control the cell cycle [37].

In addition, our work shows that the phosphorylation of FAM65B is required for both this anti-proliferative function and the formation of a tripartite complex comprised of FAM65B, 14.3.3 and HDAC6. Several studies have identified a possible phosphorylation of FAM65B not only in the Jurkat leukemic T cell line [38], but also in primary mouse neutrophils [10] and T lymphocytes [39]. In this latter case, the phosphorylation results from PKC η activity [39]. The 14.3.3 scaffolding proteins play a critical role in the regulation of cell fate through phospho-dependent binding to a large number of intracellular proteins. This function can be achieved by the formation of multi-protein complexes upon recruitment of such proteins or by restricting the access of other ones [14]. FAM65B, as a well-known 14.3.3 phosphopeptide ligand, contains the consensus sequences RSXpT/SXP and RXY/FXpT/SXP. The study by Gao *et al.* [10], confirmed by our results, show that the phosphorylation of FAM65B allows its interaction with 14.3.3. Though it cannot be excluded that phosphorylated form of FAM65B directly interacts with HDAC6, the fact that the FAM65B/HDAC6 interaction has been observed only in the context where the three proteins were present and not detected in our yeast two-hybrid screen [9], suggests that 14.3.3 makes a link between HDAC6 and FAM65B.

One intriguing feature of our work is the regulation of the T cell activation threshold by FAM65B. In T lymphocytes, the strength and duration of TCR signaling in response to antigen stimulation dictates the magnitude and the quality of the primary response [40, 41]. The TCR activation threshold, agonist affinity discrimination as well as signal termination must therefore be tightly regulated. This is achieved through the concerted action of multiple positive and negative regulators acting in resting or activated T cells. The 14.3.3 scaffolding protein has already been involved in the fine tuning of TCR-activation through relocalization of several signaling proteins [42–45], including FoxO1 [46, 47], suggesting a possible amplification loop that would keep FoxO1 in the cytosol and therefore would maintain FAM65B expression levels very low in activated T cells. Although much work will have to be done to precisely understand how FAM65B is able to set the activation threshold of T cells, it is tempting to assume, on the basis of our results, that its capacity to control the activity of the 14.3.3/HDAC6 complex could participate in this function.

We have already shown that in T lymphocytes, FAM65B inhibits cell migration by blocking the GTP

loading of RhoA [9]. Here, we show that FAM65B has a general quiescence promoting activity, which is active in resting T cells and controls both proliferation and setting of the activation threshold, at least in part through the 14.3.3/HDAC6 pathway. Therefore, in T cells, FAM65B appears as a main effector target of FOXO1 that is able to interact with two different targets to control the two main cellular processes of activation, i.e. migration and proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Cells

Human T lymphocytes were purified from the blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang, Paris, France; relevant ethical approvals and consent have been obtained for use of human samples, ref E-2075) and cultivated as described [7, 9]. The naive (CD45RA+) and memory (CD45RO+) T cells were obtained by negative depletion on magnetic beads [Anti Human CD45RO Particles, Anti Human CD45RA Particles, respectively (BD Biosciences). Jurkat cells (gift of G. Crabtree, Stanford University, Stanford, CA) were cultivated in complete RPMI medium, HeLa (gift of C. Berlioz, Institut Cochin, France) and HEK293T cells (ATCC-CRL-3216) were cultivated in complete DMEM medium.

Constructs and pharmacological inhibitors

pEGFP-FAM65B plasmids were previously described [9]. Mutations of the RhoA interaction domain (RL151-152AA) and phosphorylation sites (S(x5)A) were constructed by PCR using QuickChange II site-directed mutagenesis Kit (Agilent) with the primers listed in Supplementary Table S1. pmCherry-FAM65B was constructed by PCR by introducing the mCherry ORF at the *AgeI/NotI* site of pEGFP-FAM65B. FAM65Bwt and S(x5)A Myc constructs were obtained by amplification with primers listed in Supplementary Table S1 and by introducing FAM65B ORF in pEF vector at the *SpeI/EcoRV* sites. plncx-Histone 2B-mCherry and plncx2-Tubuline-YFP were a kind gift of C. Berlioz (Institut Cochin, France) and pEGFP-N1-HDAC6 was purchased from Addgene (# 36188). HA-tagged 14.3.3 plasmid was a kind gift of JL Andersen (Brigham Young University, Provo, UT). HDAC6 specific antagonist CAY-10603 (Selleckchem) has been described and characterized before [47]. Etoposide is a kind gift of R. Donné (Institut Cochin, Paris). λ Protein Phosphatase was from Millipore.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was prepared using an RNeasy mini kit (QIAGEN). cDNA was produced with the Advantage RT-for-PCR kit (Clontech Laboratories) using 1 μ g total

RNA and random hexamer priming in a final volume of 20 μ L. Real-time quantitative PCR was performed using the LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green kit (Roche Diagnostics). Genes of interest were detected using primers that had been designed with Oligo6 software (Molecular Biology Insights) and optimized to generate a single amplicon of 80–130 nucleotides. The sequences of the primers used in qRT-PCR experiments are in Supplementary Table S1.

DNA and RNA interference transfections

HeLa and HEK293T cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Jurkat cells (5×10^6) in 500 μ L of RPMI without phenol red were electroporated with 5 μ g DNA using the BioRad system (270 V, 950 μ F). Primary T cells (5×10^6) were nucleofected using the Amaxa system (Lonza; kit T, U-014 program) with 5 μ g DNA or 2 μ L of a 100 μ M solution of OTP SMARTpool RNAi (Dharmacon) directed against human FAM65B or non-targeting sequences as a control.

Flow cytometry

Apoptosis was determined by staining with Annexin V-PE (BD Pharmingen, PE Annexin V Apoptosis Detection kit I) according to the manufacturer's instructions.

Proliferation of primary T cells was assessed by dilution of Cell Trace Violet kit (Invitrogen). After two washes in PBS, cells were resuspended at 10^6 cells per mL in a 5 μ M Cell Trace Violet solution. Cells were incubated in dark at 37°C for 20 min. After the loading, cells were washed with a volume of cold PBS 10% FCS corresponding to 5 times the loading volume. Cell suspension was collected and dispensed into 96-well round-bottom microtiter plates (Falcon; 2×10^5 cells per well) and stimulated using anti-CD3/CD28 coated-beads (Dynabeads, Life technologies) for 3 days.

For cell cycle analysis of transfected cells (Jurkat and HeLa cells), 10^6 cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized with 0.1% saponin, and incubated with PBS 1 mM EDTA supplemented with 50 μ g/mL of Propidium Iodide (Sigma) and 200 μ g/mL of RNase A (Sigma) for 30 min at 37°C.

For analysis of ERK phosphorylation in transfected PBT, 10^6 cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized with methanol at –20°C for 1 hour, and incubated with anti-ERK^p antibody (# 4370, Cell Signaling Technology) in PBS 0.2% BSA for 30 min at room temperature and then with F(ab')₂-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) secondary antibody (#A-21246, Thermofisher). Cytometry data were obtained using a BD-LSR Fortessa flow cytometer (BD Bioscience). Data files were analyzed using FlowJo software (TreeStar).

Fluorescence microscopy

Time-lapse microscopy was performed on HeLa cells grown on coverslips in a Zeiss Axiovert 200 microscope at 37°C with a 20 $\times$ objective (LD Plan Neofluar). The camera CoolSnap HQ (Photometrics) was used to acquire images. Images were processed using ImageJ software.

