



**HAL**  
open science

# Rôles dans les lymphocytes T de la protéine Lis1, un régulateur de la dynamique des microtubules dépendante de la dynéine

Jérémy Argenty

► **To cite this version:**

Jérémy Argenty. Rôles dans les lymphocytes T de la protéine Lis1, un régulateur de la dynamique des microtubules dépendante de la dynéine. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30123 . tel-02277145

**HAL Id: tel-02277145**

**<https://theses.hal.science/tel-02277145>**

Submitted on 3 Sep 2019

**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.



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Jérémy ARGENTY**

le mardi 25 septembre 2018

**Titre :**

**Rôles dans les lymphocytes T de la protéine Lis1, un régulateur de la dynamique des microtubules dépendante de la dynéine**

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Immunologie

**Unité de recherche :**

Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan - Inserm U1043 CNRS UMR5282 UPS

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr. Abdelhadi SAOUDI

Dr. Renaud LESOURNE

**Jury :**

Pr. Denis HUDRISIER, président

Pr. Nadia BAHY-BUISSON, rapporteur

Dr. Magali IRLA, rapporteur

Dr. Jérôme DELON, rapporteur







# REMERCIEMENTS

Ce manuscrit met un terme à 8 années d'études et à plus de 3 ans passés dans ce laboratoire au sein duquel j'ai pu interagir et échanger scientifiquement et amicalement.

Bien évidemment, je remercie mes deux directeurs de thèse **Dr Abdelhadi Saoudi** et **Dr Renaud Lesourne** pour m'avoir appris l'immunologie, qui était une énigme pour moi au départ en tant que biochimiste. Et oui en arrivant dans ce laboratoire, je ne savais pas ce qu'étaient un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Je vous remercie Renaud et Abdel pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir confié un sujet de thèse qui n'entraînait pas entièrement dans les recherches courantes de l'équipe. Cela m'a permis de tirer des informations de la littérature et à développer des expériences non maîtrisées par l'équipe. C'est avec fierté, moi qui suis très attaché à l'aspect technique de la science, d'avoir obtenu des résultats après de nombreuses réflexions et mises au point de ces techniques.

Deux chefs c'est bien mais c'est encore mieux avec plein de collègues avec qui je m'entends bien et avec qui j'espère garder contact. Anne, Gaétan et Judith vous êtes les premières personnes que j'ai côtoyé au centre et je me souviens quand, au cours de mon M2, l'équipe n'était constituée que de nous quatre (en plus du chef évidemment). **Anne**, je te remercie encore de m'avoir amené au restaurant pour lequel tu as tellement insisté et pour lequel, j'ai fini par manger tout seul tellement le stress de ta thèse te rongeaient. Plus sérieusement, je te remercie de ton aide et des moments de rigolade passés ensemble notamment à discuter de tes aventures avec les souris. **Gaétan**, si j'ai rejoint l'équipe, c'est grâce à toi. Je t'avais envoyé un mail pour savoir si j'avais mes chances au sein de l'équipe. J'ai beaucoup apprécié ta bonne humeur, presque excessive, comme après que tu aies fait implorer tes cellules au PBS 10X ^^ **Judith**, nous ne nous sommes pas beaucoup connus, mais merci de m'avoir appris à faire des préparations pour l'imagerie. A l'époque, je ne m'imaginai même pas que ce que tu m'as appris lors de mon M2 m'aurait autant servi pour la thèse. **Nelly**, tu as rejoint l'équipe au cours de ma thèse. J'aime beaucoup ta bonne humeur et ton exigence remarquablement juste. Il en faut pour faire tourner une équipe et participer à la faire vivre et progresser. Je me souviendrai longtemps des repas à la cantine passés ensemble mais surtout...au retour de mes vacances d'été 2016 lorsque je t'ai posé la question : « Quoi de neuf depuis mon départ ? » et que tu m'as répondu « Il faut que je te dise quelque chose d'important... et bien je suis enceinte ! ». Je me souviens aussi de mon fou rire au bureau lorsque nous avons appris une nouvelle qui ne nous était pas destinée et que tu étais obligée de te retenir... mais tu as craqué ... et tu es sortie du bureau. **Hélène**,

toi aussi tu as rejoint l'équipe au cours de ma thèse. Même si tu n'es pas toujours au labo à cause de tes importantes missions à transmettre ton savoir à l'école vétérinaire, je t'apprécie beaucoup. Je me rappelle encore quand je t'ai réveillé en arrivant au bureau à 7h du matin, quand enfin tu étais parvenue à t'endormir entre deux chaises. Tu m'avais fait peur (je me demandais ce qui se passait dans ce bureau !) et je pense que toi aussi tu as eu peur. J'ai beaucoup apprécié discuter équitation avec toi et agacer les autres, car seuls nous deux pouvions nous comprendre à l'époque !! **Cui**, you are the last student who arrived in the team. You are incredibly funny and thank for the little chinese lessons (I think I can postulate for a job in China now). Sorry also for all your mice I ate (Only Cui can understand). The next time we see each other, I will cook for you an excellent Mice Cake ! cole

**Laurène, Alice, Aurélie, Loïc, Yolla, Delphine**, nos équipes ont fusionné les faisant grandir en un éclair. Je vous remercie pour votre bonne humeur. Loïc, merci pour vos conseils sur mon projet et pour votre optimisme. Merci à la tagueuse de chat, **Delphine**, pour toujours plus de chats dessinés! Laurène, Aurélie et Yolla merci pour les kg en plus, avec les soirées pizzas au labo. **Laurène**, ton départ à Vienne a été difficile. Merci de toute l'aide que tu as pu me fournir. Notamment, quand je devais rédiger la partie sur la synapse immunologique alors que j'avais perdu toute inspiration (Cette partie a été rédigée en dernière, malgré sa position dans la thèse). Puis tu nous as appris aussi plein de mots, ou de phrases de ta propre langue, je pense qu'avec Aurélie, nous parlons maintenant ta langue à la perfection (Aurélie n'a pas fait trop de fautes sur le T-shirt qu'elle a confectionné pour ton départ ?). **Aurélie**, avec tes sorties tu as réveillé mes gènes de « Canaille » qui étaient si silencieux avant...n'est-ce pas ? Tiens par exemple : j'ai beaucoup rigolé notamment pour t'avoir faite souvent marcher (je pense à Skype). Tu n'es pas dans l'équipe depuis longtemps et pourtant j'ai l'impression de te connaître depuis des années tellement nous rigolons et nous nous entendons. Nelly, Aurélie, Laurène, Hélène, Alice et Cui, désolé d'avoir été si insupportable et de vous avoir fatigué avec mes discussions incessantes au bureau alors que vous tentiez de trouver la concentration. Mais, c'est tellement amusant de vous embêter car, il paraît, je cache bien mon jeu et du coup personne hors du bâtiment F ne vous croyait ^^.

Je remercie aussi énormément Virginie, Clémence, Emeline et Arantxa. **Arantxa**, tu es toujours de bonne humeur et je te souhaite bonne continuation dans ton projet de thèse et professionnel. Virginie, Clémence et Emeline, nous nous sommes connus au fur et à mesure au labo mais après un barbecue chez Virginie, je pense que nos rapports ont été davantage consolidés, et je vous remercie pour m'avoir aidé au cours de cette fin de soirée. **Virginie et Clémence** je vous remercie pour toutes les frites englouties les lundis à la cantine (et d'autres jours). Je pense encore à nos randonnées, dont une particulièrement où je payerai

cher pour revoir Clémence la tresse coincée dans une magnifique ronce. Ainsi que de vous voir la flotte jusqu'aux genoux. Et n'oubliez pas « qui aime bien, châtie bien ».

Je n'oublie pas non plus Maryse, Marie, Michèle, Claude et Nadège. Vous êtes la première équipe que j'ai croisée au centre, à l'époque de mon M2 où il n'y avait que deux équipes à l'étage. **Maryse** nous nous sommes rencontrés lors d'un Friday Drink et je t'apprécie beaucoup. J'ai aimé nos repas au restaurant en tête à tête à discuter de tout et n'importe quoi. J'espère que nous aurons l'occasion de nous revoir et de discuter de nos devenirs.

Je pense encore à **Fred et Emilie** pour les déjeuners à discuter de saumon fumé. Je vous remercie vous deux pour votre bonne humeur à longueur de temps.

Fatima ? Non je ne connais pas... Je connais une **Fatima-Ezzahra**, qui gère un plateau de cytométrie et que j'aime beaucoup. Pour se débarrasser de moi au bureau, Nelly, Aurélie, Laurène, Hélène et Cui avaient commandité l'élite de la randonnée : Fatima-Ezzahra pour me semer sur la coulée verte du Touch. Mais comme vous avez pu le constater, Fatima-Ezzahra n'a pas mené à bout sa mission. Peut-être l'avais-je aussi fatigué... dans mon discours ou avec ma marche rapide. Merci Fatima-Ezzahra pour les rigolades au bâtiment F. Il a fallu attendre d'y poser nos valises pour déconner. Merci pour tes recettes, que ce soit des olives mais aussi pour fabriquer une concoction dont j'aurais besoin pour faire une teinture dans quelques années. **Valérie**, merci pour ta patience. Je me pose encore la question si c'est une patience envers moi, ou envers autre chose. Car nous en avons cramé des neurones à réfléchir. Pour autant, l'ImageStream est un très bel instrument, performant et très intéressant à utiliser et je te remercie de l'aide que tu m'as fourni. **Anne-Laure et Paul** merci pour votre bonne humeur et pour vos tris impeccables. Le plateau de cytométrie, n'hésitez surtout pas à me contacter si vous avez besoin d'aide pour porter des bidons pleins. Je verrai ce que je peux faire depuis Marseille.

**Danièle**, merci de m'avoir formé au microscope LSM710, pour toutes les discussions dans les couloirs du bâtiment F. Je te remercie aussi énormément pour l'aide que tu as pu m'apporter et pour avoir présenté les microscopes à nos stagiaires. Je te souhaite de profiter de ta retraite et de tes enfants et petits enfants. **Astrid**, merci pour ta patience pour les acquisitions au spinning disk. J'attendais avec impatience tes « Oh une mitose !!! Y a une mitose », un peu moins les « Je ne vois pas grand-chose mais on va attendre demain ». Les résultats que nous avons générés avec cet appareil ont été en partie décisifs sur la conclusion de mon projet de thèse. **Sophie**, merci de m'avoir permis de faire un petit stage d'une semaine lors de la métrologie des instruments. Cela me conforte sur mon projet professionnel auprès de la technologie en biologie.



Je remercie **Pr Roland Liblau** de m'avoir accueilli dans son unité ainsi que les membres des réunions du mercredi qui ont participé à la progression de mon projet

Je remercie également Florence et Annie pour votre présence et votre sourire tous les jours.

Je tiens à remercier aussi les services communs très agréables et réactifs : Aline, Caroline, Francine, Sandrine, Paula, Philippe, Nicolas, Denis et Nordine. Je remercie également les membres de la zootechnie.

Je souhaite aussi remercier **Dr Sébastien Villéger** à Montpellier, chez qui j'ai réalisé mon premier stage dans le milieu scientifique. Merci pour la pêche aux petites daurades et aux petits mulets. Je te remercie pour ta générosité de m'avoir compté parmi les auteurs de ta publication à venir. Je remercie aussi **Dr Isabelle Néant** avec qui j'ai réalisé mon stage de M1. Je me souviens encore de DREAM, d'ailleurs je lui ai volontairement trouvé une petite place dans mon manuscrit. Et je t'assure que c'était volontaire, pour faire un clin d'œil à ce stage de M1. Enfin je remercie **Dr Manuelle Ducoux-Petit** et **Dr Marie-Pierre Bousquet-Dubouch** pour m'avoir accepté pour un stage facultatif avant le M2 encadré par **Luc**. Au cours de ce stage, avec Luc et peut être aussi avec les cours données par Manue et Marie-Pierre, j'ai trouvé dans la spectrométrie de masse, la technologie de pointe sur laquelle j'aimerais me spécialiser. D'ailleurs, je remercie **Marlène** et **Dr Anne Gonzalez-de-Peredo** pour les échantillons analysés avec rapidité au cours de mon doctorat. Je remercie Anne d'avoir entendu mon souhait professionnel et de m'avoir orienté vers mon post doctorat qui devrait me permettre de réaliser mon projet professionnel.

Bien évidemment, je ne remercierai jamais assez ma famille pour m'avoir accompagné au cours de ces 8 ans d'études et bien avant, et de m'avoir toujours poussé dans mes retranchements pour assurer ma réussite. Je remercie particulièrement mes grands parents qui m'ont hébergé pendant plus de cinq ans au cours de mes études et toujours aidé.

Pour la rédaction de ce manuscrit je remercie Nelly, Virginie, Laurène, Aurélie et Anne-Laure de m'avoir aidé pour la relecture et pour s'être cassé la tête à faire le sommaire. Ma grand-mère était aussi de la partie à tenter de corriger les fautes d'orthographe présentes dans ce manuscrit dont elle ne maîtrise pas le domaine.

Les figures ont été réalisées par mes soins mais les schémas de cellules, de membranes et des récepteurs ont été adaptés de *Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com/>)

Rôles dans les lymphocytes T de la protéine Lis1, un régulateur de la dynamique des microtubules dépendante de la dynéine

## Résumé

Les récepteurs d'antigènes des lymphocytes T (TCR) sont assemblés au cours du développement précoce de ces cellules dans le thymus suite à des recombinaisons complexes de gènes. Le réarrangement d'une chaîne  $\beta$  des TCR fonctionnelle (pré-TCR) déclenche des voies de signalisation intracellulaires qui entraînent la survie, l'expansion et la maturation des thymocytes. Par ailleurs, l'engagement des TCR à la surface des lymphocytes T (LT) matures par des antigènes conduit également à des cycles de prolifération qui permettent le développement de réponses immunitaires efficaces. Ces événements cellulaires s'accompagnent de remaniements importants du réseau de microtubules et une redistribution des moteurs moléculaires, tels que la dynéine, qui véhiculent les structures cellulaires sur ces réseaux. Les mécanismes moléculaires et les conséquences physiologiques de ces remaniements sont peu connus dans les LT. Lis1 est un régulateur de la dynéine qui est mis à contribution dans la migration neuronale et la prolifération des cellules souches au cours du développement neural. Son rôle au sein du tissu lymphoïde est peu connu. Dans ce travail, nous avons utilisé des modèles de souris spécifiquement déficients en Lis1 dans les LT afin d'étudier les fonctions moléculaires, cellulaires et physiologiques de cette protéine dans ces cellules. Nous montrons que Lis1 joue un rôle essentiel dans le développement précoce des LT et dans l'homéostasie des LT matures. La déficience en Lis1 n'affecte pas le réarrangement de la chaîne  $\beta$  ou les événements de signalisation déclenchés par le pré-TCR ou le TCR. Cependant, la prolifération des thymocytes ayant passé la  $\beta$ -sélection ou des LT matures dont le TCR a été engagé, est fortement impactée. L'analyse fine de la mitose indique que la déficience en Lis1 ralentit fortement le processus mitotique, contrarie les remaniements intracellulaires conduisant à la métaphase et entraîne la répartition asymétrique du matériel génétique dans les cellules filles. L'analyse des réseaux de microtubules montre que l'absence de Lis1 entraîne l'amplification du nombre de centrosomes et l'augmentation des cellules multipolaires au cours de la mitose. Enfin, nous montrons que Lis1 favorise l'interaction de la dynéine avec la dynactine, indiquant que Lis1 joue un rôle important dans les LT pour relier la dynéine aux structures cellulaires qu'elle véhicule. En conclusion, nous avons montré que Lis1 est importante dans la distribution du matériel génétique au cours de la prolifération des thymocytes doubles négatifs et des lymphocytes T périphériques.



## Abstract

The T cell receptor (TCR) is assembled during the early development of T lymphocytes in the thymus after complex genetic recombinations. The rearrangement of a functional TCR  $\beta$ -chain (pre-TCR) triggers intracellular signaling pathways that cause the survival, expansion and maturation of thymocytes. The commitment of the TCR to the surface of mature T cells after antigen recognition also leads to proliferation allowing the development of effective immune responses. These cellular events go along with significant reorganization of the microtubule networks and a redistribution of molecular motors, such as dynein, which transport the cellular structures *via* this network. The molecular mechanisms and physiological consequences of the reorganization are poorly understood in T cells. Lis1 is a dynein regulator involved in neuronal migration and stem cells proliferation during neural development. Its role in lymphoid tissue is still unknown. In this study, we used mouse models specifically Lis1-deficient in T cells to study the molecular, cellular and physiological functions of this protein in T cells. We identify that Lis1 plays an essential role in the early development of T cells and in the homeostasis of mature cells. Lis1 deficiency does not affect  $\beta$ -chain rearrangement or signaling events triggered by pre-TCR or TCR, but leads to the blockage of thymocyte cell division that have undergone  $\beta$ -selection or mature T cells stimulated. Fine analysis of mitosis indicates that the deficiency of Lis1 strongly slows down the mitotic process, counteracts the cell changes leading to the metaphase and leads to asymmetric distribution of the genetic material in the daughter cells. Microtubule networks analysis shows that the absence of Lis1 induces centrosomes amplification and increase of multipolar cells during mitosis. Finally, we show that Lis1 promotes the dynein-dynactin interaction, indicating that Lis1 plays an important role in T cells to bind dynein to the cell structures it carries. In conclusion, we here described that Lis1 is important for the distribution of genetic material during double negative thymocyte and peripheral lymphocyte proliferation.



<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>5</b>
<b>AVANT PROPOS</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>11</b>
INTRODUCTION GENERALE.....	13
<i>I. Le récepteur des lymphocytes T<math>\alpha\beta</math></i> .....	13
1. Structure des récepteurs des lymphocytes T $\alpha\beta$ .....	13
1.1. La région transmembranaire .....	14
1.2. Les domaines extracellulaires .....	14
1.3. Les domaines intracellulaires .....	15
2. La recombinaison V(D)J.....	16
2.1. Mécanismes biochimiques de la recombinaison .....	17
2.2. Régulation de la recombinaison .....	19
<i>II. Les corécepteurs CD4 et CD8</i> .....	20
<i>III. Réponse des lymphocytes T suite à la reconnaissance d'un antigène</i> .....	21
1. Signalisation suite à l'engagement des TCR .....	21
1.1. Complexes de signalisation mis en jeu lors de la reconnaissance antigénique .....	22
1.2. Principales voies de signalisation .....	25
1.3. Synapse immunologique .....	27
2. Différenciation des lymphocytes T .....	31
2.1. Différenciation des lymphocytes T auxiliaires .....	31
2.2. Différenciation des lymphocytes T cytotoxiques.....	32
2.3. Différenciation en lymphocytes T mémoires .....	33
CHAPITRE I : LE DEVELOPPEMENT PRECOCE DES LYMPHOCYTES T.....	35
<i>I. La différenciation des précurseurs des lymphocytes T dans la moelle osseuse</i> .....	36
1. Origine des cellules souches hématopoïétiques .....	36
2. Différenciation des CSH vers le lignage lymphocytaire T .....	36
<i>II. Acquisition du lignage T définitif au sein du thymus</i> .....	37
1. Les mécanismes d'entrée au niveau de la jonction cortico-médullaire du thymus .....	37
2. La signalisation NOTCH est essentielle dans l'établissement du lignage T .....	39
<i>III. La <math>\beta</math>-sélection : l'étape initiale dans l'élaboration d'un répertoire T</i> .....	40
1. Expression du pre-TCR .....	40
1.1. Déclenchement de la recombinaison du TCR $\beta$ .....	40
1.2. Expression de la chaîne pT $\alpha$ .....	42
2. Signalisations issues du pre-TCR .....	43
2.1. Déclenchement de la signalisation du pre-TCR .....	44
2.2. Fonctions de la chaîne pT $\alpha$ dans la signalisation .....	44
2.3. Signaux de survie.....	45
2.4. Induction de la prolifération cellulaire .....	46
2.5. Exclusion allélique .....	47
<i>IV. Transition vers le stade double positif</i> .....	48
1. Expression des corécepteurs CD4 et CD8 .....	48
2. Déclenchement de la recombinaison de la chaîne $\alpha$ du TCR .....	48
3. Du pré-TCR au TCR.....	49
CHAPITRE II : LE DEVELOPPEMENT TARDIF DES LYMPHOCYTES T .....	51
<i>I. Les sélections clonales au sein du cortex thymique</i> .....	52
1. Présentation de peptides par les cTEC.....	52
2. Signaux de survie induits par la sélection positive.....	53
3. Transition des stades DP à SP .....	53
3.1. Choix du lignage CD4 et CD8 .....	54
3.2. Acteurs mis en jeu dans la différenciation en CD4 ou CD8 SP.....	55
<i>II. La sélection négative au sein de la médulla</i> .....	56
1. Expression des TRA (tissue-restricted antigens) .....	57
2. Régulation de la survie cellulaire par la force du signal .....	58
<i>III. THEMIS, une protéine importante dans les mécanismes de sélection</i> .....	59

1.	Rôles physiologiques de THEMIS dans les lymphocytes T .....	60
2.	Fonctions de THEMIS dans la signalisation des TCR.....	62
2.1.	THEMIS est un régulateur négatif de la signalisation .....	62
2.2.	THEMIS est un régulateur positif de la signalisation .....	63
3.	Régulation de THEMIS .....	64
3.1.	Régulation de son expression.....	64
3.2.	Régulation de son activité et de sa localisation.....	65
CHAPITRE III : LIS1, UNE MOLECULE INDISPENSABLE DANS LA VIE CELLULAIRE .....		67
I.	<i>Effets physiologiques associés à la perte ou au gain d'expression de Lis1</i> .....	67
1.	Conséquences neurologiques .....	68
2.	Développement tumoral.....	69
3.	Conséquences immunitaires de la perte d'expression de Lis1 .....	70
II.	<i>Fonctions moléculaires</i> .....	70
1.	Régulation du complexe PFAH-1B .....	71
1.1.	Le complexe PFAH-1B .....	71
1.2.	Rôle de Lis1 dans la fonction enzymatique de PFAH-1B .....	72
2.	Régulation de la Dynéine .....	73
2.1.	Généralités sur dynéine .....	73
2.2.	Régulation de l'activité motrice .....	76
III.	<i>Fonctions cellulaires</i> .....	80
1.	Lis1 dans la migration cellulaire.....	80
1.1.	Recrutement et polymérisation d'actine corticale.....	81
1.2.	Adhérence des cellules et adhérence focale .....	81
1.3.	Mouvement d'organites au cours de la migration .....	82
2.	Régulation de la division cellulaire.....	83
2.1.	Fonctions de Lis1 au cours de la phase G2 du cycle cellulaire.....	85
2.2.	Fonctions de Lis1 dans le déroulement de la mitose .....	85
3.	Transport d'organelles.....	86
4.	Transport et recyclage des molécules.....	87
4.1.	Transport d'ARNm.....	87
4.2.	Transport de protéines.....	87
5.	Lis1 au sein dans la signalisation cellulaire .....	87
IV.	<i>Régulation de Lis1</i> .....	88
1.	Régulation d'expression génique.....	88
2.	Régulation post-transcriptionnelle .....	88
3.	Modifications post-traductionnelles.....	89
3.1.	Phosphorylation .....	89
3.2.	Sumoylation et ubiquitination.....	89
4.	Régulation spatiale et de sa stabilité .....	90
4.1.	Stabilité fonctionnelle .....	90
4.2.	Stabilité structurale .....	90
4.3.	Régulation spatiale.....	91
V.	<i>Lis1 dans le système immunitaire</i> .....	92
1.	Fonctions de Lis1 dans les lignées hématopoïétiques .....	92
2.	Rôles de Lis1 dans la fonction des lymphocytes B .....	92
3.	Rôles de Lis1 dans la fonction des lymphocytes T .....	93
OBJECTIFS DE LA THESE.....		95
<b>RESULTATS .....</b>		<b>97</b>
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>143</b>
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>159</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>161</b>
<b>PORTFOLIO .....</b>		<b>213</b>
<b>REFERENCES .....</b>		<b>215</b>