Biochemistry

Primary T cells were stimulated using anti-CD3/CD28 -coated beads (1 bead per 5 cells, Dynabeads, Life technologies) into 96-well round-bottom microtiter plates (Falcon; 2×10^5 cells per well). Collected cells were lysed in lysis buffer [20 mM Bicine, pH7.6; 0.6% CHAPS complete protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche)] for 30 min on ice. Lysates were collected after centrifugation at 14,000 rpm for 10 min. Protein concentration in supernatants was quantified with the Bradford assay. SDS loading buffer was added to each sample and then boiled at 100°C for 5 min. An equal amount of proteins was loaded on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted with anti-FAM65B Ab (Abnova), anti- β -actin Ab (Sigma), anti- α -tubulin (Santa Cruz) or anti-eIF-4E (Santa Cruz) followed by a secondary HRP-labeled Ab (Jackson ImmunoResearch). Membranes were revealed by ECL (GE Healthcare Life Sciences) using a camera (Fusion FX7, VilberLourmat). For immunoprecipitation experiments, transfected cells were washed in cold PBS and lysed in 1 mL lysis buffer [10 mM HEPES pH 7.5; 150 mM KCl; 0.1%NP-40; 10 μ M SAHA (Sigma Aldrich); 40 μ M Tubacin (Sigma Aldrich); 50 μ M Nicotinamide (Sigma Aldrich); complete protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche)] for 30 min in ice. Lysates were collected after centrifugation at 14,000 rpm for 10 min. 40 μ L of each lysate was saved and used as a loading control. 20 μ L of EZ myc beads (Sigma Aldrich) pre-washed 3 times with lysis buffer were added in the lysate and rotated for 2 h at 4°C. After rotating, the beads were washed 3 times with lysis buffer and resuspended into 100 μ L of TBS1X containing 10 μ g/mL of myc peptide for 30 min at 4°C. 70 μ L of the supernatant containing the protein complexes without beads/Ab was taken off. Each sample was boiled at 100°C for 5 min after adding 5 $\times$ Laemmli buffer, subjected to 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and immunoblotted with the indicated antibodies. Pull-down assays with beads containing GST-tagged RhoA (Cytoskeleton) were described in Rougerie *et al.* [9].

Statistical analysis

Statistical significance was analyzed by paired two-tailed Student's *t*-test and expressed as a *p* value.

The number of analyzed samples (n) is indicated. All experiments were performed at least as three independent experiments. When indicated, standard deviations are represented as scale bars on graphs. We used the following conventions to illustrate the *p* value: *0.01 < *p* < 0.05, **0.01 < *p* < 0.001, ****p* < 0.001. ns: not significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Gussoni for providing reagents. C. Randriamampita and C. Charvet for discussions and N. Delon for editing the manuscript. This work was supported by Inserm, CNRS and Ligue Nationale Contre le Cancer. Cytometry data acquisition, cell sorting and time-lapse experiments were performed in the Immunobiology and Imaging Cochin facilities, respectively.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

FUNDING SUPPORT

This work was granted by La Ligue Nationale Contre le Cancer, CNRS and Inserm.

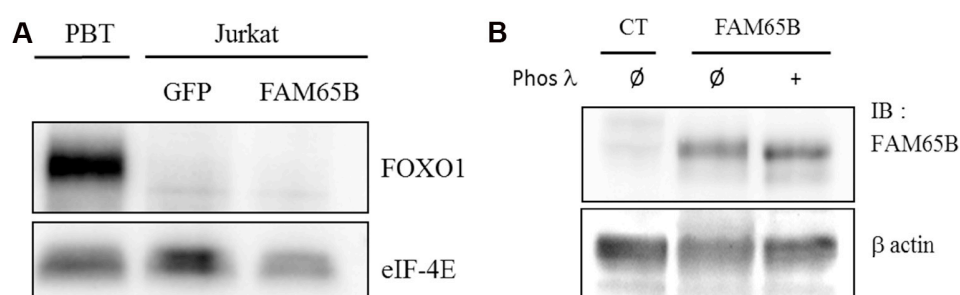
REFERENCES

1. Yusuf I, Fruman DA. Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends Immunol.* 2003; 24:380–386.
2. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 2008; 29:848–862.
3. Takada K, Jameson SC. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9:823–832.
4. Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14:83–97.
5. Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci.* 2014; 39:159–169.
6. Fabre S, Lang V, Harriague J, Jobart A, Unterman TG, Trautmann A, Bismuth G. Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FoxO1 nuclear exclusion and cell growth control. *J Immunol.* 2005; 174:4161–4171.
7. Fabre S, Carrette F, Chen J, Lang V, Semichon M, Denoyelle C, Lazar V, Cagnard N, Dubart-Kupperschmitt A, Mangeney M, Fruman DA, Bismuth G. FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol.* 2008; 181:2980–2989.
8. Kerdiles YM, Beisner DR, Tinoco R, Dejean AS, Castrillon DH, DePinho RA, Hedrick SM. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol.* 2009; 10:176–184.
9. Rougerie P, Largeteau Q, Megrelis L, Carrette F, Lejeune T, Toffali L, Rossi B, Zeghouf M, Cherfils J, Constantin G, Laudanna C, Bismuth G, Mangeney M, et al. Fam65b is a new transcriptional target of FOXO1 that regulates RhoA signaling for T lymphocyte migration. *J Immunol.* 2013; 190:748–755.
10. Gao K, Tang W, Li Y, Zhang P, Wang D, Yu L, Wang C, Wu D. Front-signal-dependent accumulation of the RHOA inhibitor FAM65B at leading edges polarizes neutrophils. *J Cell Sci.* 2015; 128:992–1000.
11. Yoon S, Molloy MJ, Wu MP, Cowan DB, Gussoni E. C6ORF32 is upregulated during muscle cell differentiation and induces the formation of cellular filopodia. *Dev Biol.* 2007; 301:70–81.
12. Balasubramanian A, Kawahara G, Gupta VA, Rozkalne A, Beauvais A, Kunkel LM, Gussoni E. Fam65b is important for formation of the HDAC6-dysferlin protein complex during myogenic cell differentiation. *Faseb J.* 2014; 28:2955–2969.
13. Diaz-Horta O, Subasioglu-Uzak A, Grati M, DeSmidt A, Foster J 2nd, Cao L, Bademci G, Tokgoz-Yilmaz S, Duman D, Cengiz FB, Abad C, Mittal R, et al. FAM65B is a membrane-associated protein of hair cell stereocilia required for hearing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111:9864–9868.
14. Gardino AK, Yaffe MB. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* 2011; 22:688–695.
15. Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, Metelnikov P, O'Donnell P, Taylor P, Taylor L, Zougman A, Woodgett JR, Langeberg LK, et al. Proteomic, functional, and domain-based analysis of *in vivo* 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol.* 2004; 14:1436–1450.
16. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:11285–11290.
17. O'Connell CB, Khodjakov AL. Cooperative mechanisms of mitotic spindle formation. *J Cell Sci.* 2007; 120:1717–1722.
18. Hirayama E, Kim J. Identification and characterization of a novel neural cell adhesion molecule (NCAM)-associated protein from quail myoblasts: relationship to myotube formation and induction of neurite-like protrusions. *Differentiation.* 2008; 76:253–266.
19. Chircop M. Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Small GTPases.* 2014; 5.
20. Mortenson JB, Heppler LN, Banks CJ, Weerasekara VK, Whited MD, Piccolo SR, Johnson WE, Thompson JW,

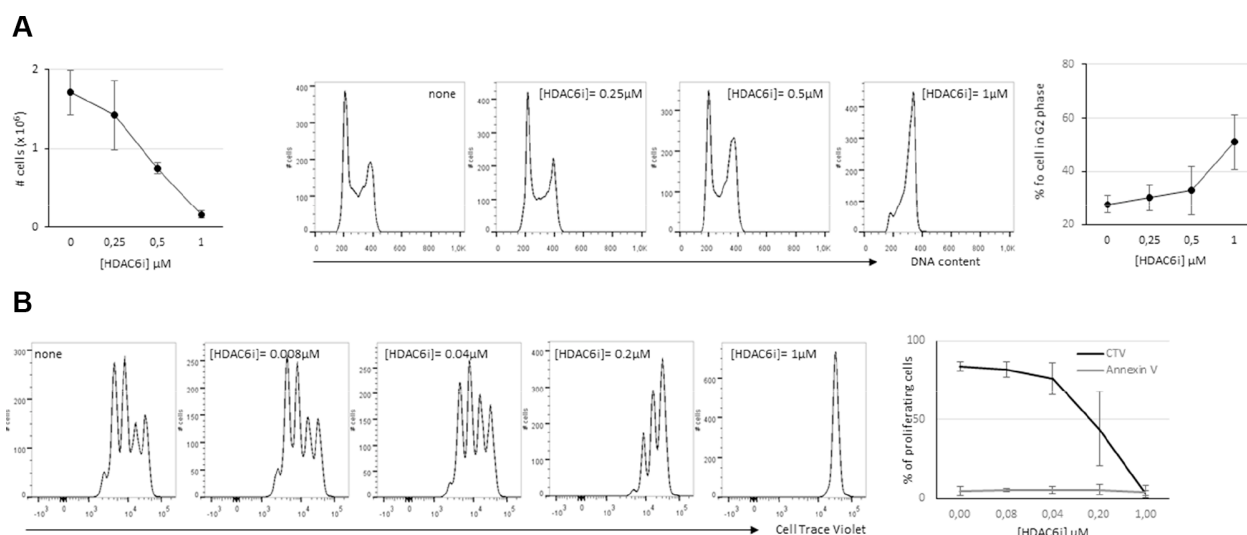
- Andersen JL. Histone deacetylase 6 (HDAC6) promotes the pro-survival activity of 14-3-3zeta via deacetylation of lysines within the 14-3-3zeta binding pocket. *J Biol Chem*. 2015; 290:12487–12496.
21. Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS, Macallan DC. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:231–237.
 22. Hsu YC, Fuchs E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13:103–114.
 23. Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 14:329–340.
 24. Rowell EA, Wells AD. The role of cyclin-dependent kinases in T-cell development, proliferation, and function. *Crit Rev Immunol*. 2006; 26:189–212.
 25. Yang K, Shrestha S, Zeng H, Karmaus PW, Neale G, Vogel P, Guertin DA, Lamb RF, Chi H. T cell exit from quiescence and differentiation into Th2 cells depend on Raptor-mTORC1-mediated metabolic reprogramming. *Immunity*. 2013; 39:1043–1056.
 26. Dakour J, Li H, Morrish DW. PL48: a novel gene associated with cytotrophoblast and lineage-specific HL-60 cell differentiation. *Gene*. 1997; 185:153–157.
 27. Blaise S, de Parseval N, Benit L, Heidmann T. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:13013–13018.
 28. Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC Jr, McCoy JM. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*. 2000; 403:785–789.
 29. Chuprin A, Gal H, Biron-Shental T, Biran A, Amiel A, Rozenblatt S, Krizhanovsky V. Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev*. 2013; 27:2356–2366.
 30. Ho KK, Myatt SS, Lam EW. Many forks in the path: cycling with FoxO. *Oncogene*. 2008; 27:2300–2311.
 31. Aldana-Masangkay GI, Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, Hsieh YT, Kim YM, Lomenick B, Okemoto K, Landaw EM, Wang D, Mazitschek R, Bradner JE, Sakamoto KM. Tubacin suppresses proliferation and induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 2011; 52:1544–1555.
 32. Hackanson B, Rimmele L, Benkisser M, Abdelkarim M, Fliegauf M, Jung M, Lubbert M. HDAC6 as a target for antileukemic drugs in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2012; 36:1055–1062.
 33. Tsuji G, Okiyama N, Villarroel VA, Katz SI. Histone deacetylase 6 inhibition impairs effector CD8 T-cell functions during skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 135:1228–1239.
 34. Yang MH, Laurent G, Bause AS, Spang R, German N, Haigis MC, Haigis KM. HDAC6 and SIRT2 regulate the acetylation state and oncogenic activity of mutant K-RAS. *Mol Cancer Res*. 2013; 11:1072–1077.
 35. Forcioli-Conti N, Esteve D, Bouloumie A, Dani C, Peraldi P. The size of the primary cilium and acetylated tubulin are modulated during adipocyte differentiation: Analysis of HDAC6 functions in these processes. *Biochimie*. 2015; 124:112–123.
 36. Gradilone SA, Radtke BN, Bogert PS, Huang BQ, Gajdos GB, LaRusso NF. HDAC6 inhibition restores ciliary expression and decreases tumor growth. *Cancer Res*. 2013; 73:2259–2270.
 37. Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12:222–234.
 38. Mayya V, Lundgren DH, Hwang SI, Rezaul K, Wu L, Eng JK, Rodionov V, Han DK. Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci Signal*. 2009; 2:ra46.
 39. Kong KF, Fu G, Zhang Y, Yokosuka T, Casas J, Canonigo-Balancio AJ, Becart S, Kim G, Yates JR, 3rd, Kronenberg M, Saito T, Gascoigne NR, et al. Protein kinase C- η controls CTLA-4-mediated regulatory T cell function. *Nat Immunol*. 2014; 15:465–472.
 40. Chakraborty AK, Weiss A. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat Immunol*. 2014; 15:798–807.
 41. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:591–619.
 42. Bonnefoy-Berard N, Liu YC, von Willebrand M, Sung A, Elly C, Mustelin T, Yoshida H, Ishizaka K, Altman A. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:10142–10146.
 43. Foucault I, Liu YC, Bernard A, Deckert M. The chaperone protein 14-3-3 interacts with 3BP2/SH3BP2 and regulates its adapter function. *J Biol Chem*. 2003; 278:7146–7153.
 44. Liu YC, Elly C, Yoshida H, Bonnefoy-Berard N, Altman A. Activation-modulated association of 14-3-3 proteins with Cbl in T cells. *J Biol Chem*. 1996; 271:14591–14595.
 45. Meller N, Liu YC, Collins TL, Bonnefoy-Berard N, Baier G, Isakov N, Altman A. Direct interaction between protein kinase C θ (PKC θ) and 14-3-3 τ in T cells: 14-3-3 overexpression results in inhibition of PKC θ translocation and function. *Mol Cell Biol*. 1996; 16:5782–5791.
 46. Oh HM, Yu CR, Dambuza I, Marrero B, Ekwuagu CE. STAT3 protein interacts with Class O Forkhead transcription factors in the cytoplasm and regulates nuclear/cytoplasmic localization of FoxO1 and FoxO3a proteins in CD4(+) T cells. *J Biol Chem*. 2012; 287:30436–30443.
 47. Dhanyamraju PK, Holz PS, Finkernagel F, Fendrich V, Lauth M. Histone deacetylase 6 represents a novel drug target in the oncogenic Hedgehog signaling pathway. *Mol Cancer Ther*. 2015; 14:727–739.