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Représentation d'un récepteur des lymphocytes T .....	16
<b>Figure 2</b> : Représentation des gènes $\alpha$ et $\beta$ ainsi que des chaînes $\alpha$ et $\beta$ du TCR issues de la recombinaison V(D)J .....	17
<b>Figure 3</b> : Schématisation d'une recombinaison VJ .....	18
<b>Figure 4</b> : Représentation des corécepteurs CD8 et CD4 complexés au CMH-I et CMH-II respectivement.....	21
<b>Figure 5</b> : Représentation de la signalisation précoce suite à l'engagement du TCR .....	22
<b>Figure 6</b> : Recrutement des complexes de signalisation à LAT .....	25
<b>Figure 7</b> : Schématisation de la synapse immunologique .....	30
<b>Figure 8</b> : Différenciation des lymphocytes T auxiliaires.....	33
<b>Figure 9</b> : Différenciation des cellules souches hématopoïétiques en lymphocytes T .....	38
<b>Figure 10</b> : Principales inductions médiées par la signalisation NOTCH.....	42
<b>Figure 11</b> : Représentation d'un récepteur pre-TCR.....	43
<b>Figure 12</b> : Représentation de la $\beta$ -sélection.....	47
<b>Figure 13</b> : Sélection positive et négative des thymocytes .....	51
<b>Figure 14</b> : Différenciation des cellules doubles positives en simples positives CD4 ou CD8.....	56
<b>Figure 15</b> : Migration des cellules et évènements de sélection au sein du thymus	57
<b>Figure 16</b> : Représentation de la protéine THEMIS1 .....	60
<b>Figure 17</b> : Modèle de la régulation positive de la signalisation.....	64
<b>Figure 18</b> : Lis1 dans la lissencéphalie.....	69
<b>Figure 19</b> : Structure de Lis1 .....	71
<b>Figure 20</b> : Représentation de Lis1 au sein du complexe PAFAH-1B.....	73
<b>Figure 21</b> : Représentation de la dynéine .....	74
<b>Figure 22</b> : La dynéine interagit avec la dynactine qui recrute des adaptateurs spécifiques.....	76
<b>Figure 23</b> : Lis1 initie le déplacement de la dynéine .....	77
<b>Figure 24</b> : Lis1 stabilise la dynéine aux extrémités positives des microtubules.....	78
<b>Figure 25</b> : Lis1 facilite le transport de chargements de taille importante.....	79
<b>Figure 26</b> : L'état nucléotidique de AAA3 régule l'activité de Lis1 vis-à-vis de la dynéine.....	80
<b>Figure 27</b> : Déroulement du cycle cellulaire.....	84
<b>Figure 28</b> : Schéma de conclusion décrivant les conséquences de la perte de Lis1 sur le développement des LT .....	144
<b>Figure 29</b> : Fonctions de Lis1 au cours de la prolifération des thymocytes et des LT .....	155
<b>Figure 30</b> : Fonctions hypothétiques des interactions dynéine/Lis1 et THEMIS1/Lis1 dans les thymocytes et LT .....	158





# LISTE DES ABREVIATIONS

ADAP : Adhesion and Degranulation promoting Adapter Protein  
AGM : Aorta-Gonad-Mesonephros  
AIRE : Auto-Immune REgulator  
AKT : Serine-Threonine Kinase 1  
APC : Adenomatous Polyposis Coli  
APC/C : Anaphase-Promoting Complex  
AP-1 : Activator Protein 1  
ATP : Adenosine TriPhosphate  
Bad : Bcl-2-associated death promoter  
BCL-2 : B-cell lymphoma 2  
BCL-6 : B-cell lymphoma 6  
BCR : B Cell Receptor  
Bid : BH3 Interacting Domain Death Agonist  
Bim : Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death  
BRAP : BRCA1-associated protein  
C(X)CL : C-(X)-C motif Ligand  
CARMA1 : CARD-containing MAGUK protein 1  
CBM : Carma1-Bcl10-Malt1 complexe  
c-CBL : Casitas B-lineage Lymphoma  
CD : Cluster of Differentiation  
CDC42 : Cell Division Dontrol protein 42  
CDK2 : Cyclin-Dependent Kinase 2  
CDR : Complementarity Determining Regions  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CMP : Cellule Myéloïde Progénitrice  
CMS : p130Cas ligand with multiple SH3 domains  
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène  
CSH: Cellule Souche Hématopoïétique  
cSMAC : central Supramolecular Activation Cluster  
cTEC : Cellule épithéliale thymique corticale  
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4  
C(X)CR : C-(X)-C motif Receptor  
DAG : DiAcylGlycerol  
DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns  
DLL : DeLta-Like  
DN : Double Negatif  
DNA-PK : DNA-dependent protein kinase  
DP : Double Positif  
DREAM : Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator  
dSMAC : central Supramolecular Activation Cluster  
E2A : Transcription Factor E2-Alpha  
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase  
ERM : Ezrin/Radixin/Moesin  
ETP : Early T-cell Precursor  
Fezf2 : FEZ Family Zinc Finger 2  
FLT-3 : Fms Related Tyrosine Kinase 3  
FoxO : Forkhead box O  
FoxP3 : Forkhead box P3  
GADS : Grb2-related Adaptor Downstream of Shc

GATA3 : GATA Binding Protein 3  
GDP : Guanosine DiPhosphate  
Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2  
GTP : Guanosine TriPhosphate  
HEB : helix-loop-helix protein related to E2A  
ICAM1 : InterCellular Adhesion Molecule 1  
Id3 : Inhibitor Of DNA Binding 3  
IFN $\gamma$  : Interféron  $\gamma$   
Ig : Immunoglobulin  
IKK : I $\kappa$ B kinase  
IL : Interleukine  
IP3 : Inositol triphosphate  
IQGAP1 : Ras GTPase-activating-like protein  
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
ITK : Interleukin-2-Inducible T-Cell Kinase  
JAK3 : JAnus Kinase 3  
KSR : Kinase Suppressor of Ras  
KU70/80 : ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU70/80  
LAT : Linker For Activation Of T Cells  
LB : Lymphocyte B  
LCK : Lymphocyte Cell-Specific Protein-Tyrosine Kinase  
LFA1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1  
Lis1 : Lissencephaly-1  
LMPP : Lymphocyte-primed MultiPotent Progenitors  
LT : Lymphocyte T  
MAIT : Mucosal-Associated Invariant T cells  
MALT1 : Mucosa-Associated lymphoid tissue Lymphoma Translocation protein 1  
MAML1 : Mastermind-like protein 1  
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase  
MAZR : Myc-Associated Zinc-Finger  
MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase  
MTBD : MicroTubule Binding Domain  
mTEC : Cellule épithéliale thymique médullaire  
NCK : Non-Catalytic Region Of Tyrosine Kinase  
NCor1 : Nuclear receptor Co-repressor 1  
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells  
NICD : Notch IntraCellular Domain  
NKT : Natural Killer T cells  
NF $\kappa$ B : Nuclear Factor-kappa B  
Nud : Nuclear Distribution  
OVA : Ovalbumin peptid  
PAF : Platelet Activating factor  
PAFAH : PAF AcetylHydrolase  
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern  
pCMH : complexe CMH-peptide  
PD-1 : Programmed cell Death 1  
PDK1 : Phosphoinositide-dependent kinase-1  
PH : Pleckstrin Homology  
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate  
PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate  
PKC $\theta$  : Protein Kinase C  $\theta$   
PLC- $\gamma$ 1 : Phospho Lipase C  $\gamma$ 1

PLK1 : Polo Like Kinase 1  
 PLK4 : Polo Like Kinase 4  
 PRR : Proline Rich Region ou Pattern recognition receptors  
 PSGL1 : P-selectin glycoprotein ligand-1  
 pSMAC : peripheral Supramolecular Activation Cluster  
 pT $\alpha$  : Chaîne invariante pre TCR  $\alpha$   
 PU.1 : Hematopoietic Transcription Factor PU.1  
 Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
 RAG : Recombination-Activating Genes  
 RAP1 : RAs-Proximate-1  
 RapL : Ras-proximate-1 binding protein  
 RasGRP1 : Ras Guanyl-Releasing Protein 1  
 RBPJ : Recombining Binding Protein suppressor of hairless  
 RhoA : Ras homolog gene family, member A  
 ROR $\gamma$ T : RAR-Related Orphan Receptor  $\gamma$   
 RSS : Recombination Signal Sequences  
 RUNX : RUNT-related transcription factor 1  
 SAS-6 : Spindle assembly abnormal protein 6 homolog  
 SHP : Src Homology region 2 domain-containing phosphatase  
 SKAP55 : Src kinase-associated phosphoprotein 55  
 SLP-76 : SH2 Domain-Containing Leukocyte Protein Of 76 KDa  
 SNP : Single-Nucleotide Polymorphism  
 SOCS : Suppressor Of Cytokine Signaling  
 SOS : Son of Sevenless  
 SP : Simple Positif  
 STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription  
 STIL : Centriolar Assembly Protein  
 STIM : Stromal interaction molecule  
 SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable  
 SYK : Spleen Associated tyrosine Kinase  
 TCR : T Cell Receptor  
 TH : T Helper  
 THEMIS : Thymocyte-Expressed Molecule Involved In Selection  
 ThPOK : Th Inducing POZ-Kruppel Factor  
 TOX : Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box  
 TRA : Tissue-Restricted Antigens  
 TRAF6 : TNF Receptor Associated Factor 6  
 T<sub>reg</sub> : Lymphocyte T régulateur  
 TSP : Thymic Setting Progenitor  
 TSSP : Thymus-Specific Serine Protease  
 VAMP-7 : Vesicle-Associated Membrane Protein 7  
 VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1  
 WASP : Wiskott–Aldrich Syndrome Protein  
 WAVE : WASP-family verprolin-homologous protein  
 XCCR4 : X-Ray Repair Cross Complementing 4  
 ZAP-70 : Zeta Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70



# AVANT PROPOS

L'introduction d'un élément étranger au sein de l'organisme et la transformation des cellules en cellules tumorales mobilisent des mécanismes de reconnaissance mis en jeu par le système immunitaire. Deux types de système immunitaire se distinguent selon le type de mécanisme de reconnaissance mobilisé : le système immunitaire inné entraînant une action rapide mais peu spécifique des pathogènes et le système immunitaire adaptatif entraînant une réponse plus lente mais dotée d'une mémoire très spécifique des pathogènes.

Les cellules de l'immunité innée telles que les cellules dendritiques, les basophiles, éosinophiles et macrophages expriment à leur surface des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires PRR (Pattern Recognition Receptor). Ces récepteurs sont capables de reconnaître des molécules spécifiquement exprimées par des pathogènes appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) mais aussi des molécules DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) exprimées dans l'organisme hôte par les cellules affectées lors d'inflammations. La reconnaissance de PAMP, peut conduire à l'endocytose du pathogène qui est dégradé au sein de la cellule, et/ou à la libération de médiateurs inflammatoires qui facilitent la mise en place d'une première ligne de défense. Les peptides issus de la dégradation des pathogènes sont apprêtés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui, une fois exprimé à la surface des cellules, peut être reconnu par les récepteurs des lymphocytes T (TCR), des cellules essentielles du système immunitaire adaptatif. La reconnaissance très spécifique de ces peptides (antigènes) par les TCR conduit à l'activation, à la prolifération et à la différenciation des lymphocytes T en sous-populations effectrices ayant des fonctions spécialisées. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent se différencier en différents sous-types de cellules qui orchestrent les réponses immunitaires selon le type d'agent infectieux ou d'élément pathogène. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exercent une activité cytotoxique sur les cellules infectées ou cancéreuses. Les cellules de l'organisme dégradent constamment leurs protéines et apprêtent au CMH des peptides qualifiés du « soi » qui sont reconnus par les lymphocytes T mais n'entraînent pas de réponse immunitaire. Dans le cas de cellules transformées, l'apprêtement se fait parfois avec des peptides issus de mutations géniques appelés néo-antigènes pouvant être reconnus par les récepteurs des lymphocytes T. Cette reconnaissance entraîne une réponse immunitaire contre ces cellules anormales.

Contrairement aux lymphocytes T, les lymphocytes B ne reconnaissent pas les peptides présentés par les molécules du CMH, mais reconnaissent directement des protéines issues des pathogènes *via* un récepteur d'antigène exprimé à leur surface appelé BCR (B Cell Receptor). La reconnaissance d'antigènes spécifiques par les lymphocytes B entraîne leur activation et leur différenciation en plasmocytes capables de produire des anticorps spécifiques des agents infectieux contribuant à leur élimination.

Les lymphocytes se développent initialement au sein de la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Alors que les précurseurs des lymphocytes T migrent vers le thymus pour continuer leur développement, les précurseurs des lymphocytes B poursuivent leur maturation dans la moelle osseuse. Après leur développement, les lymphocytes migrent vers les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions lymphatiques où ils sont susceptibles d'être activés, de proliférer et de se différencier après la reconnaissance d'un antigène.

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé aux mécanismes qui gouvernent le développement des lymphocytes T dans le thymus et leur homéostasie dans les organes lymphoïdes périphériques. J'ai mis en évidence des rôles essentiels de Lis1, un régulateur du moteur moléculaire dynéine associé aux microtubules, au cours de la prolifération des lymphocytes T lors de ces processus.

# **INTRODUCTION**





## INTRODUCTION GENERALE

Il existe deux types de lymphocytes T (LT) : les LT non conventionnels regroupant les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$ , NKT et MAIT et les LT dits conventionnels ou lymphocytes  $T_{\alpha\beta}$ . Les LT non conventionnels représentent 2 à 10% des LT circulants (1, 2). Leur activation ne nécessite pas forcément la reconnaissance d'un peptide antigénique. Comme les cellules de l'immunité innée, la reconnaissance directe d'un pathogène ou de ces molécules peut suffire à activer ces cellules. Les lymphocytes  $T_{\alpha\beta}$  représentent la majorité des LT circulants au sein de l'organisme. Ils regroupent les LT auxiliaires exprimant le corécepteur CD4 et les LT cytotoxiques exprimant le corécepteur CD8. Les LT  $CD4^+$  déclenchent, orientent et régulent la réponse immunitaire alors que les LT  $CD8^+$  exercent des effets cytotoxiques qui entraînent l'apoptose des cellules infectées ou transformées. Nous nous concentrerons dans la suite de cette thèse aux lymphocytes  $T_{\alpha\beta}$ .

### I. Le récepteur des lymphocytes $T_{\alpha\beta}$

Les lymphocytes  $T_{\alpha\beta}$  se caractérisent par l'expression d'un récepteur des lymphocytes T (TCR) composé des chaînes  $TCR\alpha$  et  $TCR\beta$  ainsi que par l'expression des corécepteurs CD4 ou CD8. Chaque LT exprime un TCR spécifique ayant une affinité particulière pour un antigène donné. La synthèse et l'assemblage des TCR se déroulent au sein du thymus lors du développement des LT et fait suite à des réarrangements complexes de gènes. La reconnaissance d'un antigène par les LT matures, peut conduire à l'amplification des LT spécifiques par expansion clonale mais aussi à leur différenciation en sous populations effectrices ayant des fonctions spécifiques.

#### 1. Structure des récepteurs des lymphocytes $T_{\alpha\beta}$

Le TCR est un complexe multiprotéique constitué des chaînes variables  $TCR\alpha$  et  $TCR\beta$ , responsables de la reconnaissance antigénique, et de trois dimères invariants,  $CD3\gamma\epsilon$ ,  $CD3\delta\epsilon$  et les chaînes  $\zeta\zeta$ . Lors de son expression au sein du réticulum endoplasmique, la chaîne  $TCR\alpha$  s'associe avec le dimère  $CD3\delta\epsilon$  alors que la chaîne  $TCR\beta$  s'associe au dimère  $CD3\gamma\epsilon$  (3). Le dimère  $\zeta\zeta$  serait essentiel à l'association du complexe  $TCR\alpha/CD3\delta\epsilon$  au complexe  $TCR\beta/CD3\gamma\epsilon$  et à sa stabilité pour sa progression vers la membrane plasmique (4) (5) (Fig.1)

### 1.1. La région transmembranaire

Toutes les sous unités du TCR sont constituées d'une région transmembranaire en hélice  $\alpha$  hydrophobe permettant leur interaction aux lipides de la membrane plasmique. Étonnamment, cette région transmembranaire contient des résidus chargés conservés, incompatibles avec un environnement hydrophobe mais impliqués dans le maintien du complexe  $\text{TCR}_{\alpha\beta}/\text{CD3}_{\delta\varepsilon}/\text{CD3}_{\varepsilon\gamma}/\zeta\zeta$ . En effet, les résidus acides, l'acide glutamique de la chaîne  $\text{CD3}_{\gamma}$  et les acides aspartiques des chaînes  $\text{CD3}_{\varepsilon}$  et  $\text{CD3}_{\delta}$  établissent des interactions ioniques avec les résidus basiques lysines et arginines des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (6, 7). Ces résidus, en plus de maintenir assemblé le complexe TCR, sont essentiels à son expression stable à la membrane plasmique (8, 9).

### 1.2. Les domaines extracellulaires

Les caractéristiques des domaines transmembranaires des sous unités CD3 et des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR sont similaires, mais celles des domaines extracellulaires sont bien différentes.

Les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  présentent chacune une région constante et une région variable à l'extrémité N-terminale présentant, une fois assemblée, une affinité pour un antigène donné. Les deux chaînes sont reliées entre elles par un pont disulfure au niveau de leur région constante. Les cystéines établissant cette liaison ne semblent pas indispensables dans l'expression et la stabilité du TCR. En effet, la mutation de ces cystéines ne conduit pas à un défaut d'expression de TCR à la membrane plasmique (10). La résolution de structure par cristallographie au rayon X révèle une structure globulaire à feuillets  $\beta$  des régions variables et constantes (11). Les boucles au niveau des régions variables représentent des régions hypervariables appelées CDR qui sont au nombre de trois par chaîne. Les CDR1 et CDR2 se trouvent en périphérie du site de reconnaissance du peptide antigénique et interagissent avec les hélices  $\alpha$  des CMH à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les CDR3 se localisent au niveau du site d'interaction du TCR avec les peptides antigéniques présentés par les CMH (12).

Les chaînes CD3 et la chaîne  $\zeta$  ont une région extracellulaire n'ayant pas de contact avec les complexes CMH-peptides (pCMH). Les chaînes  $\varepsilon$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  ont un domaine extracellulaire formant une structure globulaire contenant des feuillets  $\beta$ . La chaîne  $\zeta$  ne comporte que 9 résidus d'acides aminés. Les domaines extracellulaires des chaînes  $\varepsilon$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  interagissent

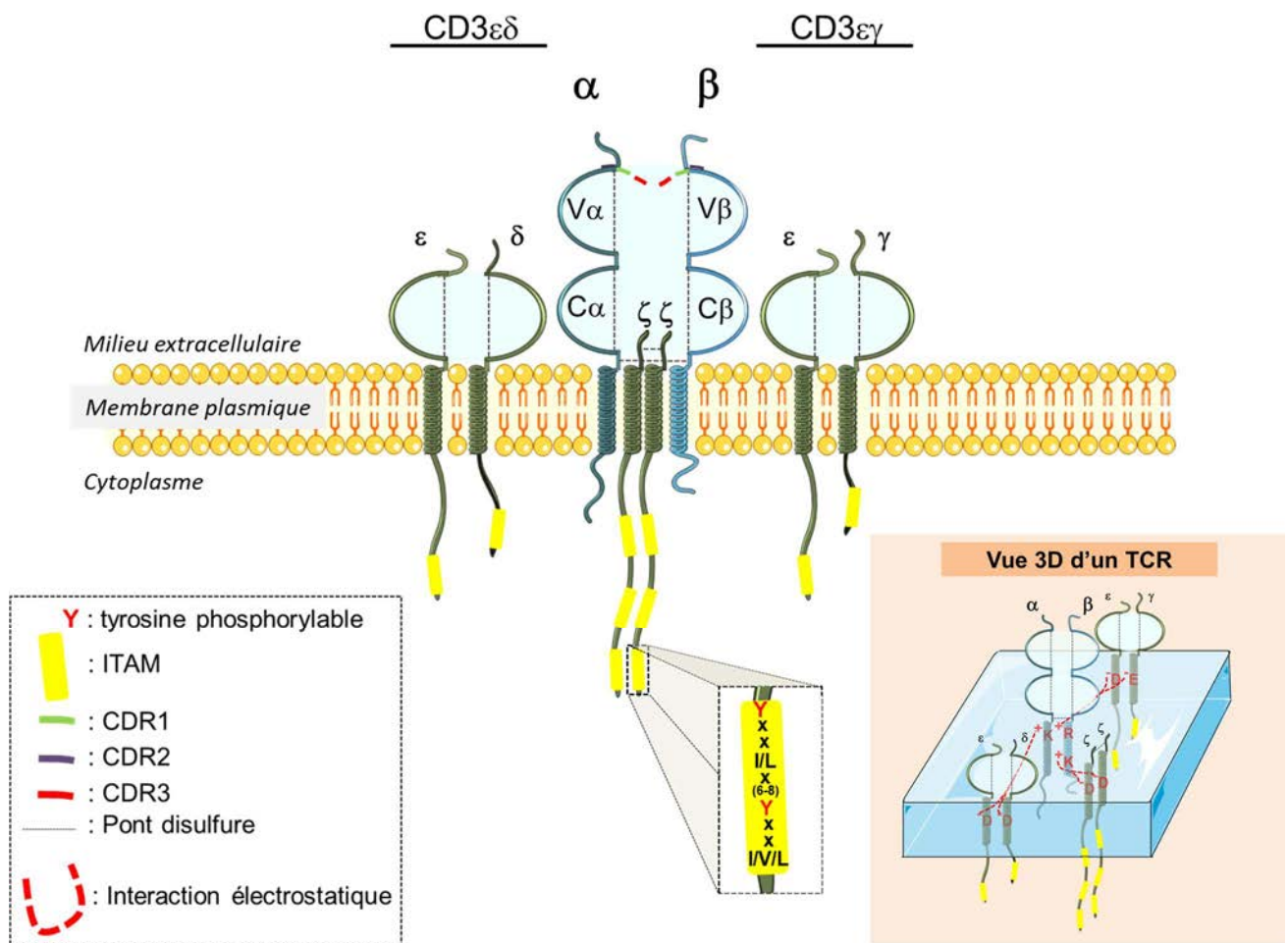
avec les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (13). Des cystéines réalisent des ponts disulfures entre les deux chaînes  $\zeta$  ce qui n'est pas le cas pour les dimères  $CD3\delta\varepsilon$  et  $CD3\gamma\varepsilon$ . La mutation de la cystéine de la chaîne extracellulaire  $\zeta$ , conduit au défaut d'expression des TCR à la membrane plasmique (14, 15). De plus, le remplacement de la région extracellulaire de la chaîne  $CD3\gamma$  par la région extracellulaire de la chaîne  $CD3\delta$  affecte l'expression à la surface cellulaire du TCR (13). Ces résultats démontrent l'importance des domaines extracellulaires des chaînes  $CD3\gamma$  et  $CD3\zeta$  dans l'adressage du TCR à la membrane plasmique.

### 1.3. Les domaines intracellulaires

Tout comme pour les domaines extracellulaires, les domaines intracellulaires des différentes chaînes constituant le TCR ont des caractéristiques spécifiques.

Les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  contiennent une petite région intracellulaire correspondant aux extrémités C-terminales des protéines dont la fonction n'a pas été fortement étudiée. Il semblerait cependant, que la petite région intracellulaire de la chaîne  $\alpha$  soit impliquée dans la régulation de l'expression du TCR, suite à la stimulation, en favorisant sa dégradation (16).

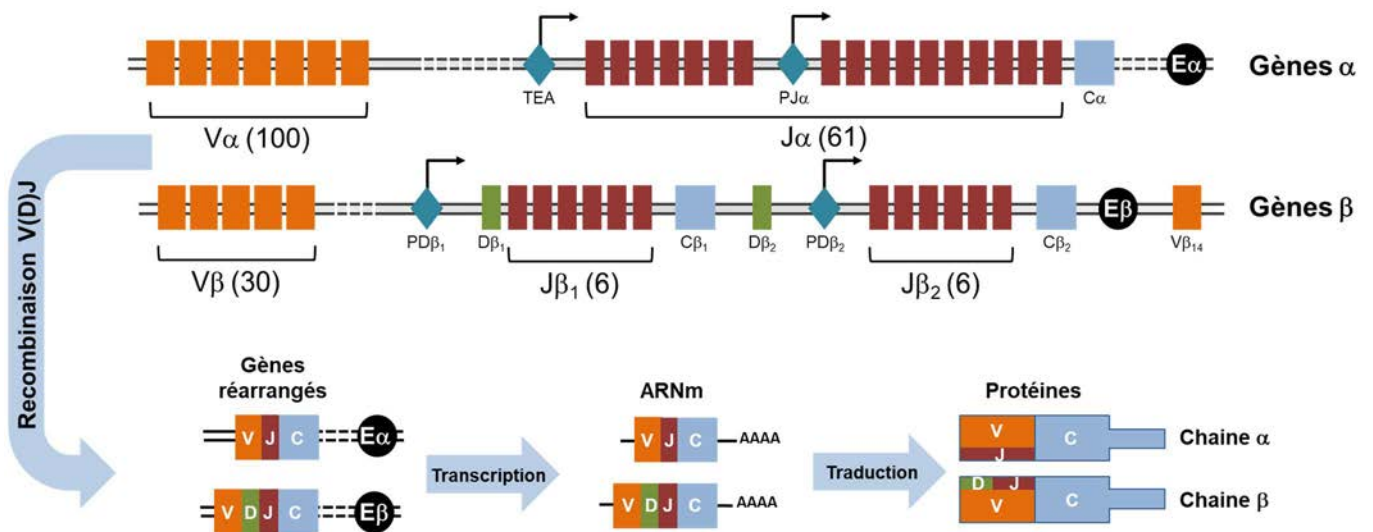
Les chaînes  $CD3$  et  $\zeta$  se caractérisent par la présence de motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) dans leur région intracellulaire (17). Ces motifs contiennent des résidus tyrosines qui peuvent être phosphorylés suite à l'engagement du TCR et qui sont indispensables à la transmission de la signalisation (18-20). Les  $CD3\gamma$ ,  $\delta$  et  $\varepsilon$  possèdent un seul ITAM alors que le long domaine intracellulaire des chaînes  $\zeta$  en comporte trois, totalisant ainsi un nombre de 10 ITAM par TCR. La séquence consensus d'un ITAM est  $YxxI/Lx(6-8)YxxI/V/L$  où X représente un acide aminé divers. Il existe donc une certaine diversité entre les ITAMs portés par les sous-unités de signalisation. Cette diversité semble être importante dans le développement des LT, l'activation des cellules et l'expression du TCR (21). Les résidus leucines et isoleucines des ITAMs ne sont pas phosphorylables suite à l'engagement des TCR mais ils sont néanmoins nécessaires à la transmission de signaux efficaces (22).