FAM65B controls the proliferation of transformed and primary T cells

Supplementary Materials

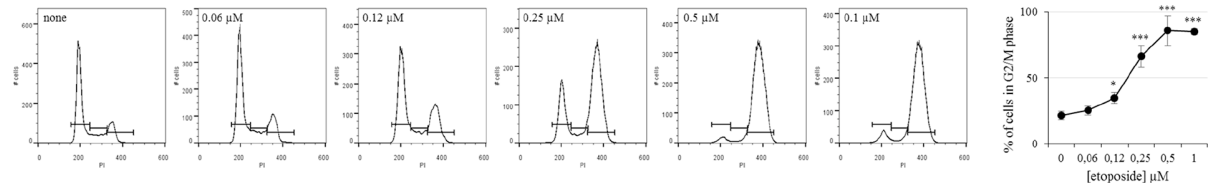


Supplementary Figure S1: Re-expression of FAM65B does not modify FOXO1 expression in Jurkat cell line and FAM65B is phosphorylated in Jurkat cell line. (A) Expression of FOXO1 analysis in lysates from peripheral blood T cells (PBT), used as positive control and Jurkat cells transfected with GFP or FAM65B GFP. (B) Lysates from Jurkat cells transfected with GFP or FAM65B GFP were treated with λ phosphatase and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

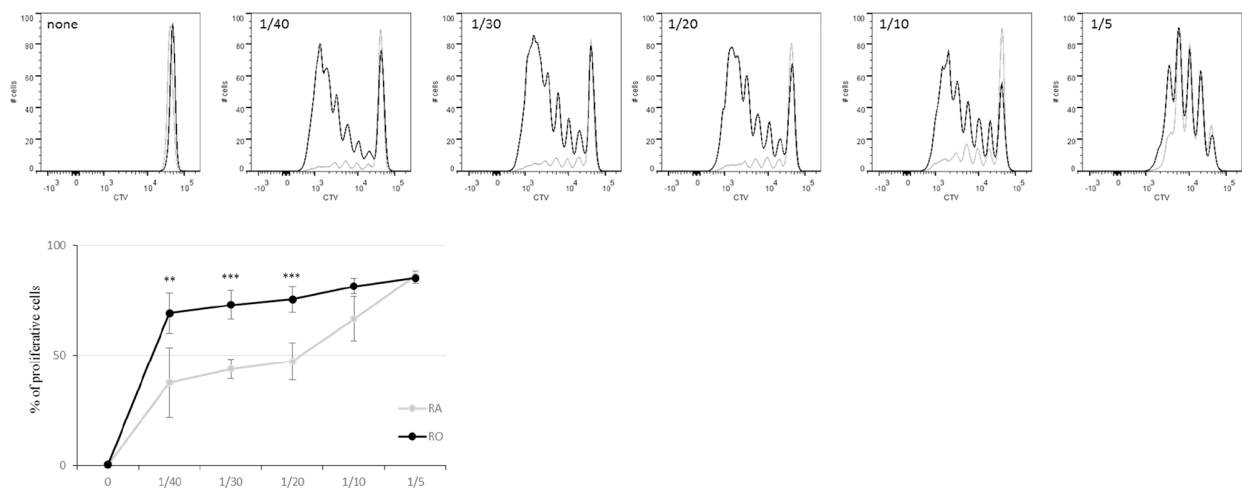


Supplementary Figure S2: Inhibition of HDAC6 inhibits T cell proliferation and blocks cell cycle progression in G2/M.

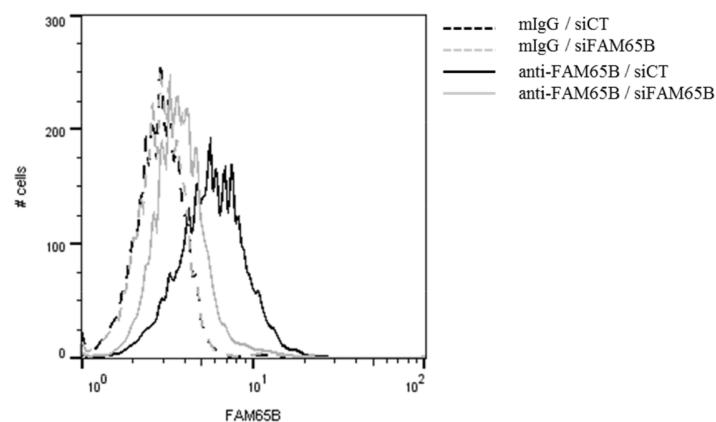
(A) Jurkat cells were treated with increasing dose of HDAC6 inhibitor for 18 hours and their cell cycle was analyzed by flow cytometry. Results are representative of three experiments. Graphs represent the proliferation of cells (left panels) and the proportion of cells in G2/M phase (right panel) in function of the treatment. (B) Human primary T cells were stained with CTV and stimulated in vitro with anti-CD3 and anti-CD28 coated beads in presence of increasing dose of HDAC6 inhibitor. The effect of this inhibitor on cell proliferation and cell mortality was measured by flow cytometry after three days. Results are representative of three experiments. Means of the percentage of proliferating cells were plotted (right panel).



Supplementary Figure S3: Etoposide blocks cell cycle progression in G2/M. Jurkat cells were treated with increasing dose of etoposide for 18 hours and their cell cycle was analyzed by flow cytometry. Results are representative of three experiments. Graphs represent the proportion of cells in G2/M phase (right panel) in function of the treatment.



Supplementary Figure S4: CD45 RA positive cells are less prone to proliferate. Human primary CD45 RA⁺ and RO⁺ T cells were stained with CTV and stimulated in vitro with anti-CD3 and anti-CD28 coated beads. Cell proliferation was measured by flow cytometry after three days. Results are representative of three experiments. Means of the percentage of proliferating cells were plotted (lower panel).



Supplementary Figure S5: Analyze of the expression of FAM65B after transfection of siRNA CT or FAM65B. Four days after transfection with siRNA CT or FAM65B, the human primary T cells were stained with anti-FAM65B antibodies or control immunoglobulin. These control experiments were systematically performed to check for extinction of FAM65B expression.

Supplementary Table S1: sequences of the primers use

Séquence (5' – 3')		
peGFP-FAM65B RL151-152AA	F R	tgtatccagcgaGCcGCccaggatgggtgccagcaaaatgaagca tgcttcattttgctggcaccatcctggGCgGCtcgctggataca
peGFP-FAM65B S(x5)A	S21A_F S21A_R S37A_F S37A_R S523A_F S523A_R S535A_F S535A_R S341A_F S341A_R	atcattagaagccagGcctttgcgggttcagcggc gccgctgaaacccgcaaaggCctggcttctaagat ggcgatccagggtgaacGccttcattgaaaatt aattttcaatgaaggCgttacacctggatcgcc ctggtcaagaggctcacaGCTgcagagggtccaatggcc ggccattggcacctctgcAGCtgtgagcctcttgaccag atggccacagacaggctctcGCTgagggttctgttggtgga tccaccaacagaaccctcAGCgagcagcctgtctgtggccat cccttcagaggagaatgGCCatgtacagccagggtacc ggtaccctggctgtacatGGCattctcctctgaaggg
pmCherry-FAM65B	F R	atacatACCGGTCCGCCACATGgtgagcaaggcgaggagga atgtatGCGGCCGcttactgtacagctcgtccatgccg
pEF-FAM65B-myc	F R	atacatACTAGTatgttggtaggatcccagctttttcgcc gtcatgaatttgatgatattctaaaaaagGATATCatacat
ppia (qRT-PCR)	F R	ggtgacttcacacgataatg acaagatgcaggaccgtat
Fam65b (qRT-PCR)	F R	gcggagtttaacctcagcag ccttcagggtgactttggc