## 2. La recombinaison V(D)J

L'immunité adaptative repose sur des récepteurs, hautement spécifiques de peptides ou de protéines issus de pathogènes, qui sont exprimés à la surface des LT et des lymphocytes B (LB). Chaque TCR et récepteur des lymphocytes B (BCR) présentent des affinités différentes formant ainsi un répertoire de LT et de LB. L'expression du TCR et du BCR repose sur des

recombinaisons complexes d'un grand nombre de gènes appelés gènes V (Variable), D (Diversité) et J (Jonction). Le complexe RAG (Recombination-Activating Genes), constitué des protéines RAG1 et RAG2, est spécifique de la recombinaison V(D)J et est exprimé spécifiquement par les LT et LB. La déficience en RAG1 conduit à un défaut majeur du développement des lymphocytes, avec un blocage des cellules au cours des stades précoces du développement (23). Par la suite, je discuterai plus particulièrement des principes de recombinaison s'effectuant au cours du développement des LT (Fig. 2).



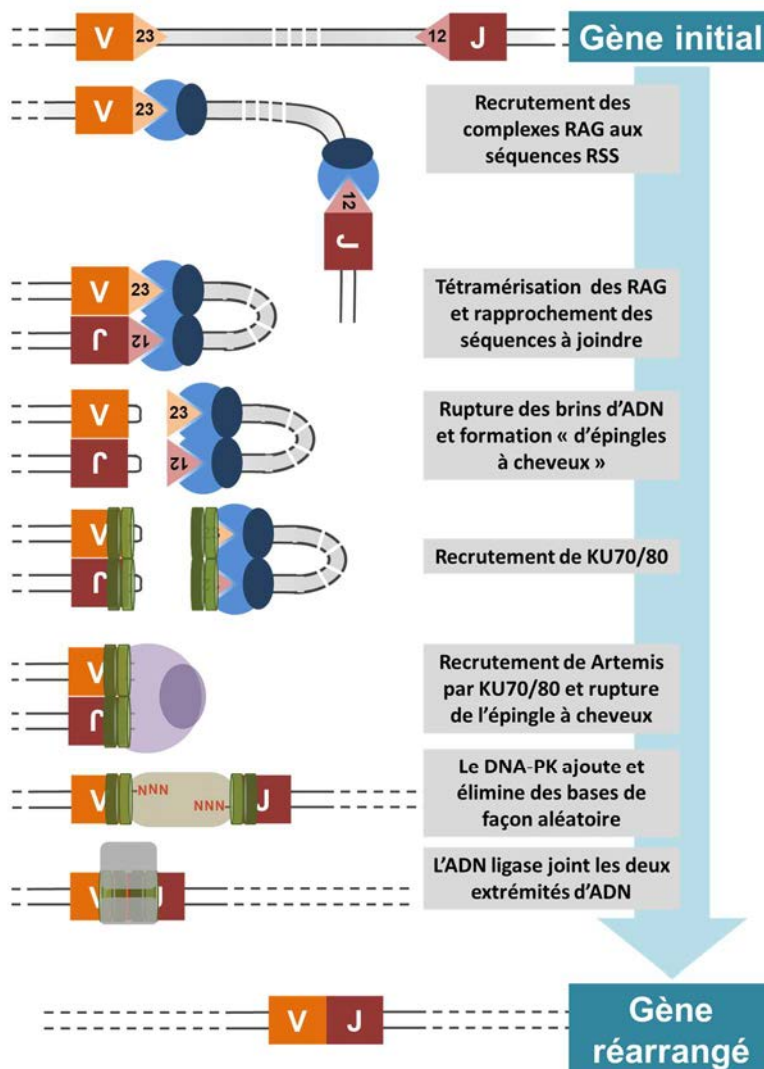
**Figure 2 :** Représentation des gènes  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR issues de la recombinaison V(D)J

Les gènes  $\alpha$  et  $\beta$  sont constitués d'un ensemble de gènes codant la région Variable (V), Diversité (D), Jonction (J) et constante (C) de la chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$ . Après recombinaison par le complexe RAG, un segment de gène par gène V,(D),J et C seront assemblés pour être exprimés en chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$ . Entre parenthèses est indiqué le nombre de segments de gènes dans chaque gène V et J. Adapté de *Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination* de Shatz et Ji 2011

## 2.1. Mécanismes biochimiques de la recombinaison

La recombinaison V(D)J repose sur l'activité du complexe RAG mais aussi d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Les séquences RSS (Recombination Signal Sequences), bordant les gènes V, D et J, sont essentielles à la recombinaison car elles permettent le recrutement du complexe RAG. Ces séquences sont palindromiques et contiennent une séquence d'espacement de 12 ou 23pb. La recombinaison préférentielle s'effectue entre deux séquences RSS constituées de séquences d'espacement de 12 et 23pb. Les complexes RAG situés sur chaque séquence RSS se tétramérisent conduisant

aux rapprochements des deux séquences de gènes à fusionner et procèdent au clivage du double brin d'ADN entre la séquence RSS et le gène d'intérêt. Ce clivage entraîne l'apparition d'un groupement hydroxyle effectuant une attaque nucléophile sur le groupement phosphodiester du brin opposé générant ainsi une structure en épingle à cheveux. KU70 et KU80 sont recrutées aux extrémités issues du clivage par le complexe RAG, favorisant le recrutement d'Artemis pour rompre l'épingle à cheveux des deux extrémités à assembler. L'activité d'Artemis n'étant pas spécifique, la rupture est aléatoire et peut générer soit des extrémités franches ou cohésives. La terminale transférase DNA - PK procède à l'ajout aléatoire ou à l'élimination de bases azotées afin de permettre à l'ADN Ligase XRCC4 de joindre les deux fragments de gènes. L'ensemble de ces événements contribuent à la diversité du répertoire de TCR et de BCR (24) (Fig. 3).



**Figure 3 :** Schématisation d'une recombinaison VJ

Représentation de la recombinaison entre un fragment de gène variable avec un fragment de gène Jonction. Le gène réarrangé est constitué de la prochaine région variable et jonction d'une chaîne de TCR. Adapté de *Janeway*

## 2.2. Régulation de la recombinaison

L'expression des sous unités du complexe RAG semble être un évènement essentiel dans la régulation de la recombinaison ainsi que l'accessibilité des gènes dans la chromatine. Par ailleurs, des séquences activatrices ou enhancer  $E\alpha$  et  $E\beta$  favorisent la recombinaison des gènes. Ces séquences sont capables de recruter des acteurs de la recombinaison et peuvent aussi être soumis à des processus de régulation qui modulent les évènements de recombinaison (25-27).

Expression de la machinerie de recombinaison : L'expression des RAG est séquentielle lors du développement des LT. En effet, elle s'effectue lors des stades précoces du développement pour la recombinaison de la chaîne  $\beta$ , puis s'interrompt pour reprendre lors des stades plus tardifs, pour la recombinaison de la chaîne  $\alpha$ . L'expression des RAG est interrompue à nouveau après cette dernière recombinaison (28). La signalisation régule l'expression de RAG au sein des LT. En effet, la délétion de l'adaptateur moléculaire LAT (Linker For Activation Of T Cells) dans la lignée cellulaire Jurkat contribue à une augmentation de l'expression de RAG. De plus, l'inhibition d'acteurs des voies de signalisation dans le même modèle, ou dans des modèles murins, conduit aussi à cette augmentation en comparaison à des cellules stimulées sans inhibiteur (29, 30).

L'expression de RAG peut aussi être directement régulée par des modifications post-traductionnelles. En effet, l'expression de RAG étant restreinte au stade G1 du cycle cellulaire, des mécanismes de régulation sont mis en place au cours du cycle cellulaire. La phosphorylation de RAG2 sur la thréonine T<sup>490</sup> par le complexe cyclinA/CDK2 entraîne l'adressage au protéasome de RAG2 durant la phase G2 du cycle cellulaire. La prolifération induite par la  $\beta$ -sélection peut donc favoriser la dégradation du complexe RAG (31).

Accessibilité aux gènes : La recombinaison des gènes se fait d'abord sur un des deux allèles. Si la recombinaison entraîne le réarrangement d'une chaîne fonctionnelle, des voies de signalisation conduisent à l'exclusion allélique des gènes codant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Cette exclusion allélique coupe l'accès des gènes au complexe RAG sur cet allèle afin d'empêcher l'expression à la surface de plusieurs TCR ayant des spécificités distinctes. Cette exclusion allélique est due à des modifications post-traductionnelles des histones bloquant la fixation des protéines RAG sur les séquences RSS des gènes codant pour la chaîne  $\beta$ . Le recrutement de RAG au niveau des gènes à réarranger est fortement dépendant de la



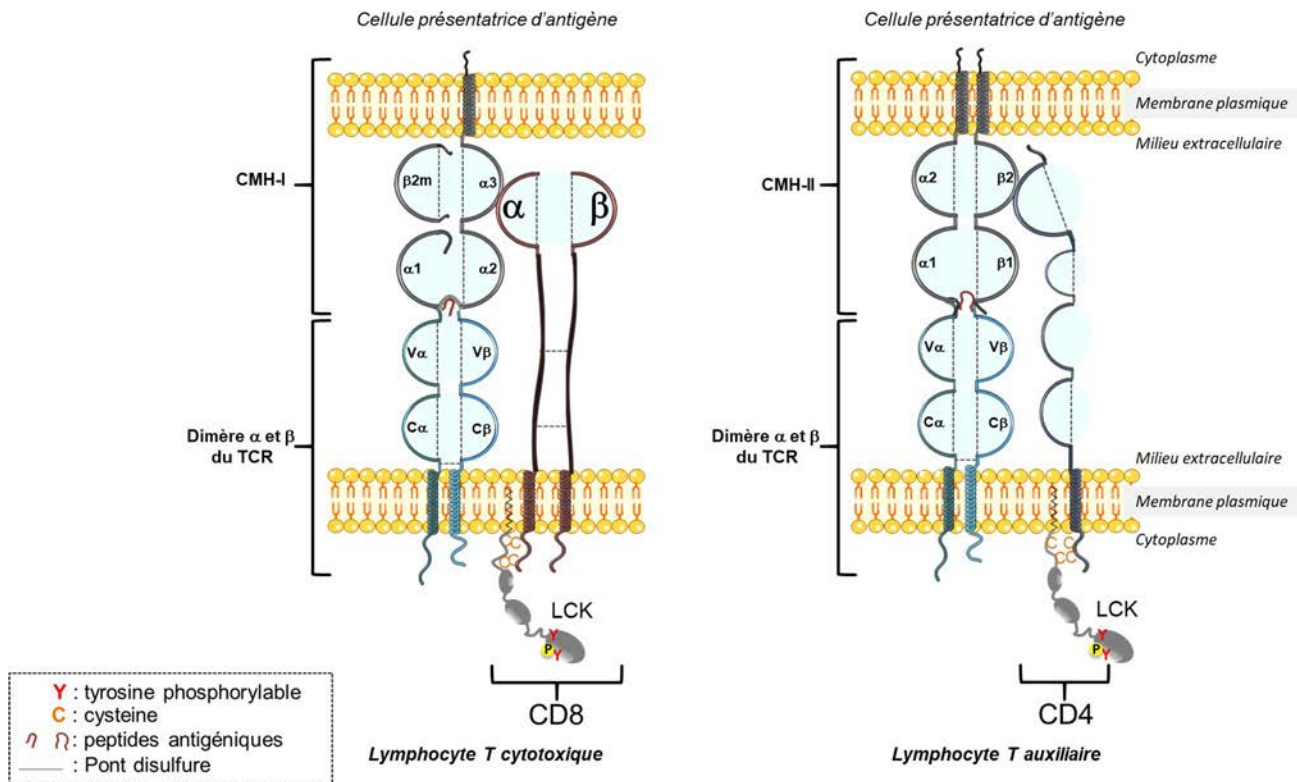
triméthylation des histones H3 sur leur lysine 4. RAG2 interagit avec les histones méthylées par son domaine PHD ce qui déclenche son activité enzymatique (32, 33). La déméthylation des histones peut conduire à l'arrêt du recrutement du complexe RAG et par conséquent réprimer le réarrangement de gènes (34).

## **II. Les corécepteurs CD4 et CD8**

Les corécepteurs CD4 et CD8 sont exprimés par les LT auxiliaires et cytotoxiques respectivement. Ce sont des glycoprotéines exprimées dans le réticulum endoplasmique et exportées à la membrane plasmique. Le corécepteur CD8 est constitué de sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  alors que le corécepteur CD4 ne représente qu'une seule protéine (35-37).

La région extracellulaire de ces glycoprotéines contient une séquence ayant une forte affinité pour les CMH. Le CD4 présente une séquence d'interaction avec le CMH de classe II (CMH-II) alors que le CD8 interagit spécifiquement avec le CMH de classe I (CMH-I) (38-43). La fonction de cette interaction vis-à-vis du complexe TCR-pCMH est discutée. Alors que le CD8 semble interagir avec le CMH afin de maintenir l'interaction TCR-pCMH (44, 45), le CD4 ne semble pas avoir cette fonction de soutien (46).

Les régions intracellulaires des corécepteurs CD4 et CD8 interagissent avec la protéine kinase LCK (Lymphocyte Cell-Specific Protein-Tyrosine Kinase) impliquée dans le déclenchement de la signalisation des LT (47, 48). Il est clairement démontré que l'engagement des corécepteurs CD4 et CD8 par les pCMH facilite le déclenchement des signaux par les TCR (49). Cependant, Jiang et al, ont observé que le corécepteur CD8 est recruté au TCR après son engagement (50). Un nouveau modèle émerge selon lequel des phosphorylations des ITAM par LCK, indépendamment des CD4 et CD8, se déroulent suite à l'engagement des TCR. Ces phosphorylations conduiraient au recrutement des corécepteurs CD4 ou CD8 par les LCK associés à leur région intracellulaire afin de soutenir et augmenter la signalisation (51) (Fig. 4).



**Figure 4 :** Représentation des corécepteurs CD8 et CD4 complexés au CMH-I et CMH-II respectivement

Suite à l'engagement du TCR par le complexe pCMH, le corécepteur CD4 ou le corécepteur CD8 sont recrutés suite à l'activation de LCK. Le CMH-I interagit par son domaine  $\alpha3$  au domaine globulaire de la chaîne  $\alpha$  du CD8. Le CMH-II interagit par son domaine  $\beta2$  avec le corécepteur CD4. Adapté de *Garland science 2005*

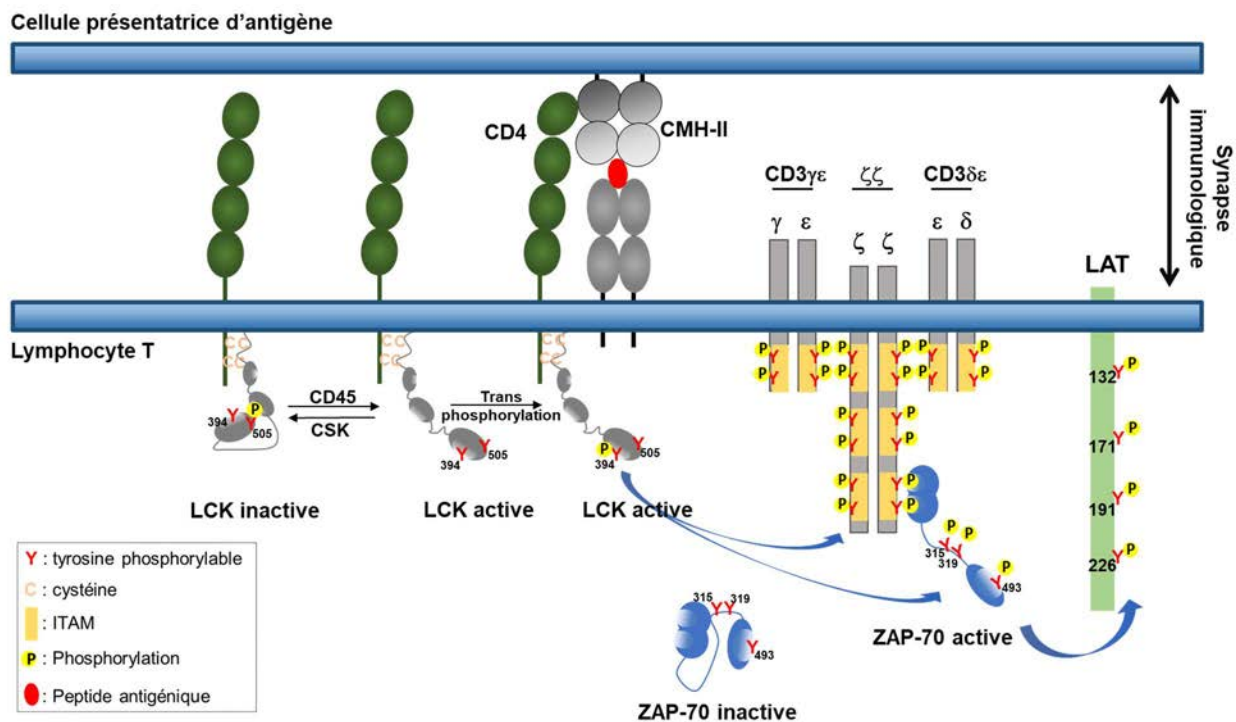
### III. Réponse des lymphocytes T suite à la reconnaissance d'un antigène

#### 1. Signalisation suite à l'engagement des TCR

Lors de la détection d'un élément étranger par les cellules de l'immunité innée, celles-ci peuvent phagocytter le pathogène, le dégrader et produire des peptides antigéniques qui sont associés aux CMH et exprimés à la surface des cellules. Les CPA professionnelles migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires où elles rencontrent des LT « naïfs » susceptibles de reconnaître spécifiquement les antigènes présentés par les CPA. La reconnaissance des antigènes par le TCR entraîne d'importants réarrangements moléculaires au sein des LT. La signalisation des cellules conduit à l'expression de gènes spécifiques entraînant la prolifération et la différenciation des cellules.

### 1.1. Complexes de signalisation mis en jeu lors de la reconnaissance antigénique

La reconnaissance du complexe pCMH par le TCR conduit au recrutement du corécepteur CD4 ou CD8 au voisinage du TCR (50, 51). L'association du TCR avec le pCMH entraîne des changements conformationnels des chaînes intracellulaires de CD3 qui aboutissent à l'exposition des tyrosines des ITAM alors accessibles au domaine kinase des protéines LCK (52-55). LCK phosphoryle les tyrosines des ITAM, entraînant le recrutement des kinases ZAP-70 (Zeta Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70) qui sont ensuite phosphorylées et activées par LCK (48, 56, 57). Les kinases ZAP-70 activées phosphorylent alors des tyrosines situées sur le domaine intracytoplasmique des adaptateurs LAT. Les phosphorylations de ces adaptateurs favorisent le recrutement de plusieurs complexes moléculaires à l'origine de voies de signalisation distinctes (58, 59) (Fig. 5).



**Figure 5 :** Représentation de la signalisation précoce suite à l'engagement du TCR

L'engagement du TCR entraîne le recrutement de la kinase LCK activée par déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice Y<sup>505</sup> par CD45. La trans-phosphorylation de LCK conduit à la phosphorylation de la tyrosine activatrice Y<sup>394</sup> qui stabilise la conformation active de l'enzyme. LCK est recrutée avec le CD4 (ou CD8) au TCR et phosphoryle les tyrosines des ITAM des CD3 et des chaînes ζζ conduisant au recrutement de ZAP-70 aux ITAM phosphorylés. Cette kinase est activée par transphosphorylation ou par LCK. Une fois activé, ZAP-70 phosphoryle l'adaptateur LAT. Adapté de « *T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded* » par Brownlie et Zamojska 2013.

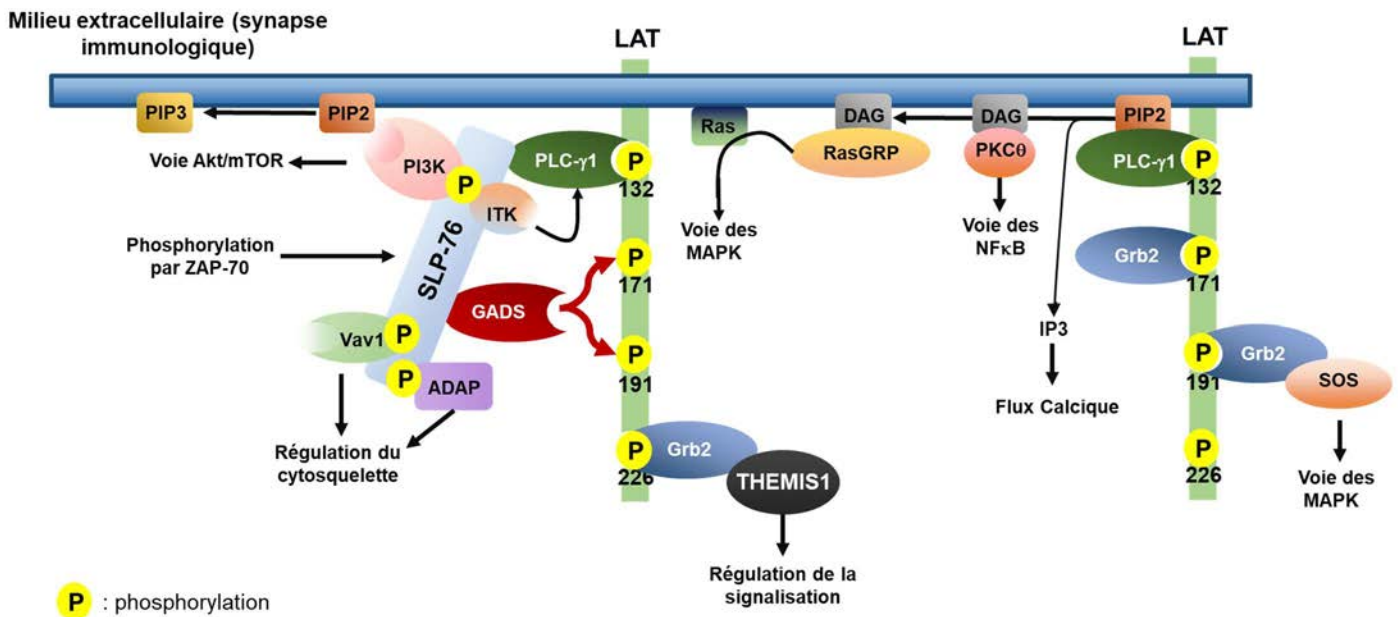
Activation de LCK : LCK est une protéine kinase de la famille des Src, implantée dans la membrane plasmique par la myristoylation et palmitoylation de son extrémité N-terminale (60, 61) . Elle contient un domaine SH2, capable d'interagir avec des tyrosines phosphorylées contenues dans des motifs précis, et un domaine SH3 important dans la transmission des signaux (62-64). Ces protéines peuvent naviguer seules sous la membrane plasmique, ou associées au domaine intracellulaire des CD8 $\alpha$  et des CD4 avec lesquelles elles interagissent *via* des régions riches en cystéines (65, 66). En absence de signal, la majorité des LCK sont sous conformation inactive suite à la phosphorylation par CSK de la tyrosine inhibitrice Y<sup>505</sup> (67, 68). Cette phosphorylation conduit à une auto-inhibition de LCK par interaction de son domaine SH2 avec la tyrosine phosphorylée entraînant une conformation inactive (69-71). Suite à l'engagement des TCR, la protéine phosphatase CD45 déphosphoryle la tyrosine inhibitrice de LCK entraînant l'ouverture de la protéine dans une conformation active. LCK autophosphoryle en trans la tyrosine Y<sup>394</sup> de son site catalytique ce qui stabilise sa conformation active (60, 72). Un autre modèle plus récent suggère qu'une fraction de LCK préexiste sous forme activée dans les cellules au repos. Dans ce modèle, l'engagement des TCR n'entraîne pas d'augmentation de l'activité de LCK mais conduit à une redistribution des protéines à proximité du TCR permettant ainsi la phosphorylation des ITAM (73). Les mécanismes permettant cette redistribution sont encore mal compris.

Recrutement de ZAP-70 : Une fois activée, LCK phosphoryle les tyrosines des ITAM des CD3 (48). Cette phosphorylation conduit au recrutement de ZAP-70 qui interagit *via* ses domaines SH2 avec les tyrosines phosphorylées des ITAM (57, 74, 75). La fixation de ZAP-70 sur les ITAMs phosphorylés entraîne un changement conformationnel exposant les tyrosines Y<sup>315</sup>, Y<sup>319</sup> et Y<sup>493</sup> de ZAP-70 qui peuvent alors être phosphorylées par les protéines kinase LCK (76-81). Les tyrosines Y<sup>315</sup> et Y<sup>319</sup> se trouvent sur une région flexible en amont du domaine SH2 alors que la tyrosine Y<sup>493</sup> est localisée sur le domaine SH2 (77, 82, 83). Ces phosphorylations entraînent l'exposition du site catalytique déclenchant alors l'activation de la fonction kinase de ZAP-70 (84).

Phosphorylation de LAT : Une fois activée, la protéine kinase ZAP-70 phosphoryle les tyrosines Y<sup>132</sup>, Y<sup>171</sup>, Y<sup>191</sup> et Y<sup>226</sup> de LAT (58, 59). LAT est une protéine transmembranaire, avec une petite région extracellulaire et une grande région intracellulaire sur laquelle se trouve les tyrosines phosphorylées par ZAP-70. La pY<sup>132</sup> est le site d'ancrage pour la PLC- $\gamma$ 1 (Phospho Lipase C  $\gamma$ 1). Les pY<sup>226</sup> et pY<sup>191</sup> sont essentielles pour le recrutement du facteur d'échange de guanines Vav1 à LAT. Une fois phosphorylées, les Y<sup>171</sup>, Y<sup>191</sup> et Y<sup>226</sup> peuvent

entraîner le recrutement de l'adaptateur Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2). Les pY<sup>191</sup> et pY<sup>171</sup> peuvent également interagir avec l'adaptateur GADS (Grb2-related Adaptor Downstream of Shc). Le recrutement de GADS conduit au recrutement à LAT de l'adaptateur SLP-76 (SH2 Domain-Containing Leukocyte Protein Of 76 KDa). Par ailleurs, le recrutement à LAT de Grb2 entraîne celui de SOS (Son of Sevenless) ou de THEMIS1 (Thymocyte-Expressed Molecule Involved In Selection) qui interagissent constitutivement avec l'adaptateur (85-88).

Phosphorylation de SLP-76 : SLP-76 interagit constitutivement avec les protéines PLC- $\gamma$ 1 et GADS (89). Une fois recrutée à LAT *via* GADS, ZAP-70 phosphoryle SLP-76 sur plusieurs tyrosines (90). La phosphorylation de SLP-76 sur la tyrosine Y<sup>112</sup>, Y<sup>128</sup> et Y<sup>145</sup> conduit au recrutement d'autres protéines de signalisation telles que la kinase ITK qui est responsable de la phosphorylation de la PLC- $\gamma$ 1 (91, 92). Ces tyrosines phosphorylées peuvent aussi conduire au recrutement de ADAP, NCK, et Vav1 (93-96). Par conséquent, la phosphorylation de LAT entraîne le recrutement d'un ensemble de complexes moléculaires à l'origine de différentes voies de signalisation.



**Figure 6 :** Recrutement des complexes de signalisation à LAT

La phosphorylation de LAT par ZAP-70 conduit au recrutement de Grb2, GADS, PLC- $\gamma$ 1. Le recrutement de Grb2 entraîne le recrutement de THEMIS1 qui régule la signalisation ou SOS qui active la voie des MAP kinases. GADS, conduit au recrutement de l'adaptateur moléculaire SLP-76 qui est, par la suite, phosphorylé par ZAP-70. Cette phosphorylation entraîne le recrutement de Vav1 et ADAP qui régule le cytosquelette, mais aussi de Pi3K qui active AKT et enfin ITK qui active PLC- $\gamma$ 1. L'activation de PLC- $\gamma$ 1 entraîne la production de DAG et d'IP3 à partir de PIP2. IP3 entraîne le relargage calcique et DAG s'associe à RasGRP et déclenche la voie des MAP kinases par activation de Ras par RasGRP. Adapté de «*Role of the LAT adaptor in T-cell development and Th2 differentiation.*» de Malissen et al., 2005.

## 1.2. Principales voies de signalisation

L'ensemble de ces phosphorylations déclenchent le recrutement de complexes moléculaires entraînant l'activation ou la répression de voies de signalisation distinctes.

La phosphorylation de PLC- $\gamma$ 1 active sa fonction phospholipase qui rompt la liaison phosphodiester reliant le groupement phospho-inositol au groupement diacylglycérol du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Pi(4,5)P2) (97). Cette hydrolyse conduit à la formation de diacylglycérol (DAG) et d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) (98) (Fig. 6).

Voies calciques : L'IP3 peut être capté par le récepteur à l'IP3 à la surface du réticulum endoplasmique entraînant le relargage calcique depuis le réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. Le calcium relâché dans le cytoplasme peut être capté par les domaines EF-Hand de STIM conduisant à son oligomérisation. Le complexe STIM interagit avec le canal

ionique Orai1 à la membrane plasmique entraînant son ouverture et une entrée massive de calcium depuis le milieu extracellulaire (99, 100). Le flux calcique entraîne l'activation du complexe calcineurin/calmodulin qui déphosphoryle le facteur de transcription NFAT et favorise ainsi sa translocation nucléaire. Au sein du noyau, en collaboration avec AP-1 qui est activé par les voies des MAPK, le complexe NFAT/AP-1 favorise l'activation de gènes essentiels à l'activation cellulaire (101). Le calcium peut aussi permettre de lever des répressions dépendantes de facteurs de transcription. La protéine DREAM, sous forme tétramère, agit comme répresseur de l'expression de certains gènes. En présence de calcium, capté par les domaines EF-Hand des protéines DREAM, un changement conformationnel conduit à la dissociation du complexe et ainsi à la levée de l'inhibition des gènes réprimés par DREAM. L'expression d'une protéine DREAM constituée de domaines EF-Hand insensibles au calcium, entraîne la diminution d'expression de cytokines. Cet événement s'accompagne de la diminution de la prolifération des LT (102).

Voies des MAP kinases : Le DAG peut être capté par la région C1 présente sur certaines kinases PKC permettant la phosphorylation de la protéine RasGRP, qui permet l'échange de GDP en GTP sur les protéines Ras (103). La protéine SOS, qui est recrutée à LAT *via* Grb2 a aussi une fonction d'échangeur de guanine sur Ras et fonctionne en collaboration avec RasGRP (104). L'activation de Ras conduit à une cascade d'activation de kinase en phosphorylant les protéines Raf (MAPKKK) qui activent les kinases Mek (MAPKK) qui enfin activent les kinases Erk (MAPK). Les kinases Erk phosphorylent et activent Elk1 qui une fois transloquée dans le noyau active AP-1 (105). La protéine adaptatrice KSR favorise la signalisation des MAPK en regroupant les différentes protéines de la voie (106). La déficience en KSR conduit à la diminution de la phosphorylation de Erk dans les LT. Cette diminution de stimulation s'accompagne d'une diminution de la prolifération des LT (107, 108). Il est connu que BRAP régule négativement la voie des MAP kinases en inactivant la protéine adaptatrice KSR (109-111). Cependant, aucune donnée n'existe concernant la fonction de BRAP au sein des LT.

Voies NF $\kappa$ B : Tout comme la voie des MAP kinases, le DAG peut être capté par un domaine spécifique d'une isoforme de PKC appelé PKC $\theta$ . PKC $\theta$  phosphoryle CARMA1 ce qui entraîne son oligomérisation et le recrutement de BCL-10 et enfin de MALT1. Ce complexe appelé CBM conduit à l'activation de TRAF6 qui active IKK par recrutement de TAK1. L'activation de IKK permet la phosphorylation d'I $\kappa$ B entraînant sa dégradation et la libération des protéines NF $\kappa$ B qui étaient retenues dans le cytoplasme par I $\kappa$ B. Les protéines NF $\kappa$ B

peuvent alors être internalisées dans le noyau où elles vont contribuer à l'expression de gènes essentiels à l'activité des LT (112, 113).

Voies PI3K/AKT : Le recrutement de la PI3K à LAT, suite à l'engagement des TCR, conduit à la phosphorylation du PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) formant alors du PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Le PIP3 recrute ensuite des molécules contenant des domaines homologues pleckstrines PH telles que PDK1 et AKT. PDK1 phosphoryle AKT sur sa thréonine T<sup>308</sup> et sérine S<sup>473</sup> activant son groupement catalytique (114, 115). La phosphorylation par pAKT de p27, un régulateur négatif du cycle cellulaire, conduit à sa rétention et sa dégradation au sein du cytoplasme. Cela permet l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire (116). Par ailleurs, la phosphorylation des facteurs de transcription de la famille FoxO par Akt favorise la rétention du facteur de transcription dans le cytoplasme. Les gènes régulés par FoxO tels que le facteur pro-apoptotique Bad sont alors moins exprimés conduisant à la survie et à la prolifération des cellules (117, 118).

Les voies de signalisation décrites dans cette partie sont mises en jeu lors de l'engagement des TCR par les complexes pCMH. La signalisation des TCR est aussi modulée par des corécepteurs qui peuvent être engagés par des ligands exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes. Le corécepteur CD28, par exemple, interagit avec ses ligands CD80 et CD86 à la surface des CPA (119, 120). La déficience en CD28 entraîne la diminution de la prolifération des LT suite à une immunisation (121). Par ailleurs, la stimulation des LT sans engagement du CD28 conduit à une signalisation moins efficace et une activation plus faible des LT (122). Ces corécepteurs sont, en effet, importants dans la signalisation et dans l'activité des LT (123, 124). D'autres corécepteurs existent et peuvent jouer un rôle stimulateur ou inhibiteur dans la signalisation, l'activation et les fonctions des LT.

### 1.3. Synapse immunologique

Les LT « scannent » les CPA à la recherche d'un éventuel antigène auquel ils sont spécifiques (125). L'engagement du TCR, provoque l'arrêt des mouvements cellulaires et à l'élaboration d'une zone de contact cellulaire étroite entre les LT et les CPA appelée synapse immunologique (126-129). Cette structure est importante dans l'activation des LT. En plus de cette activation, elle permet la polarisation des molécules effectrices en direction des cellules cibles dont elles régulent l'activation ou l'apoptose (130-132). La synapse



immunologique se caractérise par trois régions : une région centrale cSMAC (central Supramolecular Activation Cluster) dans laquelle se concentrent les TCR, les corécepteurs CD4 et CD8, d'autres corécepteurs tels que CD28 et de nombreuses protéines de signalisation, une région proximale pSMAC contenant les intégrines responsables de l'adhérence cellulaire et enfin une région distale dSMAC au sein de laquelle se trouvent des corécepteurs régulant la signalisation tels que CD43 et CD45 (133, 134) (Fig. 7A).

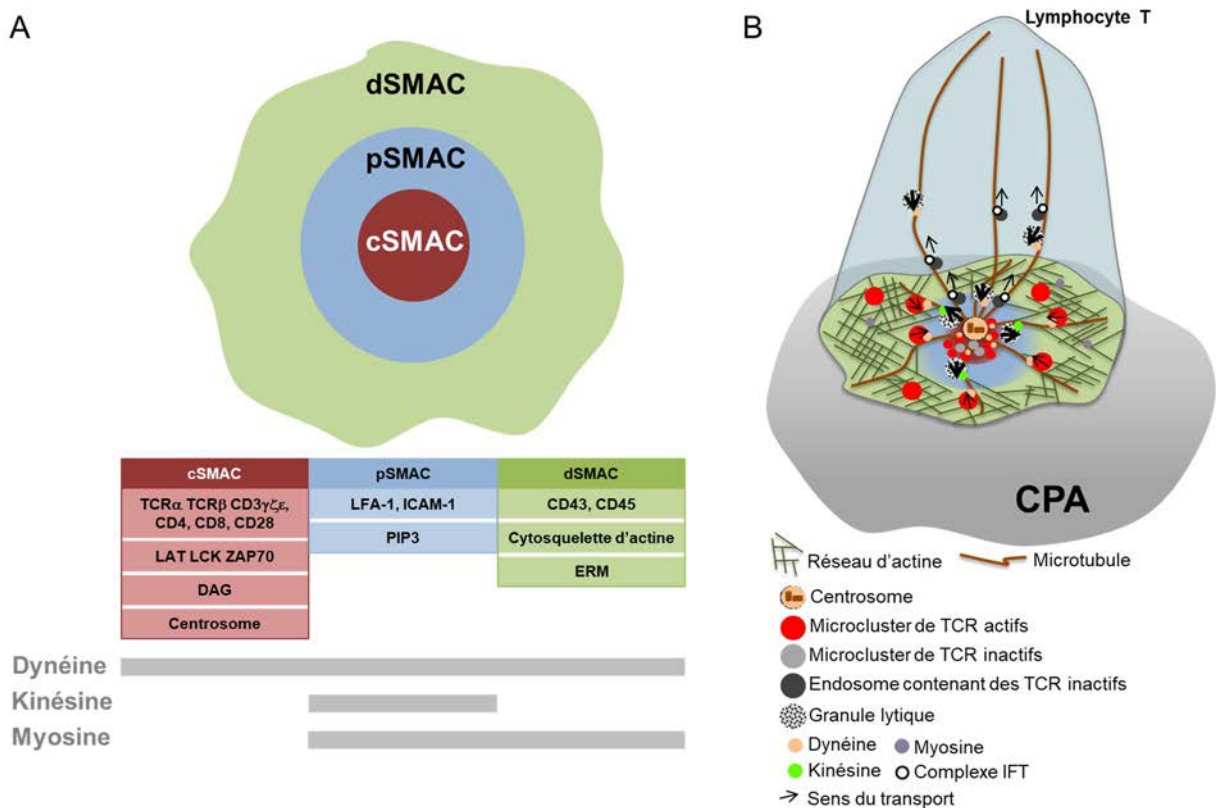
Lors de l'engagement du TCR, le recrutement et la phosphorylation de SLP-76 entraînent le recrutement de la protéine ADAP (95, 135). ADAP interagit constitutivement avec SKAP55. RAP1<sup>GTP</sup>, la forme activée de RAP1, est produite par une RAPGEF suite à la production de DAG qui recrute PKC $\theta$  (136, 137). RAP1<sup>GTP</sup> interagit avec SKAP55 et conduit à l'activation des intégrines LFA-1 probablement par recrutement de RapL (138). Cette voie de signalisation, augmente l'affinité de LFA-1 pour son ligand ICAM-1 et favorise l'adhérence cellulaire et la production d'actine corticale au niveau du dSMAC (96, 139-141). Le recrutement de Vav1 à SLP-76 phosphorylée, conduit à la nucléation des fibres d'actine par activation de CDC42 et Rac1 par échange de leur GDP en GTP (142, 143). Cette activation provoque l'activation de Arp2/3 par recrutement et activation de WASP par CDC42 et de WAVE par Rac1 (144-146). L'élaboration de la synapse immunologique est fortement dépendante du cytosquelette d'actine. L'utilisation d'agents chimiques affectant les fibres d'actine compromet la formation et l'activité de la synapse immunologique (147, 148). L'actine favorise le recrutement des microclusters de TCR au cSMAC par contraction mécanique favorisée par la protéine motrice myosine. La perte de la myosine IIA par interférence à ARNm ou traitement par les inhibiteurs Blebbistatin et ML-7 dans des LT CD4<sup>+</sup> humains ou murins entraîne la diminution de la signalisation et de l'activation des LT. Ce moteur favorise donc le mouvement des TCR vers la synapse immunologique dans des cellules primaires de souris et humaines (149-152). La formation de la synapse immunologique nécessite des réarrangements moléculaires au niveau de l'actine afin de favoriser le déplacement des molécules à la surface de la membrane plasmique. L'activation de Vav1 est associée à la diminution de la phosphorylation des protéines ERM, un complexe reliant les fibres d'actine aux protéines de la membrane plasmique. Cette déphosphorylation conduit à la solubilisation du complexe ERM et donc à la flexibilité de la synapse immunologique pour favoriser les remaniements moléculaires à la surface cellulaire.(153, 154). Les fibres d'actine et les microtubules se coordonnent dans la stabilisation et la fonction de la synapse immunologique. Le recrutement du centrosome au niveau de la zone de contact entre la CPA et le LT, est une des caractéristiques de la formation de la synapse

immunologique (155-157). L'interruption des microtubules par des agents chimiques conduit au défaut de recrutement du centrosome et à la formation de conjugués instables. Bien que la sécrétion des cytokines ne soit pas affectée par l'absence de microtubule, la polarisation de ces dernières vers la cellule cible est compromise (158). Les mécanismes mis en jeu dans le recrutement du centrosome sont encore à l'étude. Mais une publication proposait qu'ADAP puisse interagir avec la dynéine et favoriser le recrutement du centrosome par « coulissement » au cours de la signalisation des intégrines (159). Les moteurs moléculaires dynéines et kinésines, se déplaçant sur les microtubules, sont impliqués dans la formation de la synapse immunologique et sa fonction. Le traitement des LT CD4<sup>+</sup> primaires de souris par EHNA, un inhibiteur de la dynéine, ou par ARNm interférents n'entraîne pas de défaut de formation des microclusters de TCR. En revanche, la relocalisation de ces clusters au cSMAC est fortement altérée. Cette inhibition de la dynéine, démontre une augmentation de la signalisation par analyse de la phosphorylation de LAT et de Erk. Cet effet est accompagné de l'augmentation de la sécrétion d'IL-2. Ces résultats démontrent l'intérêt de la dynéine dans la régulation de la signalisation probablement par le recyclage des TCR (160). Cependant, une autre publication expliquant un travail réalisé dans la lignée cellulaire Jurkat, démontre que l'interférence à ARNm de la dynéine ou l'inhibition de son interaction avec la dynactine, entraîne la diminution de la signalisation. Les auteurs ont démontré la diminution de recrutement du MTOC en absence de dynéine (161, 162). L'extinction du gène *kif-5*, codant une kinésine dans des LT CD8<sup>+</sup> primaires humains, démontre que KIF-5 est importante pour véhiculer les granules lytiques à la synapse immunologique (163). Par ailleurs, l'interférence à ARNm dans la lignée cellulaire Jurkat et dans des LT CD4<sup>+</sup> primaires humains démontre l'importance de GAKIN, une protéine de la famille des kinésines, dans la redistribution de régulateurs négatifs de la signalisation (164).

Les microclusters de TCR sont constamment internalisés par endocytose au niveau du cSMAC et recyclés probablement pour limiter et perpétuer en même temps l'intensité des signaux transmis par les TCR (165). Les mécanismes moléculaires mis en place pour entraîner cette endocytose ne sont pas vraiment établis. Il a été découvert que ce processus est régulé par les protéines du complexe IFT, mis en place pour la formation des cils dans les cellules ciliées (166). Ce complexe fonctionne avec les moteurs moléculaires dynéines et kinésines dans d'autres types cellulaires (167). Cependant, l'interactome de IFT dans des LT ne permet pas de détecter ni l'un ni l'autre de ces moteurs moléculaires (168, 169) (Fig. 7B). Des échanges membranaires peuvent se réaliser depuis la CPA vers le LT formant ainsi des vésicules contenant des TCR complexés avec des CMH. Ce mécanisme de trogocytose n'est

pas encore compris mais il semblerait que ce processus permette de soutenir la signalisation (170).

Par ailleurs, une fraction importante de LAT est contenue dans des vésicules décorées par les protéines VAMP-7. Ces vésicules gagnent la synapse immunologique sans nécessairement fusionner avec la membrane plasmique. LAT peut alors recruter des complexes de signalisation directement sur les vésicules. La déficience en VAMP-7 dans des cellules Jurkats conduit à une diminution du recrutement des vésicules contenant LAT à la membrane plasmique et une réduction des signaux transmis par les TCR engagés par des super-antigènes. Cette observation suggère l'importance de la signalisation vésiculaire dans la signalisation des LT qui pourrait favoriser la conduction des signaux vers les différents compartiments intracellulaires (171).



**Figure 7 :** Schématisation de la synapse immunologique

**(A)** Représentation du cSMAC, pSMAC et dSMAC sur le LT au niveau de l'interface entre une CPA et le LT. Chaque région concentre différentes molécules impliquées dans la régulation de l'activation du LT et dans les remaniements moléculaires. **(B)** Représentation des mouvements moléculaires au sein d'un LT conjugué à une CPA. Les microclusters de TCR actifs sont dirigés vers le cSMAC par le transport par la dynéine et grâce à la contraction de l'actine régulée par la myosine. Au cSMAC, les TCR inactifs sont endocytés grâce au complexe IFT. Les granules lytiques sont dirigées vers le centrosome par la dynéine et vers la membrane plasmique par la kinésine.

## 2. Différenciation des lymphocytes T

La signalisation déclenchée par les TCR est accompagnée d'évènements de signalisation induits par les cytokines, sécrétées par les CPA ou par des lymphocytes déjà différenciés, qui se fixent à des récepteurs spécifiques sur les LT. Ce mécanisme conduit à la différenciation des LT en sous populations spécifiques telles que Th1, Th2, Th9, Th17, T<sub>fh</sub>, T<sub>reg</sub> et cytotoxiques. La différenciation des LT en sous-populations effectrices permet le développement d'une réponse immunitaire spécifique adaptée au type de pathogène en induisant le recrutement ordonné de cellules spécialisées (Fig. 8).

### 2.1. Différenciation des lymphocytes T auxiliaires

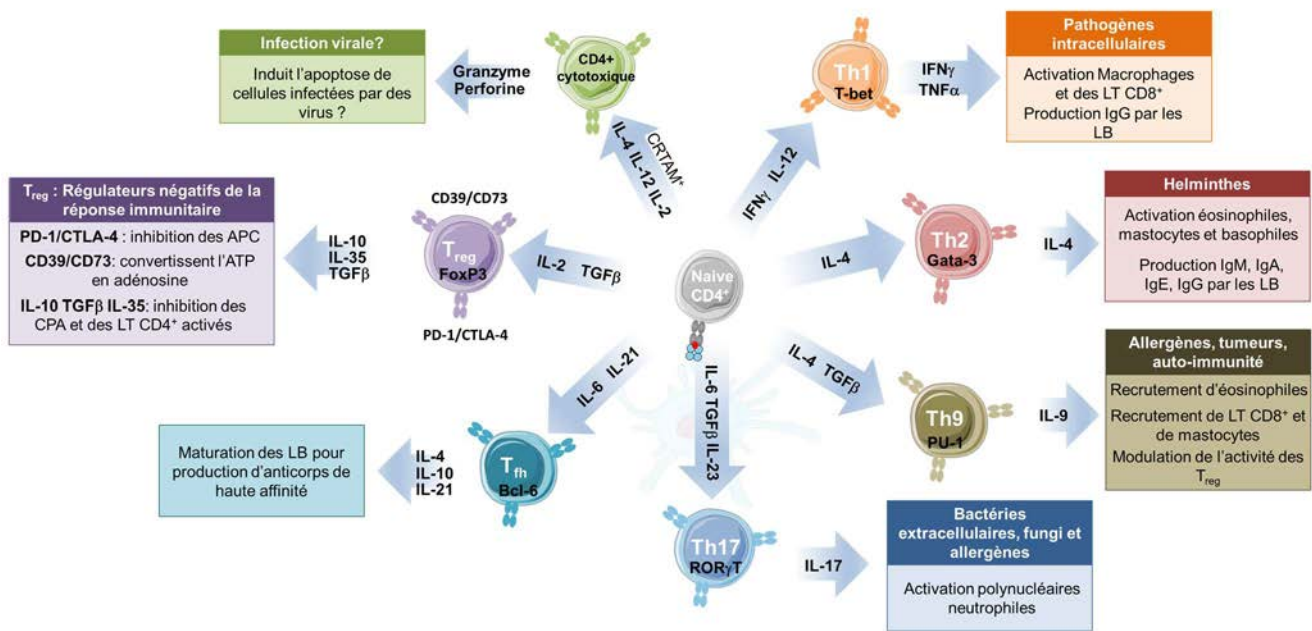
Les LT auxiliaires peuvent se différencier en Th1, Th2, Th9, Th17, T<sub>fh</sub> ou T<sub>reg</sub> en fonction des cytokines délivrées par les CPA. La présence d'IL-12 conduit à l'expression de T-bet, un facteur de transcription responsable de la différenciation des cellules en Th1. Cela entraîne, entre autres, la sécrétion d'IFN $\gamma$  qui facilite l'activation des macrophages et déclenche la commutation de classe des récepteurs des LB. Ces Th1 entraînent le développement d'une réponse immunitaire dirigée plus spécifiquement contre les pathogènes intracellulaires. L'IL-4 conduit à l'expression du facteur de transcription GATA3 entraînant le programme de différenciation en sous population Th2. Ces cellules secrètent de l'IL-4 et de l'IL-13 déclenchant la production d'IgE par les LB et l'activation des éosinophiles, des basophiles et des mastocytes qui facilitent l'élimination des parasites et dégradent les protéines toxiques contenues dans les venins. La présence de TGF $\beta$ , en plus d'IL-4, peut conduire à la différenciation en une autre sous population sécrétant de l'IL-9 appelée Th9. En présence d'IL-1, d'IL-6, d'IL-23 et de TGF $\beta$ , les cellules expriment ROR $\gamma$ T et IL-17. Ces cellules, appelées Th17, entraînent le développement d'une réponse spécifique dirigée contre les bactéries extracellulaires. La différenciation des cellules en T<sub>fh</sub> est induite par la présence d'IL-6 et d'IL-21 dans le milieu extracellulaire. Dans ces cellules, le facteur de transcription BCL-6 conduit à l'expression de PD-1, CXCR4 et CXCR5 qui jouent un rôle important dans ces cellules qui sont nécessaires à la maturation des LB et à la production d'anticorps de haute affinité pour les antigènes étrangers (172).