Annexe B

Article 2 : Evidence that HIV-1 restriction factor SAMHD1 facilitates differentiation of myeloid THP-1 cells

Publié dans *Virology Journal* en 2015

SHORT REPORT

Open Access



Evidence that HIV-1 restriction factor SAMHD1 facilitates differentiation of myeloid THP-1 cells

Loïc Dragin^{1,2,3}, Soundasse Munir-Matloob^{1,2,3}, Jeanne Froehlich^{1,2,3}, Marina Morel^{1,2,3}, Adèle Sourisce^{1,2,3}, Hichem Lahouassa^{1,2,3}, Karine Bailly^{1,2,3}, Marianne Mangeney^{1,2,3}, Bertha Cecilia Ramirez^{1,2,3} and Florence Margottin-Goguet^{1,2,3*}

Abstract

Background: SAMHD1 counteracts HIV-1 or HIV-2/SIVsmm that lacks Vpx by depleting the intracellular pool of nucleotides in myeloid cells and CD4+ quiescent T cells, thereby inhibiting the synthesis of retroviral DNA by reverse transcriptase. Depletion of nucleotides has been shown to underline the establishment of quiescence in certain cellular systems. These observations led us to investigate whether SAMHD1 could control the transition between proliferation and quiescence using the THP-1 cell model.

Findings: The entry of dividing THP-1 myeloid cells into a non-dividing differentiated state was monitored after addition of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), an inducer of differentiation. Under PMA treatment, cells overexpressing SAMHD1 display stronger and faster adhesion to their support, compared to cells expressing a catalytically inactive form of SAMHD1, or cells depleted of SAMHD1, which appear less differentiated. After PMA removal, cells overexpressing SAMHD1 maintain low levels of cyclin A, in contrast to other cell lines. Interestingly, SAMHD1 overexpression slightly increases cell adhesion even in the absence of the differentiation inducer PMA. Finally, we found that levels of SAMHD1 are reduced in proliferating primary CD4+ T cells after T cell receptor activation, suggesting that SAMHD1 may also be involved in the transition from a quiescent state to a dividing state in primary T cells.

Conclusions: Altogether, we provide evidence that SAMHD1 may facilitate some aspects of THP-1 cell differentiation. Restriction of HIV-1 by SAMHD1 may rely upon its ability to modify cell cycle parameters, in addition to the direct inhibition of reverse transcription.

Keywords: HIV, SAMHD1, Restriction factor, Differentiation, Cell cycle, Myeloid cells, T cells

Findings

Immune quiescent cells display reduced susceptibility to HIV-1 productive infection, due to several quiescence-related phenomena such as cytoskeleton organization or low viral transcription. The activity of several restriction factors also contributes to viral inhibition by blocking specific steps of the viral life cycle. Among them, sterile alpha motif and HD-domain containing protein 1 (SAMHD1) inhibits both

HIV-1 and Vpx-deleted HIV-2/SIVsmm viruses at the level of reverse transcription [1, 2]. SAMHD1 reduces the intracellular pool of dNTP through its dNTP hydrolase activity in myeloid and quiescent CD4+ T cells [3–7]. Recent studies report that SAMHD1 also has an RNase activity targeting HIV-1 genomic RNA [8]. The dNTPase activity of the protein is dependent on an intact phosphodiesterase HD domain [1, 2]. Though HIV-1 is sensitive to SAMHD1, it has not developed a viral weapon to counteract this hindrance. In contrast, HIV-2/SIVsmm encodes for the Vpx auxiliary protein, which induces SAMHD1

* Correspondence: florence.margottin-goguet@inserm.fr

¹Inserm, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France

²CNRS, UMR8104, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



degradation by hijacking the Cul4A-DDB1 ubiquitin ligase through DCAF1 binding [1, 2].

Several reports point to a role of SAMHD1 in tumorigenesis and in cell cycle progression. In particular, SAMHD1 has been found mutated in chronic lymphocytic leukemia (CLL) [9]. In CLL patient cells, SAMHD1 expression is often reduced as it is the case in several cancer cell lines [9]. Whole sequencing has also suggested that SAMHD1 could be mutated in malignancies [10]. Regarding cell cycle progression, proliferation in HeLa cells is favored by the dNTPase defective SAMHD1 HD/AA mutant [9]. In fibroblasts, SAMHD1 has been shown to be variously expressed along the cell

cycle, maximally during quiescence and minimally during S-phase, which correlates with the need for dNTP during DNA replication [11]. Apart from SAMHD1, several reports suggest that suppression of nucleotide metabolism underlines the establishment of a quiescent state and promotes genomic instability [12–14]. Altogether, we brought up the hypothesis that SAMHD1 may facilitate the entry into or the maintenance of quiescence. To test our hypothesis, we used suspension cultures of the monocytic cell line THP-1 that differentiate into a macrophage-like phenotype under phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) treatment and therefore transit from a dividing state to a quiescent state. PMA-induced differentiation of

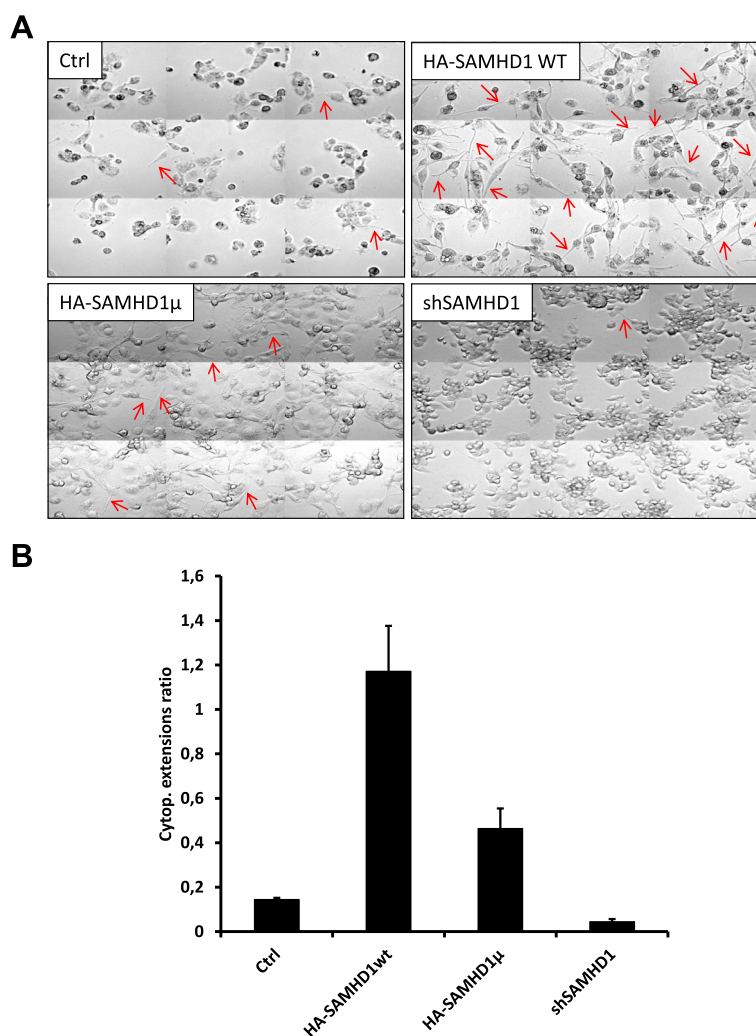


Fig. 1 SAMHD1 overexpression promotes PMA-induced differentiation-related morphological phenotype of THP-1 cells. THP-1 control cells and monoclonal cell lines stably expressing HA-tagged SAMHD1 (wild-type or the HD/AA catalytically inactive mutant) or shRNA targeting SAMHD1 were differentiated by addition of 65 nM of PMA in the culture medium (2.10^5 cells/ml). 24 h after PMA removal, cells were left in PMA-free medium for several days. **(a)** Cell morphology was observed with a Zeiss 5 microscope (Gx20). The pictures shown here were taken 72 h after PMA addition. The results are representative of three independent experiments. **(b)** For each cell line, cytoplasmic extensions of cells 72 h after PMA addition were counted and normalized with regards to cell numbers (approximately 300 cells in each condition). The cytoplasmic extensions ratios obtained result from two independent experiments