Enfin, la population T<sub>reg</sub> est indispensable à la régulation de la réponse immunitaire. Bien qu'elle puisse provenir du thymus lors du développement des LT, elle peut aussi être induite par différenciation des LT auxiliaires en présence d'IL-2 et de TGF $\beta$ . Ces cytokines, conduisent à l'expression du facteur de transcription FoxP3 permettant l'expression de

cytokines anti-inflammatoires IL-10, TGF $\beta$  et IL-35. Par ailleurs, l'expression de CTLA-4 et de PD-1 interagit avec les ligands CD80 et CD86 à la surface des CPA afin de limiter l'activation des LT. Enfin, l'expression du marqueur CD39 conduit à la conversion d'ATP en AMP qui est alors déphosphorylé par CD73 pour synthétiser de l'adénosine afin d'apaiser l'environnement inflammatoire dans lequel règne les LT (173).

## 2.2. Différenciation des lymphocytes T cytotoxiques

Les LT cytotoxiques se différencient majoritairement à partir des LT CD8<sup>+</sup> naïfs une fois activés par des CPA professionnelles et en fonction des cytokines délivrées par les CPA et les LT auxiliaires. Cela se caractérise par l'expression des protéines granzymes et perforines qui ont pour fonction d'induire l'apoptose des cellules cibles (174). L'expression des cytokines TNF $\alpha$  par les LT CD8<sup>+</sup> activés favorise leur activité lytique (175-177). Cependant, une faible proportion des LT CD4<sup>+</sup> peut aussi acquérir les caractéristiques cytotoxiques par expression de granzymes et de perforines (178-180).



**Figure 8 :** Différenciation des lymphocytes T auxiliaires

L'activation des LT par les CPA conduit à leur différenciation en sous populations de LT capables d'organiser une réponse immunitaire adaptée au pathogène. Ces LT peuvent se différencier en Th1 pour une réponse spécifique des pathogènes intracellulaires. Les Th2 conduisent à une réponse adaptée contre les parasites. Les Th9 favorisent le recrutement d'éosinophiles, de mastocytes et de LT CD8<sup>+</sup> contre les allergènes et le développement tumoral. De plus, ils modulent l'activité des T<sub>reg</sub> pour limiter l'auto-immunité. Les Th17 entraînent la sécrétion d'IL-17 pour l'activation des polynucléaires neutrophiles afin de réaliser une réponse spécifique aux bactéries extracellulaires et aux champignons. Les Th17 peuvent être responsables d'allergie. Les T<sub>fh</sub> sont spécifiques dans la maturation des LB. La population LT CD4<sup>+</sup> cytotoxique a été nouvellement identifiée. Il semblerait, d'après les premières données, qu'ils réalisent une réponse contre les cellules infectées par un virus. La population T<sub>reg</sub> est importante dans la régulation de la réponse immunitaire.

### 2.3. Différenciation en lymphocytes T mémoires

L'activation des LT conduit majoritairement au développement d'une réponse effectrice contre les pathogènes intra- ou extra-cellulaires. Cependant, après l'élimination du pathogène, les LT stimulés meurent suite à la privation en cytokines et par engagement des récepteurs de mort cellulaire programmée (181). Cependant, une faible proportion des LT spécifiques des antigènes persiste au sein de l'organisme sous forme de LT mémoires. Ces cellules peuvent circuler dans l'organisme ou résider dans les tissus non lymphoïdes où elles seront mobilisées rapidement lors d'infections futures par un pathogène présentant les mêmes antigènes (182).

La différenciation des LT mémoires peut être due à l'asymétrie des divisions après la première division cellulaire. En effet, suite à l'engagement des TCR par les complexes pCMH, la cellule fille au contact de la CPA reçoit les protéines caractéristiques de cellules effectrices. En revanche, la cellule distale acquiert des caractéristiques de LT mémoires (183, 184).

## CHAPITRE I : LE DEVELOPPEMENT PRECOCE DES LYMPHOCYTES T

Le développement des LT se déroule dans le thymus au sein duquel se distinguent quatre populations principales de thymocytes. Le stade double négatif (DN) est la première étape du développement des LT. Il conduit à la maturation des cellules n'exprimant pas les corécepteurs CD4 et CD8. Comme nous le verrons dans ce chapitre, les précurseurs DN proviennent de la moelle osseuse et acquièrent au cours de leur développement dans le thymus la chaîne  $\beta$  du TCR. Suite à l'expression de cette chaîne  $\beta$ , les cellules coexpriment les corécepteurs CD4 et CD8 mais aussi la chaîne  $\alpha$  du TCR. Ces cellules doubles positives (DP), sont soumises à des processus de sélection positive et de sélection négative afin d'éliminer les cellules exprimant un TCR de trop faible ou trop forte affinité pour les antigènes ubiquitaires du soi présentés par les CMH. Ces événements de sélection conduisent à la progression des cellules vers un stade au cours duquel elles exprimeront exclusivement le corécepteur CD4 ou le corécepteur CD8. Durant ce stade, ces cellules simples positives (CD8 SP ou CD4 SP) sont soumises à une nouvelle étape de sélection négative afin d'éliminer les cellules exprimant des TCR qui reconnaissent fortement des autoantigènes spécifiques d'organes. Les cellules ayant survécu aux mécanismes de sélection continuent leur maturation et sortent du thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires.

Le développement précoce des LT est fortement dépendant de la signalisation par les récepteurs NOTCH qui sont engagés par les ligands DLL ou les protéines de la famille Jagged. Chez les mammifères, quatre paralogues de NOTCH existent, trois DLL (DLL-1, DLL-3 et DLL-4) et deux Jagged (JAG1 et JAG2). Le récepteur NOTCH est constitué d'une région extracellulaire NECD qui peut interagir avec son ligand et d'une région intracellulaire NICD. La reconnaissance d'un ligand par le récepteur NOTCH conduit à l'endocytose du complexe récepteur-ligand à l'intérieur des cellules exprimant les ligands. La région extracellulaire de NOTCH est clivée par la protéine ADAM et la région intracellulaire NICD est clivée par l'action de la  $\gamma$ -sécrétase. Le NICD rejoint le noyau dans lequel il active des gènes cibles en collaboration avec les facteurs de transcription RBPJ et MAML1 (185).



## **I. La différenciation des précurseurs des lymphocytes T dans la moelle osseuse**

### **1. Origine des cellules souches hématopoïétiques**

Chez l'adulte, les précurseurs des LT se développent au sein de la moelle osseuse à partir de précurseurs communs à d'autres cellules lymphoïdes. Ces précurseurs, appelés cellules souches hématopoïétiques (CSH), sont originaires du léncithocèle durant le développement embryonnaire et se différencient à partir d'hémangioblastes aussi précurseurs des cellules endothéliales (186). Au stade fœtal, les CSH, alors au sein d'une région appelée Aorte-Gonade-Mésonephros (AGM), entrent dans la circulation sanguine pour coloniser le foie fœtal dans lequel elles prolifèrent intensément et se différencient (187). A l'approche de la naissance, les CSH migrent vers la moelle osseuse et entrent dans un stade de quiescence quelques semaines après la naissance. Elles résideront toute la vie de l'organisme au sein de la moelle osseuse où elles pourront se renouveler et se différencier (188).

Des facteurs de croissance hématopoïétique spécifiques peuvent conduire à la différenciation des CSH en cellules myéloïdes progénitrices (CMP) ou en cellules lymphoïdes progénitrices (CLP). Les CMP sont à l'origine des érythrocytes et des plaquettes ainsi que des cellules de l'immunité innée telles que les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les cellules dendritiques. Les CLP se différencient en LB, les cellules NK et les LT (189) (Fig. 9).

### **2. Différenciation des CSH vers le lignage lymphocytaire T**

La spécification des CSH et des CLP nécessite CXCR4, le récepteur à CXCL12, indispensable au maintien des cellules au sein de la moelle osseuse à proximité des cellules sécrétant de l'IL-7. En effet, l'IL-7 est importante dans la formation et le maintien des CLP (190). Les CLP se différencient majoritairement en LT et en LB. L'expression du ligand de NOTCH DLL-4 par certaines cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse, déclenche des programmes génétiques de différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules progénitrices des LT (TSP) (191). Cependant, de récentes études suggèrent l'existence d'une population précurseur des CPL appelée LMPP (lymphoid-primed multipotent progenitors) ayant une forte capacité à former directement des LT (192) (Fig. 9).

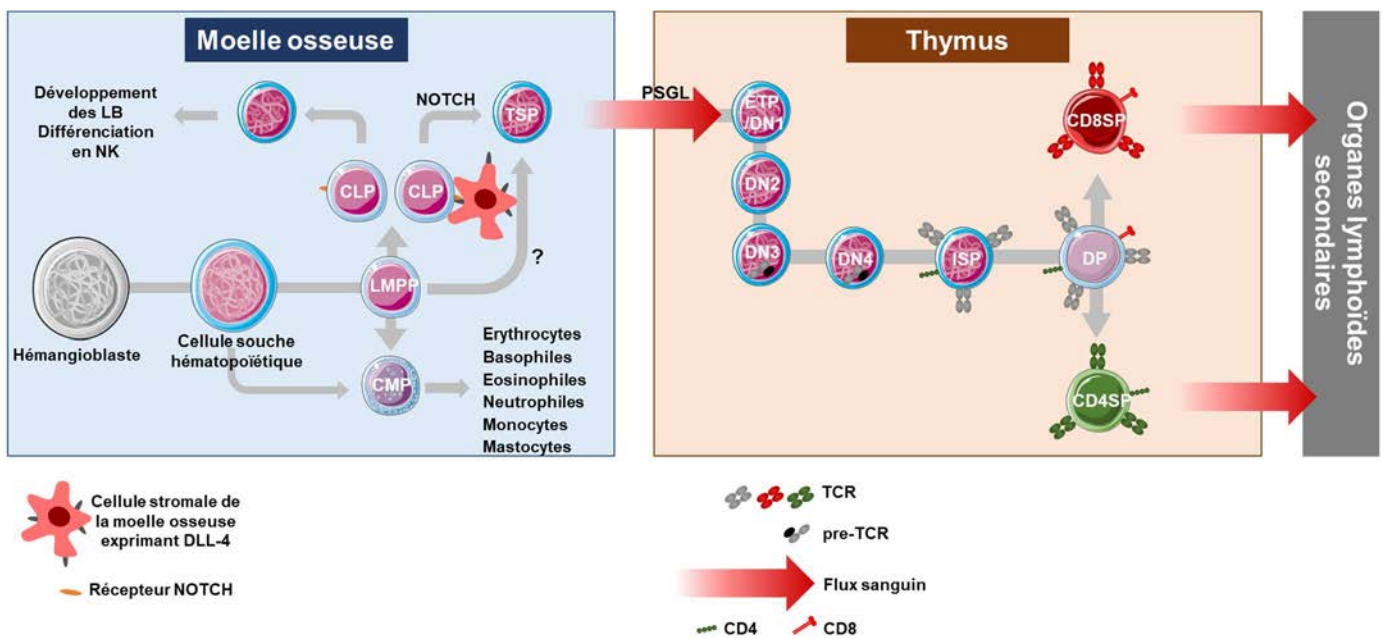
## **II. Acquisition du lignage T définitif au sein du thymus**

Les éléments génétiques du lignage T sont acquis au sein de la moelle osseuse suite à la différenciation des CSH en TSP, mais des processus supplémentaires sont mis en jeu dans le thymus pour stabiliser le lignage. En effet, en absence de signaux adéquats, les DN peuvent se différencier en d'autres cellules lymphoïdes ou myéloïdes. C'est au cours des stades DN que le lignage T est définitivement adopté. La population DN se caractérise par quatre sous populations DN en fonction de l'expression de CD25, qui est la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2, et de CD44, une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion et la migration des cellules. La première sous population DN provient directement de la moelle osseuse et est appelée DN1 (CD44<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>) ou ETP. Les cellules DN1/ETP expriment CD25 et progressent vers le stade DN2 (CD44<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>). La diminution d'expression de CD44 conduit à la population DN3 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>). Au cours du stade DN3 s'effectue la  $\beta$ -sélection, un événement indispensable dans le développement des LT, abordé plus en détail dans la suite de cette partie. Le passage de la  $\beta$ -sélection conduit à la survie et à la prolifération des cellules. La perte de l'expression de CD25 caractérise la population DN4 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) qui se développera ensuite en cellules DP. Les populations DN1 et DN2 sont encore capables de se différencier en cellules NK, en cellules dendritiques et en LB, contrairement aux cellules DN3 et DN4 qui sont engagées irréversiblement dans le lignage lymphocytaire T (193) (Fig. 9).

### **1. Les mécanismes d'entrée au niveau de la jonction cortico-médullaire du thymus**

Les cellules ayant acquis le profil TSP sortent de la moelle osseuse et rejoignent le thymus en quelques minutes, par la circulation sanguine, au niveau de la jonction cortico-médullaire. L'expression de CXCR4 conduit au maintien des cellules au sein de la moelle osseuse suggérant que CXCR4 doit être inactivée ou moins exprimée pour la sortie des cellules. Le blocage de CXCR4 par un antagoniste AMD3100 entraîne l'enrichissement des progéniteurs lymphoïdes au sein de la circulation sanguine (194). Une fois dans les vaisseaux sanguins, les TSP expriment les récepteurs aux chimiokines CCR9, CCR7 et CXCR4. Les cellules stromales thymiques de la jonction cortico-médullaire, sécrètent des chimiokines CCL25, CCL21, CCL19 et CXCL12 spécifiques de ces récepteurs (195). Les intégrines VCAM1 et ICAM1, à la surface des cellules stromales thymiques, sont importantes pour l'introduction des cellules au niveau la jonction cortico-médullaire. L'inactivation de ces intégrines à l'aide d'anticorps anti-VCAM1 ou anti-ICAM1 compromet fortement la colonisation du thymus par

les TSP (196). L'entrée des cellules au sein du thymus se fait par vague en fonction de la disponibilité des niches au sein de l'organe. L'expression de P-sélectine par les cellules endothéliales au niveau du parenchyme thymique, conduit à l'association des TSP exprimant PSGL1 aux cellules endothéliales thymiques et est fortement régulée par la disponibilité des niches (197, 198). CD44 est exprimée à la surface des TSP et est importante pour l'entrée des cellules au sein du thymus (199). Les cellules entrant ainsi dans le thymus se différencient en ETP/DN1 par la perte du marqueur FLT-3 et séjournent une dizaine de jours près de la jonction cortico-médullaire où elles réalisent de nombreux cycles de prolifération (200).



**Figure 9 :** Différenciation des cellules souches hématopoïétiques en lymphocytes T

Les CSH se différencient à partir d'hémangioblastes au sein de la moelle osseuse. Les CSH se différencient en LMPP qui sont à l'origine des CMP et CLP. Les CMP se différencient en cellules de l'immunité innée alors que les CLP se différencient en LT, LB et NK. L'interaction d'une cellule stromale de la moelle osseuse exprimant le ligand DLL-4 conduit à la spécification des CLP en TSP. Les TSP peuvent provenir de la différenciation directe des LMPP. Les TSP entrent dans le thymus grâce à PSGL et se différencient en ETP/DN1 qui progressent au sein du thymus vers les stades DP et SP.

## 2. La signalisation NOTCH est essentielle dans l'établissement du lignage T

La signalisation des récepteurs NOTCH est particulièrement importante au cours des stades précoces du développement des LT. Comme vu précédemment, elle est essentielle au sein de la moelle osseuse afin de conduire à la formation de cellules progénitrices des LT. Mais la signalisation par NOTCH est aussi importante dans le maintien du lignage T au sein du thymus. La déficience en NOTCH1 chez la souris, entraîne la diminution importante du nombre de thymocytes totaux accompagnée de l'augmentation de la proportion de DN. L'accumulation des cellules au stade DN1 révèle l'augmentation de la différenciation en cellules B220<sup>+</sup> représentatives de LB au sein du thymus (201). Il en est de même de la déficience conditionnelle pour la protéine MAML, un coactivateur transcriptionnel de la voie NOTCH, dans le modèle *Vav1<sup>Cre</sup>* (202). Par ailleurs, des cellules DN1 et DN2 mises en culture sur des cellules stromales OP9 se différencient en cellules DP en présence du ligand du récepteur NOTCH : DLL-1. En absence de ce ligand, les cellules DN2 et DN1 sont incapables d'atteindre le stade DP et se différencient principalement en cellules NK (203). Ces données illustrent l'importance de la signalisation NOTCH dans l'établissement du lignage T.

La signalisation NOTCH entre en compétition avec le facteur de transcription PU.1 qui favorise le développement des lignées myéloïdes (204). Par conséquent, la signalisation NOTCH est essentielle au maintien des caractères lymphoïdes en prévenant l'action du facteur de transcription PU.1 (205, 206). L'expression de PU.1 est détectable au cours du stade DN1 et DN2a, une sous population DN2 exprimant un niveau élevé de c-kit. En revanche, l'expression de PU.1 diminue au cours du stade DN2b, une sous population DN2 dont le niveau de c-kit est intermédiaire. Au cours du stade DN3, PU.1 n'est plus exprimé (193). La surexpression de PU.1 chez la souris, conduit au blocage du développement précoce au cours du stade DN2. L'analyse des cellules DN1 et DN2 démontre qu'il s'agit de cellules différenciées en cellules CD11c<sup>+</sup> caractéristiques des cellules dendritiques (207, 208). La répression de l'expression de PU.1 est donc indispensable dans l'acquisition du lignage T. L'expression de PU.1 pourrait être réprimée par le facteur de transcription BCL11b (209). De manière intéressante, la déficience en BCL11b entraîne l'augmentation d'expression de PU.1. Le gène *bcl11b* est régulé positivement par TCF-1 lui-même induit par la signalisation NOTCH (210). La déficience en BCL11b conduit à un phénotype similaire à celui observé dans le cas de surexpression de PU.1 (211). Par ailleurs, la signalisation NOTCH conduit à la mise en jeu d'autres facteurs de transcription essentiels à

l'établissement du lignage T comme GATA-3. GATA-3 est important lors du développement précoce des LT car il réprime la différenciation en LB et en NK (212, 213) (Fig. 10).

### **III. La $\beta$ -sélection : l'étape initiale dans l'élaboration d'un répertoire T**

Une fois dans la zone subcapsulaire du thymus, les cellules perdent l'expression de CD44 et constituent la population DN3 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>). Les cellules DN3a caractérisent la population DN3 pré- $\beta$ -sélection. Celles-ci arrêtent de proliférer puis réarrangent les gènes codant pour la chaîne  $\beta$  du TCR qui s'associe à une chaîne  $\alpha$  invariante pT $\alpha$ . Le bon arrangement de la chaîne  $\beta$  du TCR ainsi que son association avec le pT $\alpha$ , déclenche des signaux intracellulaires entraînant l'expression de protéines, favorisant la survie cellulaire et induisant la prolifération des cellules DN3b, post- $\beta$ -sélection. La prolifération des cellules conduit à l'expansion des cellules exprimant une chaîne  $\beta$  du TCR fonctionnelle, c'est-à-dire capable d'adopter une conformation favorable à la signalisation. La prolifération s'accompagne de la perte d'expression de CD25 caractéristique de la population DN4 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>).

#### **1. Expression du pre-TCR**

##### **1.1. Déclenchement de la recombinaison du TCR $\beta$**

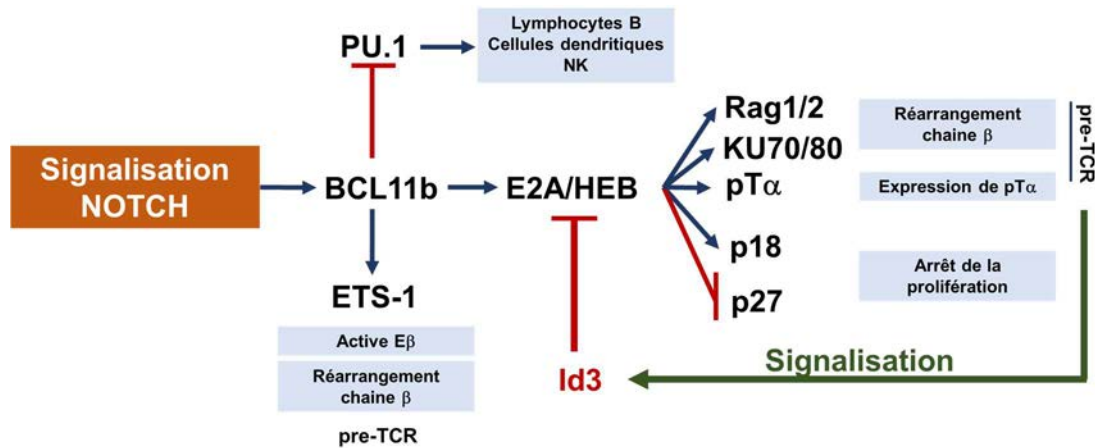
Les cellules DN1 et DN2 réalisent de nombreux cycles de prolifération dans le thymus mais cette prolifération cesse au début du stade DN3 avant le réarrangement de la chaîne  $\beta$  du TCR. Les facteurs de transcription E2A et HEB sont nécessaires à l'arrêt des cycles prolifératifs. En effet, la déficience en E2A et HEB dans un modèle LCK<sup>Cre</sup> conduit à un blocage majeur du développement des LT entre les stades DN et DP. De manière intéressante, la déficience pour ces protéines n'entraîne pas l'accumulation d'une sous population particulière de cellules doubles négatives. La prolifération des cellules DN3 est néanmoins augmentée en absence de ces protéines lors de l'analyse de la dilution du BrdU. E2A et HEB favorise l'expression de la protéine p18 et la répression de la protéine p27. La déficience en p18, conduit à l'augmentation de la prolifération des cellules DN. Contrairement à la déficience en E2A et HEB (214), la déficience en p18 ne bloque pas le développement des LT (215). La surexpression de p27, en revanche, entraîne un blocage de la transition DN-DP (216). Ces données suggèrent que l'expression de E2A et HEB, induit par la signalisation NOTCH, conduit à la répression de p27 et à l'expression de p18. Ces deux

protéines régulent l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire avant le réarrangement de la chaîne  $\beta$  du TCR.

L'expression des sous unités du complexe RAG au cours des stades précoces du développement des LT est indispensable pour déclencher le réarrangement de la chaîne  $\beta$  du TCR. La déficience en RAG compromet fortement le développement des LT qui sont bloqués au stade DN3 par défaut d'expression du pre-TCR (217, 218). L'expression de RAG débute au cours du stade DN2 (28) et pourrait être une des conséquences de la diminution d'expression de PU.1. La surexpression de PU.1 conduit à la diminution d'expression de RAG1. L'effet de PU.1 sur RAG est atténué suite à la stimulation des cellules par un ligand DLL. Ces résultats suggèrent que la signalisation NOTCH peut favoriser l'expression des sous unités de RAG en diminuant l'expression ou en dominant l'activité de PU.1 (204, 219). Chez la souris la déficience en BCL11b ne s'accompagne pas de la diminution d'expression de RAG1 (211) au contraire de chez l'homme (220). La diminution d'expression de PU.1 favorise l'expression du facteur de transcription c-myb qui se fixe sur le promoteur du gène codant RAG et régule positivement son expression.