THP-1 cells results, among other things, in cell morphological changes, adhesion to the plastic surface and expression of macrophage surface markers such as CD11a, CD11b and ICAM1 [15, 16]. In addition, THP-1 cells acquire the ability to restrict HIV infection along differentiation, following SAMHD1 dephosphorylation on a specific threonine [17–19].

We established THP-1 myeloid cell lines stably overexpressing HA-tagged wt SAMHD1 or the catalytic mutant form of the protein (HD/AA, referred to SAMHD1 μ on the figures) or cells depleted of SAMHD1 (shSAMHD1).

As previously reported, the promoter from the pLenti vector used for SAMHD1 expression is sensitive to PMA [4]. In the absence of PMA, exogenous SAMHD1 is poorly expressed, while in PMA-treated cells, levels of SAMHD1 and SAMHD1 HD/AA increased equally (Additional file 1: Figure S1A).

PMA-mediated THP-1 differentiation is visible under the microscope with the appearance of multiple morphological changes, including the transition from a round shape to a fibroblast-like shape, the appearance of membrane extensions and cell adhesion to the support

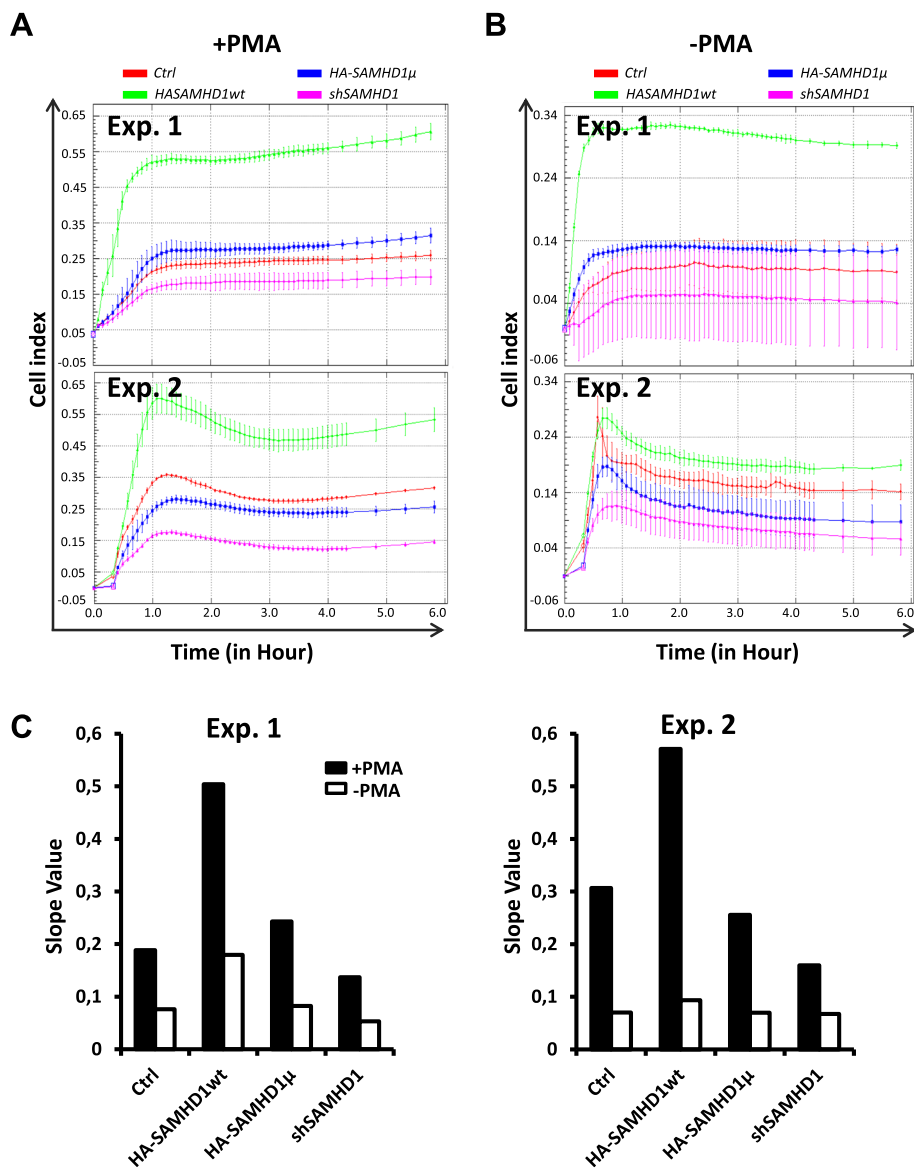


Fig. 2 SAMHD1 overexpression increases differentiation-associated adhesion of cells. Equal numbers of cells from each Cell line described in Fig. 1 were tested for their ability to adhere in the presence (a) or absence (b) of the PMA differentiation-inducer, using the xCELLigence apparatus. Three independant experiments were conducted, two of them are shown. (c) The slopes of the curves during the adhesion process in (a) and (b) (from 0 to 1 h) were calculated for all cell lines in both experiments

(Additional file 2: Figure S2). Following PMA treatment, cells stably expressing HA-tagged SAMHD1 displayed a fibroblast-like shape and multiple extensions faster than control cells (Ctrl) or cells depleted of SAMHD1 (shSAMHD1) that remained in a round shape (Fig. 1a and Additional file 2: Figure S2 for the kinetics of these changes). Cells stably expressing the HD/AA mutant had an intermediate phenotype. For each cell line we counted the cytoplasmic extensions appearing over time after PMA-induced differentiation. Determination of the ratios between the number of extensions and the

number of cells in each condition showed an increase of differentiation-associated cytoplasmic extensions in cells overexpressing HA-SAMHD1 compared to control cells (Fig. 1b). As suspected, cells overexpressing the HD/AA catalytic mutant showed an intermediary phenotype, with more extensions than control cells but less than cells overexpressing the wild-type protein. As a corollary, SAMHD1 depleted cells displayed less of these extensions.