L'expression des autres protéines impliquées dans la recombinaison est aussi finement régulée. Par exemple, les expressions de l'ADN ligase XRCC4, Artemis et KU70/80 sont régulées par le facteur de transcription GABP $\alpha$  (221). La déficience en GABP $\alpha$  conduit à un blocage au cours des stades précoces du développement des LT similaire à la déficience en Artemis, XRCC4, KU80 et KU70 (222-224).

La signalisation NOTCH conduit à l'expression de BCL11b qui active l'expression du gène *ets-1* (211, 225-227). ETS-1 s'associe à Runx et se fixe sur le promoteur E $\beta$  entraînant son activation (228-230). Le recrutement de ETS-1 et Runx sur la séquence E $\beta$  favorise la recombinaison de la chaîne  $\beta$  du TCR. La recombinaison ordonnée de la chaîne  $\beta$  du TCR peut être régulée par le complexe c-fos permettant le recrutement des protéines RAG aux séquences RSS. Le domaine d'interaction de la sous-unité AP-1 de c-fos se trouve dans la région 3'RSS de D $\beta$  favorisant la recombinaison D $\beta$ -J $\beta$  et bloquant la recombinaison V $\beta$ -D $\beta$  et V $\beta$ -J $\beta$  (231) (Fig. 10).



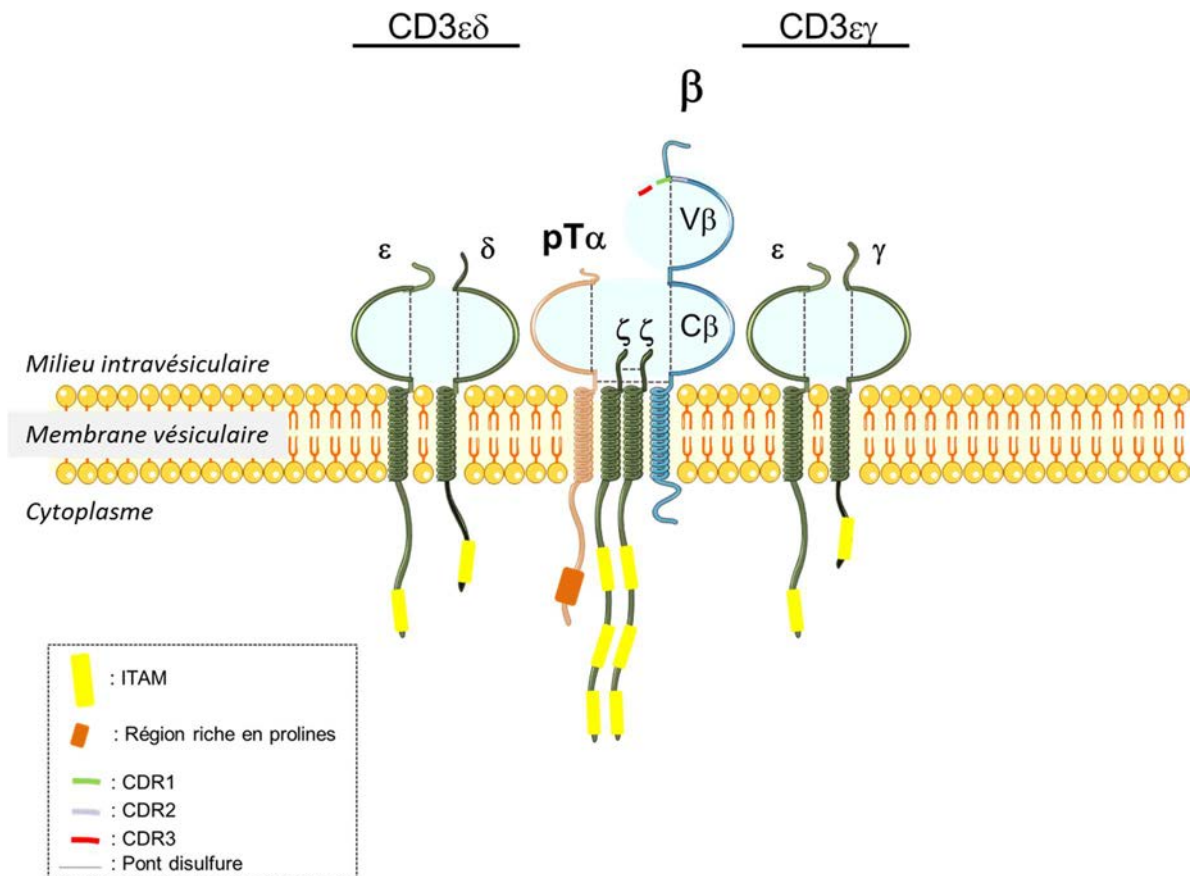
**Figure 10 :** Principales inductions médiées par la signalisation NOTCH

La signalisation NOTCH induite par les cellules stromales thymiques entraîne l'expression de BCL11b. BCL11b réprimerait l'action de PU.1 qui favorise la différenciation des cellules en LB, cellules dendritiques et NK. BCL11b conduit à l'expression de E2A/HEB qui favorise l'arrêt de la prolifération en réprimant p27 et en induisant l'expression de p18. E2A/HEB conduit aussi à l'expression de la machinerie de recombinaison V(D)J et à la chaîne pT $\alpha$ . Enfin, BCL11b induit l'expression de ETS-1 qui se complexe à Runx et favorise le réarrangement de la chaîne b en activant la région enhancer E $\beta$ . Suite à l'expression du pre-TCR, la signalisation entraîne l'expression de Id3 qui réprime E2A/HEB conduisant à la prolifération et à l'exclusion allélique.

## 1.2. Expression de la chaîne pT $\alpha$

Au cours des stades doubles négatifs, la chaîne  $\alpha$  du TCR n'est pas exprimée. L'expression d'une chaîne  $\alpha$  invariante pT $\alpha$  au cours du stade DN2b est essentielle au développement des LT. Les souris déficientes pour le gène *ptcra* codant la chaîne pT $\alpha$  présentent un fort blocage de la transition DN à DP (232). L'expression de la chaîne pT $\alpha$  dépend des facteurs de transcription HEB et E2A qui sont exprimés suite à la signalisation NOTCH et à la diminution d'expression de PU.1 (219, 233, 234). La déficience en BCL11b conduit à la forte diminution d'expression de la chaîne pT $\alpha$  comme le démontrent des données de RT-PCR quantitatives chez l'homme (220) (Fig. 10).

La structure de la chaîne pT $\alpha$  est particulière puisque contrairement à la chaîne  $\alpha$  du TCR, elle comporte une longue chaîne cytoplasmique contenant une région riche en proline. Par ailleurs, la chaîne extracellulaire est plus courte que la chaîne  $\alpha$  du TCR (235). Les résidus lysine et arginine dans le domaine transmembranaire sont conservés entre les chaînes pT $\alpha$  et  $\alpha$  et permettent l'association avec les CD3 et la chaîne  $\beta$  du TCR. L'association avec la chaîne  $\beta$  est aussi soutenue par un pont disulfure comme avec la chaîne  $\alpha$  (236) (Fig. 11).



**Figure 11 :** Représentation d'un récepteur pre-TCR

Représentation schématique d'un pre-TCR constitué de trois dimères de chaînes invariantes CD3 $\delta\epsilon$ , CD3 $\gamma\epsilon$  et  $\zeta\zeta$ , d'une chaîne invariante pT $\alpha$  et de la chaîne  $\beta$ . La région intracellulaire de la chaîne pT $\alpha$  présente une région riche en proline essentielle pour la signalisation du pre-TCR.

## 2. Signalisations issues du pre-TCR

Les chaînes pT $\alpha$  et  $\beta$ TCR sont associées aux dimères de CD3 au sein du réticulum endoplasmique. Les chaînes CD3 sont cruciales comme le montre le blocage de la transition DN-DP chez des souris déficientes pour certains CD3 (237). La signalisation issue des pré-TCR est similaire à la signalisation des TCR. Elle implique la protéine LCK qui déclenche la signalisation. La déficience en LCK entraîne un blocage du développement des LT au stade DN3 (238-240). La déficience en LAT conduit au même phénotype (241, 242). La déficience en ZAP-70 n'affecte pas dramatiquement le développement T sauf lorsqu'elle est associée à la délétion en SYK une protéine kinase appartenant à la même famille moléculaire que ZAP-70. Ces résultats démontrent que les cibles de LCK : ZAP-70 et SYK sont essentielles



à la signalisation du pre-TCR (243). La déficience en Grb2 ne bloque pas les cellules au stade DN (244). Il est fortement possible que la perte de Grb2 soit compensée par d'autres protéines de signalisation comme Vav1 ou SLP-76. D'ailleurs, la déficience en Vav1 conduit à l'augmentation de la proportion de cellules DN et particulièrement DN3. Cette augmentation est plus importante lors des délétions concomitantes de Vav1, Vav2 et Vav3 (245). Des résultats similaires ont été observés dans le cas de la déficience en SLP-76 (246). La signalisation du pre-TCR est donc essentielle dans la progression des cellules DN en DP (247, 248).

### 2.1. Déclenchement de la signalisation du pre-TCR

La signalisation des pre-TCR, contrairement à celle des TCR, ne nécessite pas la fixation d'un ligand. En effet, la délétion de l'ensemble des régions extracellulaires du pre-TCR n'empêche pas le progression des cellules vers le stade tardif du développement des LT (249). De façon surprenante, la délétion seule de la région extracellulaire de pT $\alpha$ , de la chaîne  $\beta$  ou de résidus impliqués dans l'oligomérisation des deux chaînes affectent le développement des thymocytes précoces (249, 250). Il est donc possible que la région extracellulaire du pT $\alpha$  permette de stabiliser la chaîne  $\beta$  du TCR dans une conformation favorable à la signalisation. C'est la bonne association de la chaîne  $\beta$  avec le pT $\alpha$  qui conduit à la signalisation des pre-TCR. Cependant, de récentes études suggèrent que le CMH, exprimé par les cellules stromales thymiques, pourrait être impliqué dans la signalisation des pre-TCR. Des expériences de spectroscopie RMN révèlent que le pre-TCR est capable d'interagir avec le CMH qui induit des réarrangements structuraux du pre-TCR. Par ailleurs, la culture de DN3 sur une lignée de cellules stromales OP9 déficientes en  $\beta$ 2m, une sous unité du CMH-I, conduit à une diminution non négligeable de la prolifération des cellules (251, 252).

### 2.2. Fonctions de la chaîne pT $\alpha$ dans la signalisation

La délétion de la région riche en proline située sur le domaine intracytoplasmique de la chaîne pT $\alpha$  entraîne un phénotype similaire à celui obtenu dans les souris déficientes en pT $\alpha$  avec une accumulation des cellules au stade DN. Ceci s'accompagne d'une diminution de la prolifération des cellules exprimant le chaîne  $\beta$  du TCR et une augmentation de l'apoptose (248). Dans une lignée de LT humain, la délétion de cette région riche en proline entraîne l'effondrement de flux calcique. Cette région permettrait le recrutement des adaptateurs

moléculaires CMS et CIN85. Ces résultats suggèrent que la région riche en proline de la chaîne pT $\alpha$  est impliquée dans la signalisation de la  $\beta$ -sélection (253). Le pre-TCR est constamment internalisé par endocytose et s'accumule dans les lysosomes comme le démontrent des analyses d'imagerie (254). La transfection de constructions conduisant à l'expression de CD25 ou CD4 fusionnés à la chaîne intracellulaire de pT $\alpha$  entraîne l'augmentation de CD4 et CD25 intracytoplasmiques démontrant la fonction de la chaîne intracellulaire de pT $\alpha$  dans l'endocytose du pre-TCR (255). L'adaptateur CMS colocalise avec le cytosquelette d'actine au cours de l'endocytose du pT $\alpha$  (253). La signalisation induite par le pT $\alpha$  est responsable de l'endocytose permanente du pre-TCR. L'utilisation d'inhibiteurs de Src kinase comme LCK dans des cellules Jurkats transfectées par le pre-TCR restaure partiellement l'expression à la surface du pre-TCR. Le même résultat est obtenu lorsque les Jurkats exprimant un TCR chimère pour lequel la chaîne  $\alpha$  est fusionnée à la région cytoplasmique du pT $\alpha$  (256). Bien que le pre-TCR soit internalisé et soit localisé majoritairement dans les lysosomes, l'inhibition du protéasome conduit à une augmentation non négligeable de l'expression du pre-TCR. L'activation des Src déclenche l'ubiquitination du pre-TCR par c-Cbl pour favoriser sa dégradation (254).

La chaîne pT $\alpha$  semble avoir une fonction unique dans la signalisation du pre-TCR. En effet, son remplacement par une chaîne  $\alpha$  du TCR entraîne un défaut de la  $\beta$ -sélection (257, 258).

### 2.3. Signaux de survie

La signalisation du pre-TCR déclenche aussi l'expression du récepteur à l'IL-7 (IL7-R). La déficience pour ce récepteur entraîne l'apoptose des cellules après la  $\beta$ -sélection (259). L'interaction de l'IL-7 avec son récepteur entraîne l'activation des kinases Jak3 puis des facteurs de transcription STAT5. L'association de STAT5 et de NFAT déclenche l'expression du facteur anti-apoptotique BCL-2 important dans la survie des thymocytes doubles négatifs (260). La déficience en NFAT entraîne la diminution d'expression de BCL-2 et compromet fortement la survie cellulaire suite à la  $\beta$ -sélection (261). L'expression ectopique de BCL-2 dans des souris déficientes pour IL7-R restaure partiellement le développement précoce de LT. L'activation de STAT5, en plus d'induire l'expression de BCL-2, conduit à la répression de BCL-6. L'absence de BCL-6 dans des souris déficientes pour l'IL7-R favorise la prolifération et la survie des DN4 (262). La signalisation des pre-TCR entraîne aussi l'activation de la voie de NF- $\kappa$ b et l'expression de BCL-2A1. BCL-2A1 favorise la survie des cellules en inhibant la caspase-3. La transduction du gène *bcl2a1* dans des cellules

déficientes pour RAG restaure la survie des cellules (263). Des études démontrent que l'absence de signalisation par les pre-TCR conduit à l'expression de Bid et Bim suite à l'action de p53 et Foxo3. L'activation du pre-TCR entraîne l'activation des kinases Akt qui phosphoryle Foxo3 et prévient ainsi la transactivation du gène *bim*. La déficience en Bid ou Bim dans des souris n'exprimant pas de pre-TCR conduit à une augmentation de la survie des cellules DN (264). Par ailleurs, la déficience concomitante de Akt1, Akt2 et Akt3 entraîne le blocage de la transition DN à DP avec l'accumulation des cellules au stade DN3 et DN4 (265). La survie des cellules est aussi étroitement liée à la signalisation NOTCH induite entre les thymocytes et les cellules stromales. La survie des cellules déficientes pour RAG est supérieure lorsque celles-ci sont en culture sur des cellules OP9 exprimant le ligand DLL-4. La signalisation NOTCH déclenche l'expression de facteurs importants dans le remaniement métabolique essentiel à la survie et la prolifération (266) (Fig. 12).

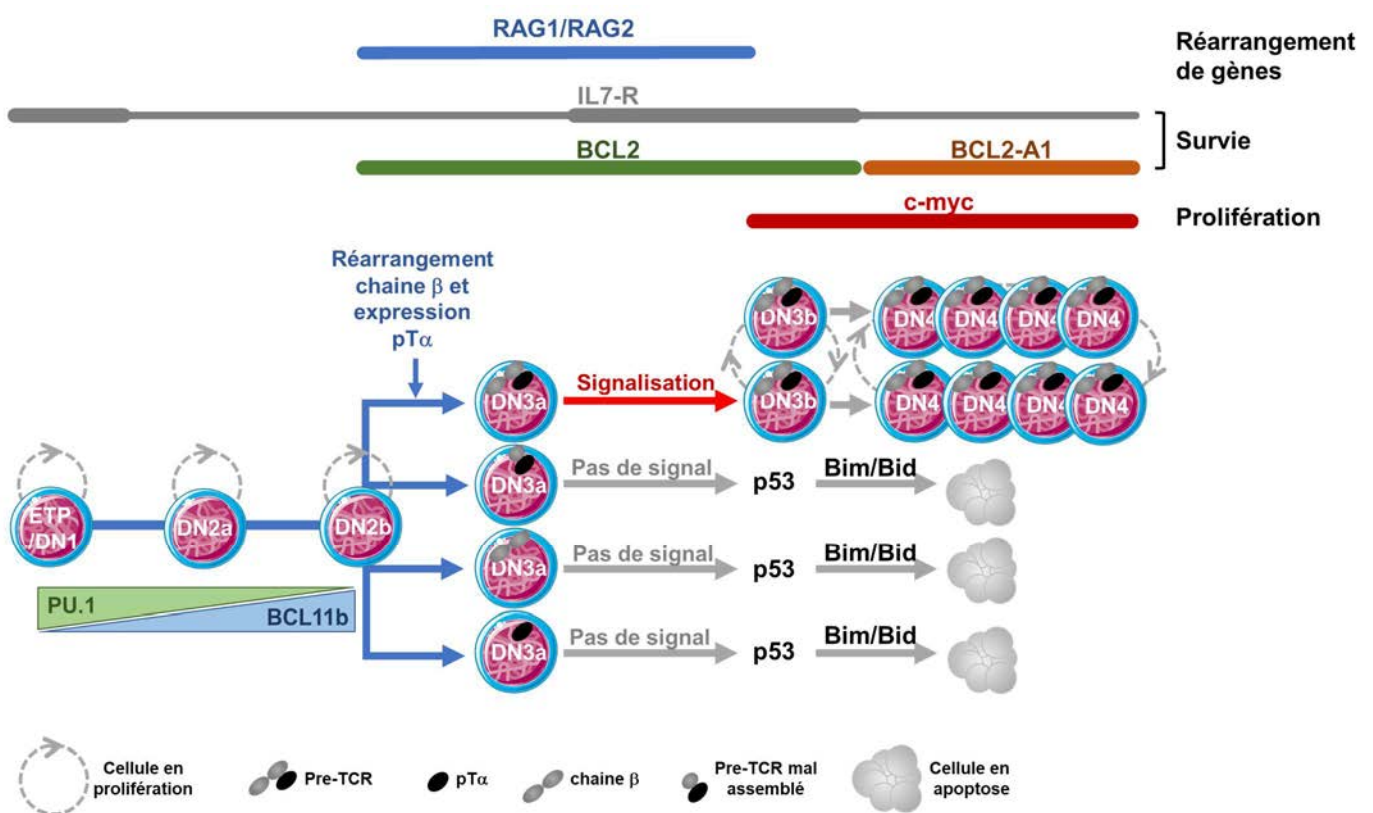
#### 2.4. Induction de la prolifération cellulaire

La signalisation du pre-TCR conduit à l'expression du récepteur à la transferrine CD71. Ce récepteur est important car il contribue aux événements métaboliques essentiels à la prolifération cellulaire. Le traitement de cellules en culture par un anticorps anti-CD71 réduit fortement la capacité des cellules à atteindre le stade DP (267). De plus, la signalisation du pre-TCR conduit à la phosphorylation de ShcA qui entraîne l'expression du facteur de transcription Egr, un activateur du facteur de transcription Id3. L'activation de ce dernier inhibe les fonctions répressives de E2A et HEB sur la prolifération des cellules (268) (Fig. 10). L'activation de ShcA favorise aussi l'expression de c-myc, un oncogène se fixant à de nombreux promoteurs, régulant l'expression de gènes essentiels à la duplication de l'ADN. c-myc est donc une protéine essentielle à l'entrée des cellules en phase S, la phase de réplication de l'ADN (269, 270) (Fig. 12). L'expression de c-myc dans des cellules déficientes en RAG restaure la prolifération des DN3 mais n'entraîne pas la différenciation des cellules en DP. L'expression de c-myc est régulée positivement par la signalisation NOTCH, qui induit de cette façon la prolifération des cellules après la  $\beta$ -sélection (271). Une publication récente démontre que la prolifération des DN3 n'est pas symétrique. La division asymétrique des DN3 conduirait à la formation de DN3b (DN3 ayant passé la  $\beta$ -sélection) tout en conservant des cellules ayant les caractéristiques DN3a. Le défaut de Scribble, une protéine impliquée dans la polarisation cellulaire, conduit à l'augmentation de la proportion de cellules DN4 suite à la diminution de l'asymétrie des divisions. Les auteurs proposent que les divisions asymétriques permettent aux cellules d'acquérir des caractéristiques différentes leur

permettant de progresser vers le stade DN4 ou de persister au sein du stade DN3. Certaines cellules recevraient une quantité importante de BCL-2A1 leur permettant de survivre et de progresser vers le stade DN4, d'autres auraient une quantité importante de BCL-2 permettant la survie au stade DN3 (272).

## 2.5. Exclusion allélique

Suite à la  $\beta$ -sélection, il est essentiel que le locus conduisant à l'expression de la chaîne  $\beta$  soit bloqué afin d'éviter la recombinaison de l'allèle non réarrangé. La signalisation du pre-TCR est essentielle pour le processus d'exclusion allélique. La déficience en LCK ou en SLP-76 affecte l'exclusion allélique de la chaîne  $\beta$  du TCR (238, 273).



**Figure 12 :** Représentation de la  $\beta$ -sélection

Au sein du thymus, les cellules ETP/DN1, DN2a et DN2b ont une forte capacité de prolifération. Au cours de ces stades, l'expression de PU.1 diminue en faveur de BCL11b entraînant alors l'acquisition du lignage lymphocytaire T définitif au stade DN2b. BCL11b conduit à la recombinaison de la chaîne  $\beta$  et à l'expression d'une chaîne invariante pT $\alpha$ . Si la recombinaison permet l'association de la chaîne  $\beta$  au pT $\alpha$ , alors le pre-TCR pourra émettre un signal conduisant à l'expression du facteur de survie BCL-2A1 et à l'expression de c-myc pour induire la prolifération des cellules.

#### **IV. Transition vers le stade double positif**

Le passage au stade double positif se caractérise par l'expression coordonnée des corécepteurs CD4 et CD8 et par l'expression de la chaîne  $\alpha$  du TCR qui fait suite à la dégradation de la chaîne pT $\alpha$ .

##### **1. Expression des corécepteurs CD4 et CD8**

Chez la souris, la  $\beta$ -sélection conduit à l'expression du corécepteur CD8 à un stade intermédiaire entre DN et DP appelé ISP (274). Chez l'homme, c'est le corécepteur CD4 qui est exprimé au stade ISP (275). Chez la souris, l'analyse de l'accessibilité des gènes révèle que les gènes *cd8* deviennent accessibles à partir du stade DN3, après la  $\beta$ -sélection (276). L'expression de CD8 est maintenue sous silence par le facteur de transcription MAZR au cours des stades DN mais Ikaros favorise l'expression de CD8 en induisant l'accessibilité aux gènes (276-278). Ce n'est qu'après le stade ISP que se fait la co-expression de CD4 et CD8. Tout comme les cellules doubles négatives, les cellules ISP réalisent de nombreux cycles de prolifération. La signalisation NOTCH est importante dans la prolifération des ISP mais n'est pas plus mise en jeu au cours des stades ultérieurs du développement (274). Chez la souris, Mi-2 $\beta$  est recrutée à la région enhancer du gène *cd4* et conduit au recrutement d'une histone acétyltransférase catalysant l'hyperacétylation du gène *cd4*. Cette hyperacétylation favorise l'expression de CD4. La déficience en Mi-2 $\beta$  conduit au blocage du développement au stade ISP (279).