Cell adhesion was monitored using the xCELLigence system developed by ACEA Biosciences, which relies on

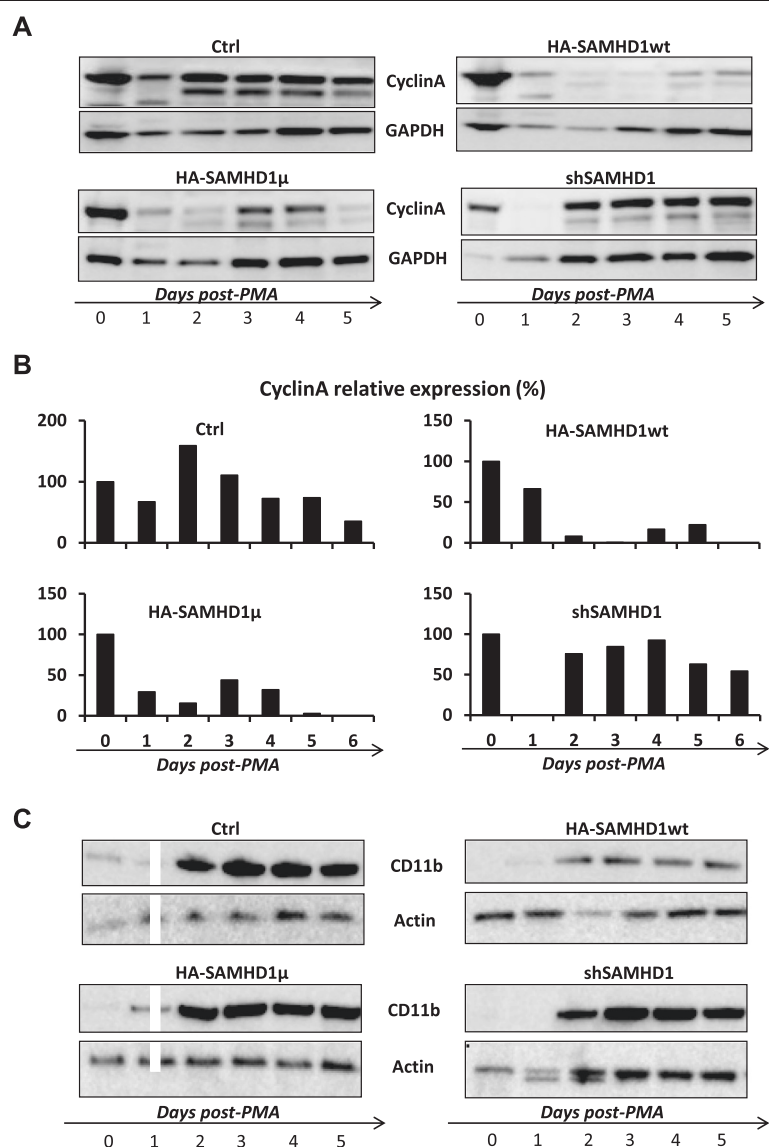


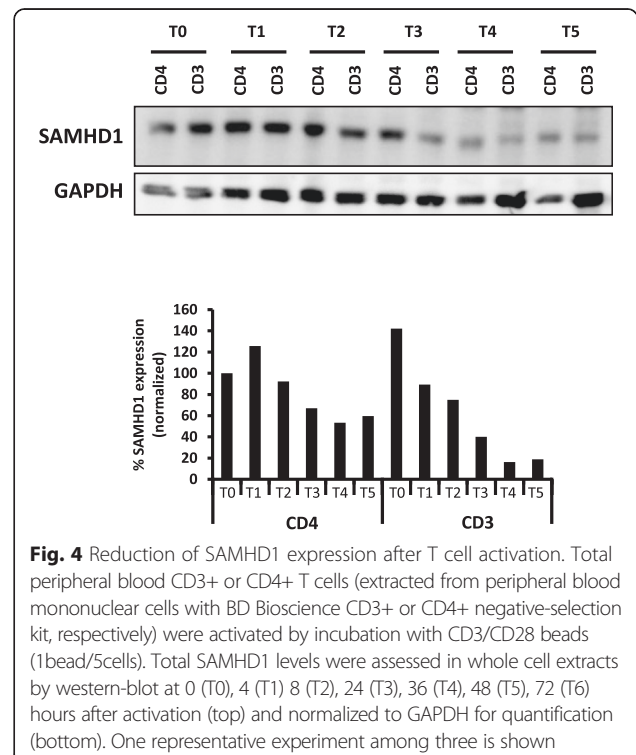
Fig. 3 SAMHD1 overexpression contributes to maintain low levels of cyclin A following PMA-induced differentiation. Cell lines described in Fig. 1 received (or not) a 65 nM PMA treatment for 24 h, then were distributed in 6-well plates. Cells were lysed at the indicated times (from day 0 to day 5 of differentiation). Western-blot analysis of two markers was conducted in whole cell extracts: Cyclin A (**a**), whose quantification levels compared to GAPDH are shown in (**b**), and the macrophage differentiation marker CD11b (**c**). The results are representative of two independent experiments

the measurement of electrical impedance of the cell population by micro-electronic biosensors in a plastic well over time [20]. Two parameters reflect fast and strong adhesion: a high slope of the line $< \text{impedance} = a(\text{time}) + b >$ at the beginning of the measure and a high cell index providing that cells are plated at the same density. Cells overexpressing wt SAMHD1 adhered to the support after PMA addition faster than control cells, SAMHD1 HD/AA expressing cells and SAMHD1 depleted cells whose impedance levels were slightly decreased (Fig. 2a, 2 distinct experiments shown). Same results were obtained with three different clones for each cell line (data not shown and Additional file 1: Figure S1 B for the analysis of the selected clones by western blot). In agreement with these observations, the slope of the line during the first hour of adhesion was higher in cells where SAMHD1 was overexpressed (Fig. 2c). Importantly, SAMHD1 HD/AA overexpression had no effect on the increase of cell adhesion, though it was expressed as well as the wild type protein (see western blot Additional file 1: Figure S1). Finally SAMHD1-depleted cells adhered in a reproducible way a little bit less efficiently than control cells, suggesting that endogenous SAMHD1 could also facilitate differentiation (Fig. 2a).

To our surprise, even in the absence of PMA, a small increase in adhesion capability was detected in SAMHD1 overexpressing cells (Fig. 2b and c). This increase was reproducible but in some experiments was transient (Fig. 2b, Exp. 2) and, in any case, less efficient than in PMA-treated cells (Fig. 2c). Nonetheless, overexpression of wt SAMHD1 was not sufficient to induce cell differentiation or to confer a differentiation-associated restriction phenotype against HIV to dividing THP-1 cells (without PMA), while it can increase restriction when the cells were differentiated in the presence of PMA (data not shown and [21]).

We further analyzed expression of cell cycle (Cyclin A) and differentiation (CD11b) markers following PMA treatment. Cyclin A is a classical cyclin, whose levels fluctuate during cell cycle progression, being up in S and G2 phases and down from early mitosis to the end of G1 and in non-dividing cells [22]. Two to four days after PMA treatment, cyclin A levels remained high in wt THP-1 cells and SAMHD1-depleted cells, but stayed low in SAMHD1 over-expressing cells (Fig. 3a, b and Additional file 3: Figure S3 for a second experiment). No final conclusion could be drawn with SAMHD1 HD/AA cells, in which cyclin A levels did not always fluctuate in the same direction (Fig. 3a, b and Additional file 3: Figure S3). These results further suggest that SAMHD1 could facilitate the quiescent state, though it is unclear whether it depends on the enzymatic activity of the protein. CD11b was also analyzed as a marker of differentiation [15, 16]. The kinetics of CD11b appearance did not significantly change with SAMHD1 over-expression or extinction (Fig. 3c).