##### **2. Déclenchement de la recombinaison de la chaîne $\alpha$ du TCR**

Comme pour les réarrangements de la chaîne  $\beta$  du TCR, les réarrangements de la chaîne  $\alpha$  nécessitent la mise en jeu des RAG et de la machinerie de réparation de l'ADN. La signalisation du pre-TCR déclenche la recombinaison de la chaîne  $\alpha$  du TCR en activant la région enhancer  $E\alpha$ . En effet, le traitement avec la ionomycine, un inducteur de flux calcique, entraîne l'augmentation de la transcription de *tcr $\alpha$*  dans des lignées cellulaires correspondant à DN3a. Par ailleurs, le traitement des cellules avec un inhibiteur de la voie des MAPK bloque l'expression du *tcr $\alpha$*  après stimulation (280). L'expression du pre-TCR conduit à l'expression des facteurs de transcription Erg1, Erg2 et Erg3 qui se fixent avec NFAT et AP-1 sur la région enhancer  $E\alpha$  pour déclencher la recombinaison  $V\alpha$ - $J\alpha$  (280). Ikaros est aussi important dans le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  du TCR. La lignée de thymome murine JE131 déficiente

pour *ikaros* présente un phénotype DN3 qui exprime le pre-TCR mais qui est incapable de réarranger les gènes codant pour la chaîne  $\alpha$ . L'expression d'Ikaros dans cette lignée restaure l'expression normale de la chaîne  $\alpha$ . La fixation d'Ikaros au complexe SWI/SNF au niveau de la séquence  $E\alpha$  favorise la recombinaison  $V\alpha-J\alpha$  en inhibant l'action répressive de Mi-2 $\beta$  (281). La signalisation du pre-TCR entraîne la diminution d'expression des RAG. Or le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  nécessite l'expression du complexe RAG et est dépendant de la signalisation du pre-TCR. Des mécanismes complexes de régulation sont probablement mis en place dans la transition entre le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  et de la chaîne  $\beta$  (30). Comme pour le pre-TCR, la signalisation déclenchée par les TCR conduit à l'exclusion allélique de l'allèle non réarrangé. Elle entraîne aussi l'arrêt d'expression des RAG et des modifications épigénétiques qui empêchent la recombinaison d'avoir lieu (282).

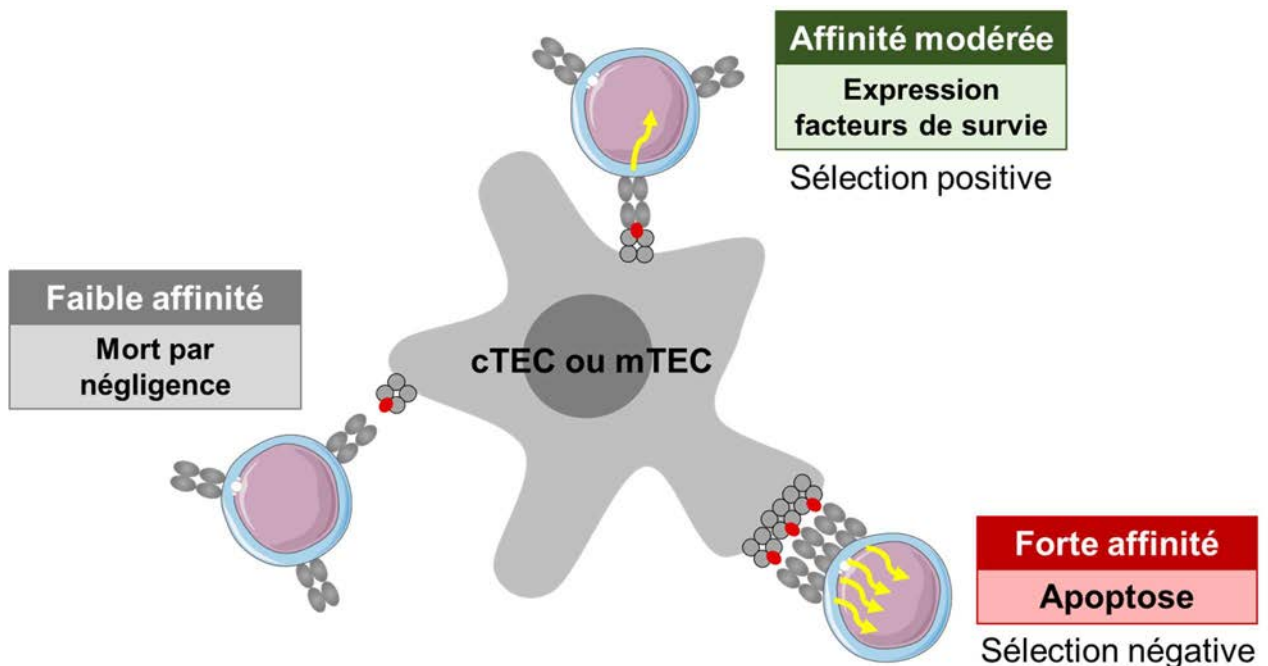
### 3. Du pré-TCR au TCR

Selon Trop et al, l'expression de la chaîne  $\alpha$  du TCR ne nécessite pas la dégradation ou l'absence d'expression du pT $\alpha$ . En effet, la chaîne  $\alpha$  du TCR entre en compétition avec le pT $\alpha$  pour son expression à la membrane plasmique. La chaîne pT $\alpha$  n'est pas exprimée à la membrane plasmique lorsqu'elle est co-exprimée dans une lignée cellulaire avec la chaîne  $\alpha$ . Son expression est cependant détectée dans le cytoplasme (283). Par ailleurs, il a été démontré que Ikaros interfère avec le domaine intracellulaire de NOTCH NICD et bloque ainsi l'expression de la chaîne pT $\alpha$  (284).



## CHAPITRE II : LE DEVELOPPEMENT TARDIF DES LYMPHOCYTES T

Suite au réarrangement aléatoire de plusieurs gènes pour l'expression des chaînes variantes du TCR  $\alpha$  et  $\beta$ , un très grand nombre de TCR ( $\approx 10^{15}$ ) sont exprimés. Ces TCR ont des affinités diverses pour les antigènes du soi présentés dans le thymus par les CPA. Chaque cellule exprime un groupe de TCR ayant la même spécificité antigénique qui peut être dirigé contre le soi ou le non-soi. Une grande partie de ces TCR ne sont pas fonctionnels, c'est-à-dire qu'ils ont une affinité insuffisante pour les complexes pCMH du soi. Il existe donc un processus de sélection positive permettant de sélectionner les LT exprimant un TCR efficace. Les LT exprimant des TCR ayant une affinité trop forte pour les antigènes du soi sont susceptibles d'induire des maladies auto-immunes. Un mécanisme de sélection négative est donc mis en place afin d'éliminer les LT exprimant des TCR auto-réactifs. Suite à ces événements de sélection, il a été estimé que moins de 5% des thymocytes DP deviendront des LT matures (285) (Fig. 13).



**Figure 13 :** Sélection positive et négative des thymocytes

Au sein du cortex thymique, la reconnaissance d'un complexe pCMH est essentielle dans la survie des cellules. Une signalisation trop faible due à une affinité trop faible du TCR pour le pCMH conduit à la mort des cellules par négligence. Une affinité trop forte conduit à des signaux trop importants et entraîne l'expression de facteur apoptotique favorisant la mort par apoptose des cellules. Seules persistent les thymocytes ayant une affinité modérée favorable à l'expression de marqueurs de survie. Au sein de la médulla thymique, l'affinité trop forte des cellules pour un antigène du « soi » entraîne la mort des cellules par apoptose.



## **I. Les sélections clonales au sein du cortex thymique**

Les thymocytes DP expriment les récepteurs aux chimiokines CCR9 et CXCR4 pour induire leur chimiotactisme vers le cortex thymique. Les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) sécrètent les chimiokines CCL25 et CXCL12 spécifiques des récepteurs exprimés par les cellules DP. Au sein du cortex, les cTEC apprêtent sur les CMH-I et CMH-II des antigènes ubiquitaires du soi, provenant de la dégradation courante de protéines exprimées par les cTEC (195). Les TCR exprimés par les thymocytes interagissent ou non avec les CMH chargés selon l'efficacité des réarrangements génétiques produits. L'absence d'interaction ou une interaction trop forte conduit à l'apoptose des cellules. L'affinité intermédiaire conduit à des signaux modérés favorables à l'expression et à l'activité de facteurs anti-apoptotiques (Fig. 15).

### **1. Présentation de peptides par les cTEC**

Dans les cTEC, la dégradation de protéines conduit à l'apprêtement des peptides issus de cette dégradation aux CMH par des voies spécifiques. Les peptides issus de la dégradation des protéines par le thymoprotéasome passe dans le réticulum endoplasmique par le transporteur TAP et sont apprêtés aux CMH-I. Les CMH-I sont par la suite dirigés vers la membrane plasmique pour la présentation des peptides aux thymocytes exprimant un TCR restreint au CMH-I (286). La déficience en  $\beta 5t$ , une sous unité spécifique du thymoprotéasome, conduit à la diminution des CD8 SP alors que le nombre de CD4 SP n'est pas affecté. Ceci s'accompagne d'une forte diminution des LT CD8<sup>+</sup> périphériques sans impact sur les LT CD4<sup>+</sup> (287). La sélection positive des thymocytes CD8 SP est fortement diminuée dans ces souris. Par ailleurs, les peptides issus de la dégradation de protéines par autophagie sont apprêtés au CMH-II au sein de vésicule. Le CMH-II est exprimé dans le réticulum endoplasmique et associé à un peptide invariant li lui permettant de rejoindre les vésicules endocytiques ayant fusionné avec les phagolysosomes. Les CMH-II sont ensuite dirigés vers la membrane plasmique pour la présentation des peptides aux thymocytes exprimant un TCR restreint au CMH-II (286). La déficience en cathepsin L ou en TSSP (Thymus-specific serine protease precursor), impliquées dans la dégradation de protéines au cours de l'autophagie, compromet la sélection positive des thymocytes CD4 SP (288, 289).

## **2. Signaux de survie induits par la sélection positive**

La signalisation induite par l'interaction entre le complexe pCMH et le TCR des thymocytes doubles positifs conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation qui ont été présentées dans l'introduction générale. Ces voies de signalisation régulent et déterminent la sélection positive et négative des LT en contrôlant sélectivement l'expression de facteurs de survie ou pro-apoptotiques. L'augmentation de l'expression de facteurs de survie BCL-2 ou BCL-XL protège les cellules de l'apoptose (290, 291). BCL-XL est important pour la survie des cellules DP avant qu'elles soient engagées dans les processus de sélection. La surexpression de BCL-XL conduit à l'augmentation du nombre de thymocytes. Par ailleurs, le traitement de souris transgéniques pour BCL-XL par un anti-CD3 bloque l'élimination des cellules qui est normalement induite dans les souris sauvages (292). La protéine BCL-2 est induite lors de la sélection positive par la signalisation du TCR (291, 293, 294). Suite à l'engagement du TCR, l'activation de la voie des Map kinases et calcique déclenche l'expression de Erg2. La déficience en Erg2 entraîne une diminution du développement des thymocytes en simples positifs. L'analyse de la survie cellulaire dans ce modèle, montre une diminution de la survie et une diminution d'expression de BCL-2 (295, 296). C-fos peut aussi être exprimée suite à l'activation des thymocytes DP et réguler d'une façon similaire l'expression de BCL-2 (297). Par ailleurs, l'engagement des TCR conduit à l'expression de Nur77 qui est corrélée à l'intensité des signaux transmis par les TCR. L'expression ectopique de Nur77 conduit à l'augmentation de l'apoptose des cellules doubles positives. La délétion concomitante de Nur77 et de Bim entraîne l'augmentation du nombre de cellules sélectionnées positivement (298). La force du signal qui est corrélée à l'affinité des TCR pour les pCMH du soi est donc importante pour déterminer les phénomènes de sélection.

## **3. Transition des stades DP à SP**

La sélection positive favorise l'expression de facteurs de transcription mis en place pour la transition de DP à SP. Cette transition se caractérise par la perte d'expression de CD4 ou de CD8. La reconnaissance du CMH-I par le TCR conduit à la différenciation des cellules DP en thymocytes CD8 SP alors que la reconnaissance du CMH-II entraîne le développement des cellules CD4 SP (Fig. 14).

### 3.1. Choix du lignage CD4 et CD8

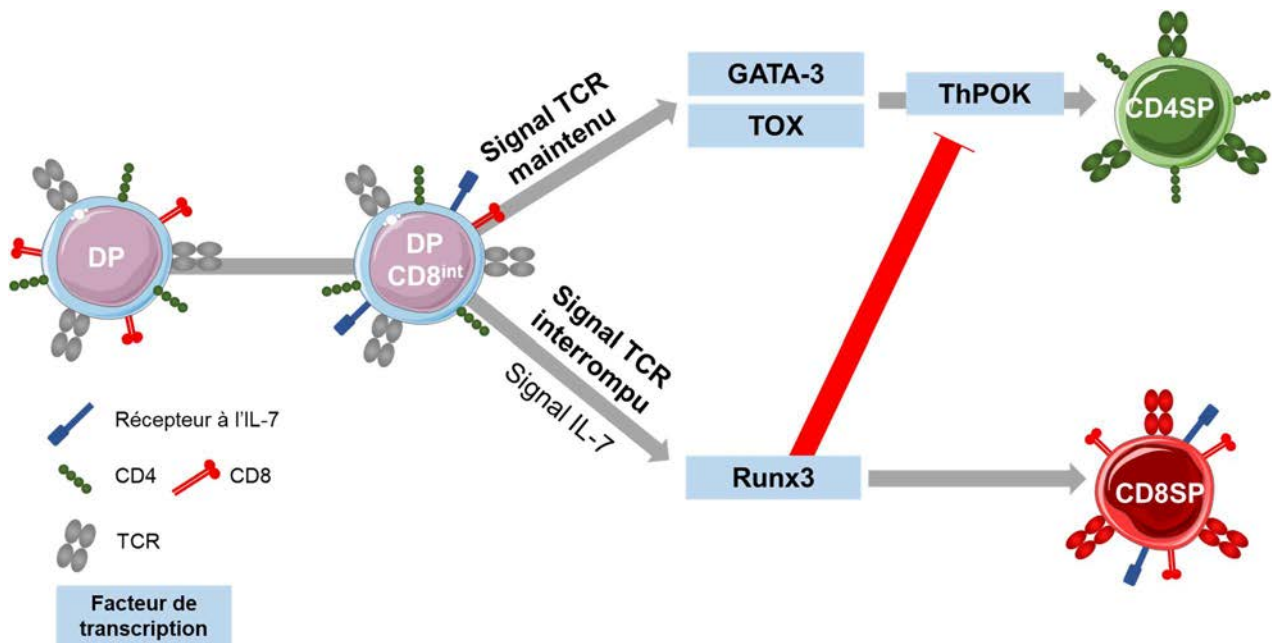
Différents modèles ont coexisté pour expliquer les mécanismes cellulaires conduisant à la différenciation des cellules en thymocytes CD4 SP et CD8 SP. Initialement, deux modèles dits « stochastique » et « instructif » ont été proposés. Le premier, stipulait que la reconnaissance du pCMH conduit à des signaux entraînant l'extinction aléatoire de l'expression du corécepteur CD4 ou du corécepteur CD8. Une seconde étape de signalisation se mettrait en place, au cours de laquelle, la co-expression du TCR et du corécepteur correspondant à un pCMH donné conduirait à des signaux de survie. Dans le cas contraire, la cellule mourrait par apoptose (299).

Un autre modèle est ensuite devenu prédominant dans la communauté scientifique. Ce modèle propose que la reconnaissance du complexe TCR-corécepteur avec le pCMH correspondant conduirait à des signaux spécifiques déterminant l'expression du corécepteur CD4 ou CD8. La signalisation issue du corécepteur CD4 entraînerait des signaux plus longs et/ou plus forts favorisant l'extinction d'expression des CD8. En revanche, la reconnaissance du TCR correspondant au CMH-I déclencherait des signaux plus brefs et/ou plus faibles favorisant l'extinction du CD4 (300). En faveur de ce modèle, l'atténuation du signal à l'aide d'un inhibiteur de la voie Erk après injection d'anticorps anti-CD3 couplés à anti-CD4, conduit à la différenciation de CD8 SP dans des souris déficientes pour  $\beta 2m$ , une sous unité du CMH-I (301). Par ailleurs, l'injection d'anticorps anti-CD3 couplés à anti-CD8 ou anti-CD4 entraîne la différenciation en CD4 SP dans un modèle déficient pour la chaîne invariante  $Ii$ , importante pour l'apprêtement des peptides au CMH-II (302). Un dernier modèle, appelé modèle cinétique, a plus récemment été proposé pour expliquer le mécanisme par lequel le choix de lignage s'effectue. Ce modèle propose que suite à la sélection positive, toutes les cellules éteindraient l'expression du corécepteur CD8. Les cellules passeraient donc par un stade intermédiaire,  $CD4^+ CD8^{int}$ , dans lequel l'expression du corécepteur CD8 est diminuée. Les signaux transmis dans les cellules exprimant un TCR restreint au CMH-II ne sont pas affectés par cette diminution car les corécepteurs CD4 sont toujours engagés. Dans ce cas, ces signaux entraînent l'extinction définitive du gène codant pour CD8 en réprimant la signalisation du récepteur à l'IL-7. En revanche, si le signal est interrompu par la diminution du CD8, l'IL-7 conduira à la réexpression du corécepteur CD8 et par conséquent à la différenciation des thymocytes DP en cellules CD8 SP (303). En faveur de ce modèle, la délétion hétérozygote de STAT5, un acteur de la signalisation du récepteur à l'IL-7, conduit à la diminution de la différenciation des cellules DP en CD8 SP (304). Par ailleurs, la mise

en culture de cellules CD4<sup>+</sup> CD8<sup>int</sup> sur des cellules stromales exprimant un CMH-I conduit à la différenciation de ces cellules en CD8 SP (305).

### 3.2. Acteurs mis en jeu dans la différenciation en CD4 ou CD8 SP

La signalisation transmise lors de la sélection positive, déclenche l'expression des facteurs de transcription c-myb et de TOX. c-myb induit l'expression de GATA3 alors que GATA3 et TOX entraînent l'expression de ThPOK. La déficience en c-myb conduit à la diminution de la différenciation des cellules DP en CD4 SP et une légère augmentation de la différenciation en CD8 SP (306). La reconstitution avec de la moelle osseuse mutée pour *gata3* dans des souris déficientes pour la sous unité  $\beta 2m$  du CMH-I conduit à la différenciation en CD8 SP au lieu d'en CD4 SP (307). De plus, la déficience en TOX dans un modèle de sélection positive AND conduit à la diminution critique de la différenciation en CD4 SP (308). La signalisation induite par le récepteur à l'IL-7 déclenche l'activation de Runx3. Runx3 se fixe sur le promoteur du gène *cd4* et réprime son expression en inhibant la fixation de ThPOK favorisant alors l'expression de CD8 (309, 310). De manière intéressante, l'expression de ThPOK est induite par des signaux persistants des TCR ce qui est en faveur du modèle cinétique (311). ThPOK peut favoriser l'expression de SOCS1 qui réprime la signalisation des cytokines. La diminution de la différenciation des DP en CD4 SP dans les souris déficientes pour ThPOK peut être restaurée par l'expression ectopique de SOCS1 (312). Par ailleurs, la surexpression de ThPOK dans un modèle de souris OT-I conduit à la différenciation des thymocytes en CD4 SP au lieu de CD8 SP (313).

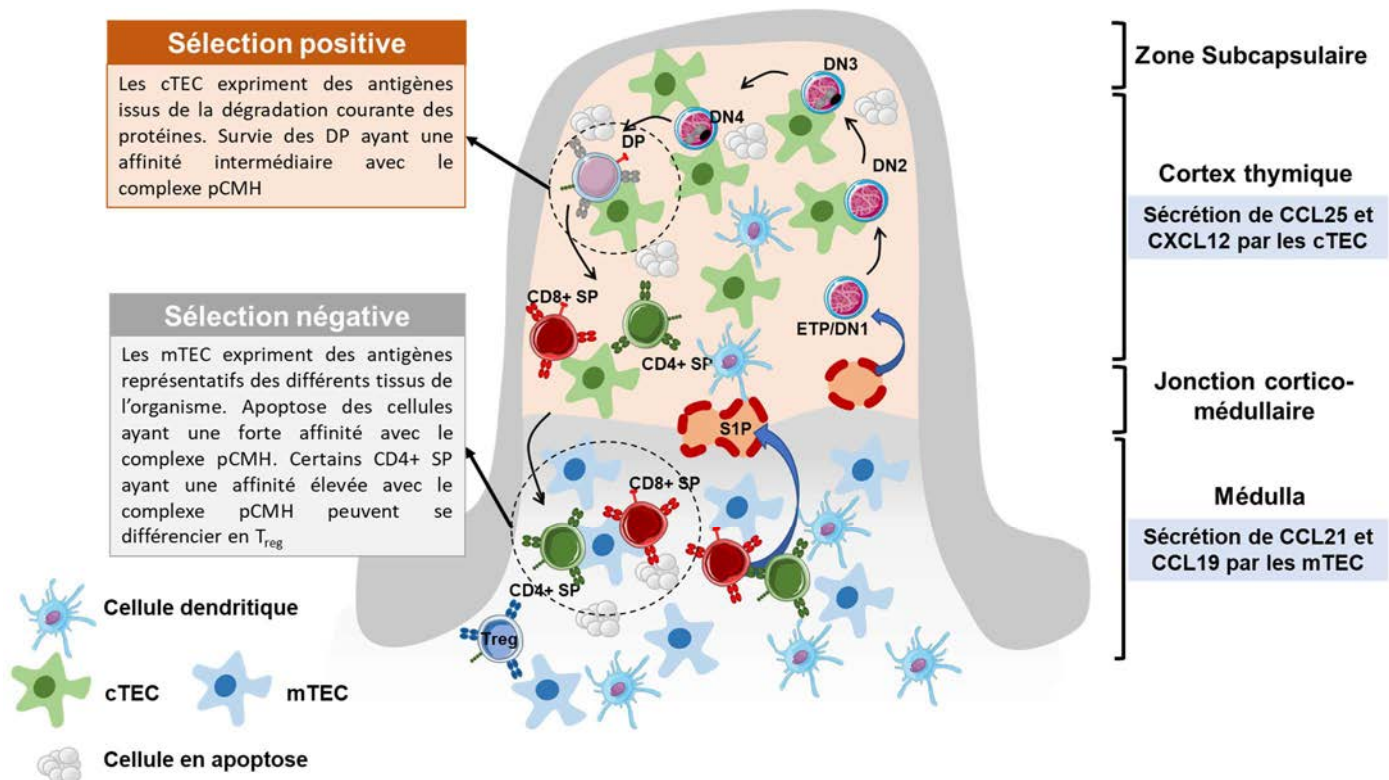


**Figure 14 :** Différenciation des cellules doubles positives en simples positives CD4 ou CD8

Au sein du cortex thymique, la reconnaissance d'un complexe pCMH par le TCR conduit à la sélection positive si le signal est modéré. Cette reconnaissance conduit à la diminution d'expression de CD8 et d'expression du récepteur de l'IL-7. Si le signal est persistant, alors les cellules expriment GATA-3 et TOX qui activent l'expression de ThPOK, qui entraîne l'expression de gènes spécifiques à la différenciation des CD4 SP. Dans le cas contraire, si le signal TCR est interrompu, le signal IL-7 conduit à l'expression de Runx3 qui réprime l'expression de ThPOK et induit l'expression de gènes pour la différenciation en CD8 SP. Adapté de « *CD8+ thymocyte differentiation: T cell two-step* » par Gascoigne 2010)

## II. La sélection négative au sein de la médulla

La signalisation induite par la sélection positive, conduit à l'expression de CCR7 qui entraîne le chimiotactisme des cellules vers la médulla dont les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) sécrètent CCL21 et CCL19 (314-317) (Fig. 15). Au sein de cette région, les mTEC présentent à leur surface des CMH associés à un panel de peptides du soi, appelés TRA, représentatifs des tissus de l'organisme. Cette expression est possible grâce aux facteurs de transcription spécifiques Aire et Fezf2 (318, 319). Les mTEC sont essentielles au développement des LT. De manière intéressante, les LT auto-réactifs régulent l'activité et le développement des mTEC. La forte affinité des TCR pour les complexes pCMH sur les mTEC entraînent des voies de signalisation bilatérales pouvant conduire à l'apoptose des LT et à la maturation des mTEC qui favorisent ce processus (320).



**Figure 15 :** Migration des cellules et évènements de sélection au sein du thymus

Les TSP entrent au sein du thymus sous forme ETP/DN1 par la jonction cortico-médullaire puis progressent vers le stade DN2 et DN3 jusqu'à atteindre la zone sub-capsulaire. Dans cette zone se déroule la  $\beta$ -sélection et les thymocytes prolifèrent. La différenciation en DN4 et ISP s'accompagne de l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR9 et CXCR4 leur permettant de rejoindre le cortex thymique sécrétant le CCL25 et CXCL12. Au sein du cortex thymique se déroule la sélection positive permettant la survie des thymocytes ayant une affinité suffisante avec le complexe pCMH. La sélection positive permet la survie des cellules. Suite à la signalisation, ces dernières expriment CCR7 leur permettant de migrer vers la médulla sécrétant CCL21 et CCL19. Au sein de la médulla se déroule la sélection négative suite à l'expression par les mTEC de peptides du « soi » spécifiques des tissus de l'organisme. L'affinité trop forte des TCR pour le pCMH conduit à l'apoptose des cellules par le mécanisme de sélection négative. Suite à la sélection négative les cellules persistantes expriment SP<sub>1</sub>R leur permettant de rejoindre la circulation sanguine. Adapté de « *Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration.* » par Love et Bhandoola 2015.