Quiescence and differentiation are intimately linked when treating THP-1 cells with PMA. On the one hand entry into quiescence is induced by cellular differentiation. On the other hand, SAMHD1 overexpression may help to maintain a quiescent state that facilitates differentiation. Further work is needed to unravel the exact mechanism by which SAMHD1 impacts this transition process. A distinct relevant model to study transition from quiescence to proliferation *per se* is provided by primary CD4⁺ T cells, which transit from a quiescent state to a dividing state following activation. This activation process correlates with enhanced cell permissivity to HIV-1 infection and with SAMHD1 phosphorylation [6, 7, 17, 23–25]. We hypothesized that SAMHD1 may contribute to maintain CD4⁺ T cells in a quiescent state. In support of this hypothesis, we found that SAMHD1 expression is reduced along T-cell activation (Fig. 4) in agreement with recent studies [23]. Future work should aim to analyze whether SAMHD1 overexpression in quiescent CD4⁺ T cells would delay entry into cell cycle following T cell activation and whether the lentiviral accessory protein Vpx, on the contrary, by triggering SAMHD1 degradation, could accelerate the activation process. We speculate that SAMHD1-mediated restriction finds support in its ability to modify cell cycle parameters, in addition to the direct inhibition of reverse transcription.



Additional files

Additional file 1: Figure S1. Expression of endogenous and exogenous SAMHD1 in the different cell lines. THP-1 cells transduced with lentiviral vectors expressing HA-tagged SAMHD1 wt, SAMHD1 HD/AA mutant, or shRNA targeting SAMHD1 mRNA were clonally selected under puromycin treatment (2 µg/ml) for two weeks. (A) Expression of HA-SAMHD1 or endogenous SAMHD1 is shown for clones 25 (HA-SAMHD1 wt), 14 (HA-SAMHD1 HD/AA) and 4 (shSAMHD1) that were chosen for the results presented in this manuscript. (B) The results of all the experiments were reproducible with distinct monoclonal cell lines (blue boxes). (PDF 466 kb)

Additional file 2: Figure S2. Kinetics of cell morphological changes after PMA addition in the different THP-1 cell lines. Cell lines shown in Fig. 1, differentiated by PMA treatment for 24 h, were observed with a Zeiss 5 microscope (Gx20). Pictures were taken at the indicated times after treatment with PMA. (PDF 610 kb)

Additional file 3: Figure S3. Cyclin A level fluctuations after PMA treatment in the different THP-1 cell lines. This figure shows a second independent experiment as the one presented in Fig. 3 a and b. Western-blot assessment of cyclin A and GAPDH levels at the indicated times was conducted (A) and quantification was performed (B). (PDF 280 kb)

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LD, BCR and FMG conceived the study and wrote the manuscript. LD, SMM, MM, AS performed the experiments. JF and MM brought their expertise on CD4 T cell activation. HL participated in helpful discussions. KB brought her expertise in the xCELLigence system. All authors approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Cytometry and Immunobiology Facility of the Cochin Institute. This work was supported by grants from the "Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les hépatites virales" (ANRS), SIDACTION, "Fondation de France" and "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM, grant number DEQ20140329528 attributed to FM). LD and JF received a fellowship from the French "Ministère de la Recherche et la Technologie" (MRT) and LD also from SIDACTION, AS from SIDACTION and Fondation de France, SMM from "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM) and HL from ANRS.

Author details

¹Inserm, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France. ²CNRS, UMR8104, Paris, France. ³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

Received: 2 July 2015 Accepted: 15 November 2015

Published online: 25 November 2015

References

- Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature*. 2011;474:658–61.
- Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringard M, Chable-Bessia C, Segal E et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. 2011;474:654–7.
- Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, Groom HC, Rice GI, Christodoulou E et al. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature*. 2011;480:379–82.
- Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*. 2012;13:223–8.
- Powell RD, Holland PJ, Hollis T, Perrino FW. Aicardi-Goutieres syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleoside triphosphohydrolase. *J Biol Chem*. 2011;286:43596–600.
- Baldauf HM, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med*. 2012;18:1682–9.
- Descours B, Cribier A, Chable-Bessia C, Ayinde D, Rice G, Crow Y et al. SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4+ T-cells. *Retrovirology*. 2012;9:87.
- Ryoo J, Choi J, Oh C, Kim S, Seo M, Kim SY et al. The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat Med*. 2014;20:936–41.
- Clifford R, Louis T, Robbe P, Ackroyd S, Burns A, Timbs AT et al. SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage. *Blood*. 2014;123:1021–31.
- Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152:714–26.
- Franzolin E, Pontarin G, Rampazzo C, Miazzi C, Ferraro P, Palumbo E et al. The deoxynucleoside triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:14272–7.
- Aird KM, Zhang G, Li H, Tu Z, Bitler BG, Garipov A et al. Suppression of nucleotide metabolism underlies the establishment and maintenance of oncogene-induced senescence. *Cell Rep*. 2013;3:1252–65.
- Bester AC, Roniger M, Oren YS, Im MM, Sarni D, Chaoat M et al. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell*. 2011;145:435–46.
- Kunz BA, Kohalmi SE, Kunkel TA, Mathews CK, McIntosh EM, Reidy JA. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat Res*. 1994;318:1–64.
- Munoz-Pacheco P, Ortega-Hernandez A, Miana M, Cachofeiro V, Fernandez-Cruz A, Gomez-Garre D. Ezetimibe inhibits PMA-induced monocyte/macrophage differentiation by altering microRNA expression: a novel anti-atherosclerotic mechanism. *Pharmacol Res*. 2012;66:536–43.
- Most J, Schwaebler W, Drach J, Sommerauer A, Dierich MP. Regulation of the expression of ICAM-1 on human monocytes and monocytic tumor cell lines. *J Immunol*. 1992;148:1635–42.
- Cribier A, Descours B, Valadao AL, Laguette N, Benkirane M. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1. *Cell Rep*. 2013;3:1036–43.
- Welbourn S, Dutta SM, Semmes OJ, Strebel K. Restriction of virus infection but not catalytic dNTPase activity is regulated by phosphorylation of SAMHD1. *J Virol*. 2013;87:11516–24.
- White TE, Brandariz-Nunez A, Valle-Casuso JC, Amie S, Nguyen LA, Kim B et al. The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleoside triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation. *Cell Host Microbe*. 2013;13:441–51.
- Tibaldi L, Leyman S, Nicolas A, Notebaert S, Dewulf M, Ngo TH et al. New blocking antibodies impede adhesion, migration and survival of ovarian cancer cells, highlighting MFG8 as a potential therapeutic target of human ovarian carcinoma. *PLoS One*. 2013;8:e72708.
- Dragin L, Nguyen LA, Lahouassa H, Sourisce A, Kim B, Ramirez BC et al. Interferon block to HIV-1 transduction in macrophages despite SAMHD1 degradation and high deoxynucleoside triphosphates supply. *Retrovirology*. 2013;10:30.
- Di Fiore B, Davey NE, Hagting A, Izawa D, Mansfeld J, Gibson TJ et al. The ABBA motif binds APC/C activators and is shared by APC/C substrates and regulators. *Dev Cell*. 2015;32:358–72.
- Ruffin N, Brezar V, Ayinde D, Lefebvre C, Schulze Zur Wiesch J, van Lunzen J et al. Low SAMHD1 expression following T-cell activation and proliferation renders CD4+ T cells susceptible to HIV-1. *AIDS*. 2015;29:519–30.
- Schmidt S, Schenkova K, Adam T, Erikson E, Lehmann Koch J, Sertel S et al. SAMHD1's protein expression profile in humans. *J Leukoc Biol*. 2015. doi:10.1189/jlb.4HI0714-338RR.
- Pauls E, Ruiz A, Badia R, Permanyer M, Gubern A, Riveira-Munoz E et al. Cell cycle control and HIV-1 susceptibility are linked by CDK6-dependent CDK2 phosphorylation of SAMHD1 in myeloid and lymphoid cells. *J Immunol*. 2014;193:1988–97.