### 1. Expression des TRA (tissue-restricted antigens)

Les facteurs de transcription Aire et Fezf2 conduisent à l'expression de protéines exprimées par différents tissus de l'organisme. Suite à cette expression, les protéines seront dégradées et apprêtées au CMH des mTEC. La déficience en Aire chez l'Homme conduit au syndrome

polyendocrinopathie de type I (APS-1) aussi connu sous le nom APECED (auto-immune polyendocrinopathy-candidiasis–ectodermal-dystrophy/dysplasia) (321). Aire a été longuement étudié dans l'expression d'antigène du soi spécifique des tissus au sein de mTEC. Cependant, de nombreuses données suggèrent que Aire ne peut être le seul facteur de transcription conduisant à l'expression d'antigène du soi. En effet, alors qu'environ 20000 gènes sont exprimés par les mTEC, Aire ne contrôle l'expression que d'environ 4000 TRA (322). Fezf2 a été découvert comme étant un autre facteur de transcription impliqué dans l'expression et l'apprêtement d'antigènes du soi à la surface de mTEC. Tout comme la déficience en Aire, la perte de Fezf2 chez la souris, conduit à des symptômes auto-immuns (319).

Les mTEC sont essentielles à la tolérance centrale car elles expriment des TRA. Mais d'autres cellules présentatrices d'antigènes professionnelles entrent dans le thymus et jouent aussi un rôle dans ce processus. La déplétion des cellules dendritiques thymiques contribue au développement de réponses auto-immunes chez la souris. L'absence de cellules dendritiques au sein du thymus entraîne une augmentation du nombre de cellules CD4 SP montrant ainsi l'implication de ces cellules dans la sélection négative (323). Les cellules dendritiques peuvent conduire à la présentation de TRA provenant des mTEC par échange de matériels mais aussi à la présentation d'auto-antigènes non exprimés par les mTEC afin d'augmenter l'efficacité de la sélection négative. L'injection du peptide OVA issu de l'ovalbumine ou de cellules dendritiques chargées par ce peptide entraîne la sélection négative dans des souris exprimant le TCR OTII spécifique de ce peptide (324). L'entrée des cellules dendritiques et des macrophages au sein du thymus est régulée par les chimiokines CCL2 sécrétées par les mTEC. CCL2 est le ligand de CCR2 exprimé par les macrophages et les cellules dendritiques (325). Les mTEC peuvent sécréter CCL2 suite à la signalisation induite par leurs interactions avec les thymocytes. L'augmentation de macrophages et de cellules dendritiques au sein du thymus favorise l'augmentation de la sélection négative clonale et centrale conduisant à la diminution du nombre de DP et CD4 SP (326).

## **2. Régulation de la survie cellulaire par la force du signal**

La reconnaissance des peptides du soi par les thymocytes entraîne des signaux intenses et brefs déclenchant l'apoptose des cellules par activation des caspases par Bim. La signalisation induite par la reconnaissance d'un pCMH conduit à l'expression de Nur77, Trail et Bim. La sélection négative est défectueuse en absence de Nur77 dans un modèle de souris transgéniques pour le TCR OTII croisées avec des souris exprimant le peptide OVA

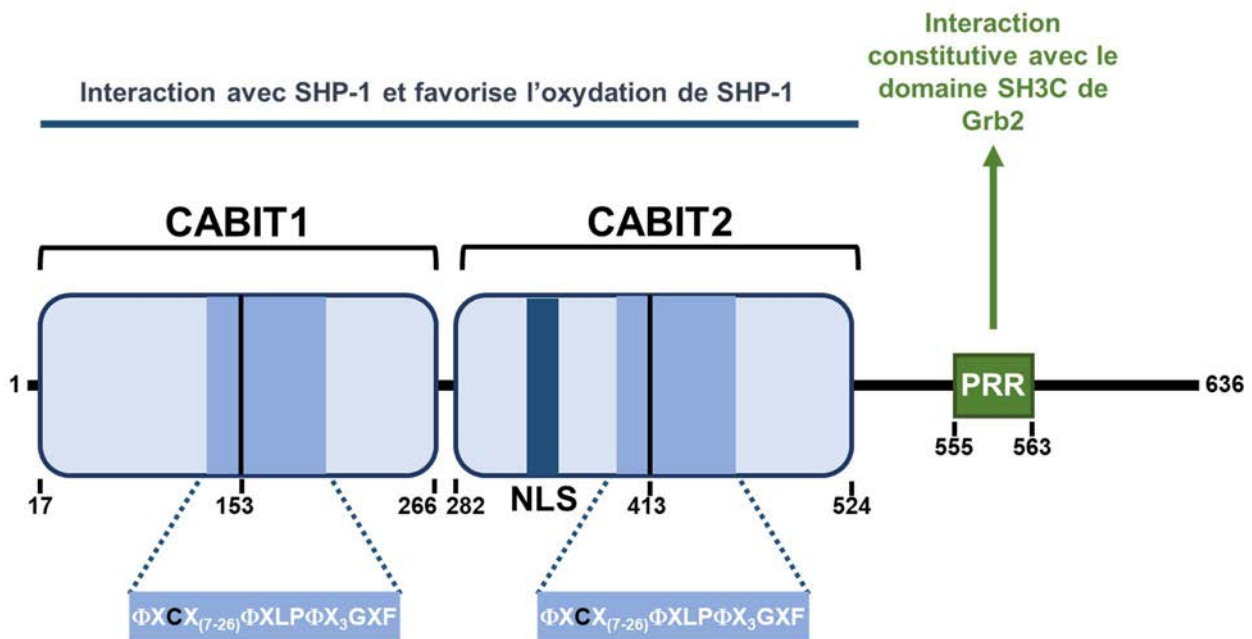
dans la médulla thymique (327). Les souris déficientes en Nur77 exprimant un TCR OTI et le peptide OVA dans la médulla thymique entraîne le développement d'un diabète auto-immun (328). Le même résultat a été obtenu dans un modèle similaire déficient pour Bim (329). Le facteur de transcription NCor1 protège les cellules de la sélection négative en réprimant l'expression de Bim. L'activation de la caspase 3 est fortement augmentée dans les cellules SP de souris déficientes pour Ncor1 et s'accompagne d'une diminution du nombre de thymocytes CD4 SP et CD8 SP (330).

L'intensité de la signalisation au sein de la médulla peut aussi déterminer la capacité des CD4 SP à se différencier en  $T_{reg}$  (331). La déficience en Aire ou Fezf2 conduit à la diminution de  $T_{reg}$  démontrant que la présentation des TRA et la signalisation des TCR résultant de la reconnaissance de ces peptides contribuent à la différenciation de ces cellules lorsqu'elles n'induisent pas l'apoptose (319, 332). La force du signal favorise la formation d'un précurseur de  $T_{reg}$  FoxP3<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>. La maturation de ce précurseur en  $T_{reg}$  nécessite les cytokines IL-2 et IL-15 exprimées par les cellules dendritiques et les mTEC respectivement. Ces cytokines entraînent l'activation de la voie Jak3-STAT5 favorisant l'expression de FoxP3 (333). Suite au processus de sélection négative dans la médulla, les thymocytes SP restants expriment le récepteur à Sphingosine-1-Phosphate (S1PR) leur permettant de rejoindre la circulation sanguine (334-336) (Fig. 15).

### III. THEMIS, une protéine importante dans les mécanismes de sélection

THEMIS (THymocytes-Expressed Molecule Involved in Selection) représente un groupe de protéines constitué de trois membres : THEMIS1 ; THEMIS2 et THEMIS3. Ces protéines sont constituées d'un domaine riche en proline (PRR) de 9 acides aminés située à l'extrémité C-terminale et de deux domaines CABIT de 260 acides aminés chacun. La structure cristallographique de ces domaines est inconnue mais des analyses bioinformatiques prédisent qu'ils sont constitués d'au moins douze feuillets  $\beta$  formant une structure en tonneau dans laquelle se trouve la cystéine conservée. Les domaines CABIT présentent une séquence consensus centrale de 24 acides aminés que l'on retrouve dans chaque domaine CABIT au sein de nombreuses espèces animales (337). Le CABIT2 contient une séquence de localisation nucléaire dont la fonction n'a pas encore été déterminée (338) (Fig. 16). THEMIS1 est exprimée dans les LT et les mastocytes, THEMIS2 est exprimée dans les LB et les macrophages et THEMIS3 est exprimée dans les cellules épithéliales de l'intestin. La fonction de THEMIS3 dans ces cellules est inconnue (337-339).





**Figure 16 :** Représentation de la protéine THEMIS1

Les protéines THEMIS sont au nombre de trois et présentent les mêmes domaines : deux domaines CABIT présentant une séquence consensus, dans laquelle se trouve une cystéine conservée, et un domaine riche en proline PRR. Le CABIT2 contient une séquence de translocation nucléaire. Le domaine PRR permet l'association constitutive de THEMIS1 avec Grb2. Les domaines CABIT1 et CABIT2 interagissent avec les protéines phosphatases SHP-1 et SHP2 et pourraient entraîner ou du moins favoriser l'oxydation de la cystéine catalytique des phosphatases SHP-1 et SHP-2.

### 1. Rôles physiologiques de THEMIS dans les lymphocytes T

THEMIS1 a été découverte par différentes approches par des groupes indépendants (337-340). L'analyse différentielle de gènes exprimés entre les précurseurs multipotents hématopoïétiques et les thymocytes doubles négatifs au stade DN3 ayant acquis le lignage T a révélé un gène inconnu exprimé fortement lors des étapes précoces du développement des LT (339). Ce gène E430004N04Rik a aussi été déterminé par l'analyse différentielle de gènes entre des thymocytes déficients pour RAG, bloqués au stade DN3 et des thymocytes déficients pour la chaîne  $\alpha$  du TCR, bloqués au stade DP (338). Par ailleurs, l'analyse d'une banque de souris traitées par l'agent mutagène ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) a mis en évidence une lignée ne répondant pas à des immunisations et pour laquelle la survie des thymocytes est fortement altérée. L'analyse de gènes révèle la mutation de E430004N04Rik

se caractérisant par la substitution d'une base azotée conduisant au remplacement de la tyrosine Y<sup>489</sup> en codon stop. L'analyse prédictive suggère la formation d'une protéine tronquée à la fin du deuxième domaine globulaire CABIT (337, 340). La protéine issue de ce gène qui joue un rôle essentiel dans la sélection thymique a été nommée THEMIS signifiant « THymocytes-Expressed Molecule Involved in Selection ».

Le rôle de THEMIS1 dans le développement des LT a été extensivement étudié. L'analyse de souris déficientes pour THEMIS1 démontre un rôle important de cette protéine lors de la transition DP-SP. Ces souris présentent un nombre de thymocytes CD4 SP et CD8 SP diminué alors que le nombre de cellules DN et DP est normal (337-339). Le croisement de ces souris avec les modèles de sélection exprimant les TCR transgéniques HY et AND, démontre que THEMIS1 est essentielle à la sélection positive des thymocytes. La déficience en THEMIS1 réduit aussi l'efficacité de la sélection négative mais a un impact plus réduit sur celle-ci (337-339). En périphérie, THEMIS1 est importante dans la fonction des T<sub>reg</sub> (341, 342). Bien que la fonction suppressive des T<sub>reg</sub> ne soit pas affectée par la déficience en THEMIS1 chez le rat Lewis, elle est fortement impactée chez le rat BN. L'analyse génétique du rat Lewis et du rat BN révèle des polymorphismes affectant quatre gènes situés sur une région de 117kb sur le chromosome 9. Un de ces polymorphismes affecte le gène de la protéine de signalisation Vav1 et entraîne une mutation conduisant à la substitution d'un Arginine par un Tryptophane chez le rat BN. Cette mutation entraîne une forte diminution de l'expression de Vav1 et réduit sa fonction adaptatrice. Le défaut de fonction suppressive des Treg dans les rats BN déficients pour THEMIS1 entraîne une inflammation spontanée de l'intestin. En revanche, le remplacement de la région de 117kb du rat BN par la même région provenant du rat Lewis prévient le développement d'une maladie inflammatoire. Ces résultats montrent que THEMIS1 et Vav1 collaborent dans la fonction suppressive des T<sub>reg</sub> (342). Par ailleurs, la surexpression de THEMIS1 dans les T<sub>reg</sub> chez la souris conduit à l'augmentation de leur fonction suppressive (341). THEMIS1 est donc importante dans le développement des LT mais aussi dans la fonction des T<sub>reg</sub> périphériques. Les fonctions moléculaires de THEMIS2 et THEMIS1 semblent relativement conservées puisque l'expression de THEMIS2 dans des souris déficientes pour THEMIS1 restaure le développement des LT (343). Tout comme THEMIS1 dans les thymocytes, THEMIS2 est impliquée dans la sélection positive des LB en développement en modulant la signalisation en fonction de l'affinité BCR avec les antigènes (344).

## 2. Fonctions de THEMIS dans la signalisation des TCR

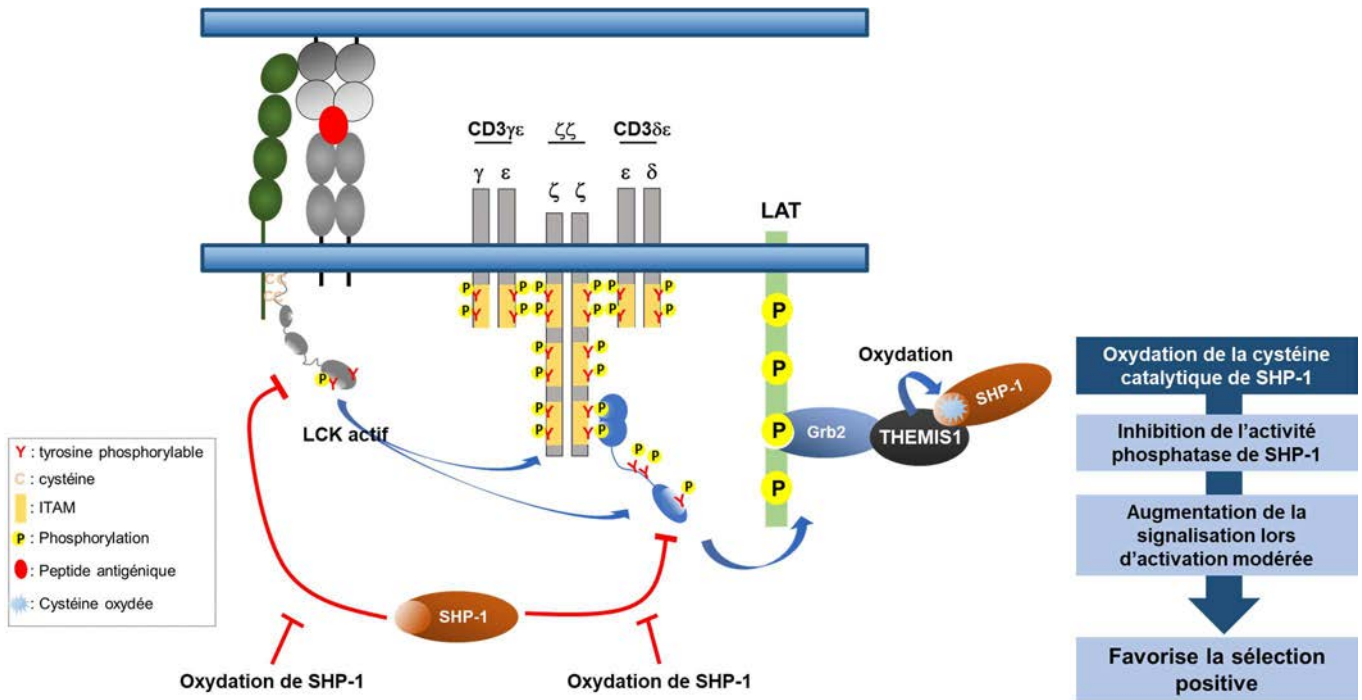
THEMIS1 est recrutée au sein des complexes de signalisation suite à l'engagement des TCR. La région riche en proline PRR interagit constitutivement avec la protéine adaptatrice Grb2 qui est recrutée à l'adaptateur LAT suite à sa phosphorylation par ZAP-70 (345). THEMIS1 est aussi un substrat de ZAP-70 et LCK qui peuvent, *in vitro*, conduire à la phosphorylation des tyrosine Y<sup>540</sup> et Y<sup>541</sup>. Cependant, la fonction de cette phosphorylation n'a pas encore été déterminée. L'interaction de THEMIS1 avec Grb2 est essentielle dans le développement des LT. En effet, la transduction de CSH déficientes pour THEMIS1 par un gène codant une forme de THEMIS1 privée de sa région PRR ne parvient pas à restaurer le développement des LT contrairement à la forme sauvage transduite de façon similaire (88). La fonction de THEMIS1 dans la signalisation est très controversée et deux modèles principaux ont été proposés.

### 2.1. THEMIS est un régulateur négatif de la signalisation

Une première étude, réalisée par le groupe de Nick Gascoigne, a montré que la déficience en THEMIS1 peut conduire à une augmentation de la phosphorylation de Erk (346). De manière intéressante, cette augmentation n'est mise en évidence que lorsque les TCR sont engagés par des ligands de relativement faible affinité. Le flux calcique est également augmenté dans les thymocytes THEMIS1<sup>-/-</sup> DP stimulés dans des conditions similaires. Cette étude montre que THEMIS1 interagit avec SHP-1 une phosphatase inhibitrice des signaux délivrés par les TCR. Le croisement des souris déficientes pour THEMIS1 avec des souris déficientes pour le facteur pro-apoptotique Bim restaure un nombre de thymocytes CD8 SP et CD4 SP comparable aux souris WT (346). L'hypothèse formulée par les auteurs de cette étude est que THEMIS1 atténue les signaux des TCR susceptibles de conduire à l'apoptose des cellules lors de la sélection positive. THEMIS1 agirait comme une protéine adaptatrice en recrutant SHP-1 dans les complexes de signalisation des TCR. Néanmoins notre équipe a montré, en utilisant les mêmes modèles murins, que la déficience en BIM ne restaure pas la maturation des thymocytes CD4SP et le nombre de LT CD4<sup>+</sup> périphériques dans les souris déficientes pour THEMIS1 (347)(Annexe1). De plus, la mutation de la cystéine catalytique de SHP-1 rendant la phosphatase inactive a plutôt un effet inverse à la déficience en THEMIS1, en favorisant la sélection positive (348). Un autre modèle moléculaire, présenté dans le paragraphe suivant, a été proposé pour expliquer la fonction de THEMIS1 au cours du développement des LT.

## 2.2. THEMIS est un régulateur positif de la signalisation

Plusieurs résultats suggèrent que THEMIS1 exerce aussi des fonctions stimulatrices dans la signalisation des TCR. L'expression de Nur77, une protéine dont l'expression est proportionnelle à la signalisation des TCR, est diminuée dans les thymocytes THEMIS<sup>-/-</sup> DP en cours de sélection positive. La surexpression de THEMIS1, au contraire, entraîne l'expression accrue de Nur77. THEMIS1 recrute la protéine Vav1, importante dans la signalisation des LT. La déficience en THEMIS1 réduit la phosphorylation de Vav1 dans des thymocytes stimulés par des doses variables d'anticorps anti-CD3 et diminue la production de Rac1<sup>GTP</sup> qui est dépendante de l'activité catalytique de Vav1. Par ailleurs, la stabilité de Grb2 qui contribue au recrutement de Vav1 à LAT est diminuée en absence de THEMIS1 comme le démontre l'augmentation de l'ubiquitination de Grb2 après stimulation des thymocytes (347)(Annexe1). Un travail réalisé par l'équipe de Paul Love auquel j'ai participé suggère que THEMIS1 agirait sur Vav1 en bloquant l'activité phosphatase de SHP-1. Des analyses *in vitro*, à l'aide de protéines recombinantes codant pour la forme entière de THEMIS1 ou une forme tronquée contenant uniquement les domaines CABIT, montre que THEMIS1 est capable d'inhiber l'activité phosphatase de SHP-1 en favorisant l'oxydation de son site catalytique. En faveur de ce modèle, nous avons montré que la déficience en SHP-1 dans les souris n'exprimant pas THEMIS1 restaure totalement le développement des thymocytes SP et le nombre de LT matures dans les organes lymphoïdes secondaires (349)(Annexe2) (Fig. 17).



**Figure 17 :** Modèle de la régulation positive de la signalisation

SHP-1 est un régulateur négatif de la signalisation qui déphosphoryle LCK et ZAP-70 par conséquent favorise la diminution de la signalisation. THEMIS1 recrute SHP-1 et conduit à l'oxydation de la cystéine catalytique. Cette oxydation inhibe l'activité phosphatase et favorise le soutien de la signalisation pour la sélection positive.

### 3. Régulation de THEMIS

#### 3.1. Régulation de son expression

L'analyse de l'expression du gène *themis* par RT—qPCR démontre une augmentation de l'expression de THEMIS1 lors du stade double positif précédant la sélection clonale (337, 338). THEMIS1 interagit avec la déubiquitine enzyme USP9X qui est recrutée par Grb2 au sein des complexes de signalisation suite à l'engagement du TCR. Nous avons démontré que l'engagement du TCR conduit à la diminution de l'ubiquitination de THEMIS1 et que cette diminution d'ubiquitination dépend de l'activité d'USP9X. La délétion d'USP9X, spécifiquement dans les LT par le modèle USP9X<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>, révèle l'augmentation de l'ubiquitination de THEMIS1 suite à l'engagement du TCR (350)(Annexe3).

### 3.2. Régulation de son activité et de sa localisation

Des analyses de spectrométrie de masse révèlent que THEMIS1 interagit avec plusieurs protéines dont les fonctions sur la signalisation des TCR sont bien connues. Ces analyses montrent également que l'un des partenaires principaux de THEMIS1 dans les thymocytes est une protéine impliquée dans régulation de la dynéine, un complexe moteur essentiel au transport de molécules et de structures cellulaires sur les microtubules. Il s'agit de la protéine Lis1 qui est l'objet central de mon travail de thèse (347)(Annexe1).



### CHAPITRE III : LIS1, UNE MOLECULE INDISPENSABLE DANS LA VIE CELLULAIRE

Les travaux d'Orly Reiner sur une maladie neurale sévère appelée lissencéphalie ont mis en évidence la perte du locus ou d'une partie du locus 17p13.3 sur le chromosome 17 humain. Cette perte de locus entraîne des délétions d'une partie ou de la totalité du gène *pafah1b1*. La protéine issue de ce gène fut ainsi appelée Lis1 pour lissencephaly-1. Cependant, comme ce locus contient d'autres gènes, il a fallu attendre des études génétiques plus approfondies chez la souris pour établir une relation fonctionnelle entre la lissencéphalie et la mutation de Lis1 (351).

Les fonctions cellulaires et moléculaires de Lis1 ont été initialement étudiées chez *Aspergillus nidulans*. Des mutants présentaient un défaut de division et de migration nucléaire à forte température. Ces études ont permis de déterminer une famille de 5 gènes appelés *nud* (nuclear distribution) dont la mutation affecte la redistribution du noyau dans le cytoplasme. Des analyses approfondies de ce groupe de gènes étaient à la source de l'hypothèse selon laquelle le gène *nudF* coderait une protéine de signalisation activant la voie de transport nucléaire médiée par la dynéine codée en partie par *nudA*. Des analyses d'alignement de séquences ont montré une identité de 42% et une similarité de 62% entre Lis1 et NudF, suggérant qu'il s'agissait des mêmes protéines (352). La relation entre Lis1 et la dynéine a été partiellement établie suite à l'étude des gènes *nud* dans *Aspergillus nidulans*. La migration cellulaire est rétablie dans les mutants présentant une mutation du gène *nudF* lorsque le gène *nudA* est surexprimé dans le modèle suggérant que la mutation de *nudF* affecte *nudA* (353).

Nous verrons dans cette partie que Lis1 est étroitement liée à la dynéine mais aussi à un autre complexe appelé PFAH-1B et par conséquent aux événements moléculaires et cellulaires associés à ces complexes.

#### I. Effets physiologiques associés à la perte ou au gain d'expression de Lis1

La variation d'expression de Lis1, qu'il s'agisse d'une perte ou d'un gain d'expression conduit à des effets neurologiques graves. Il s'agit, à ce jour, des conséquences physiologiques les plus décrites suite à un défaut d'expression de Lis1. En outre, la perte d'expression spontanée de Lis1 ou la présence de SNP au sein du gène pourraient aussi être à l'origine de développement tumoral.

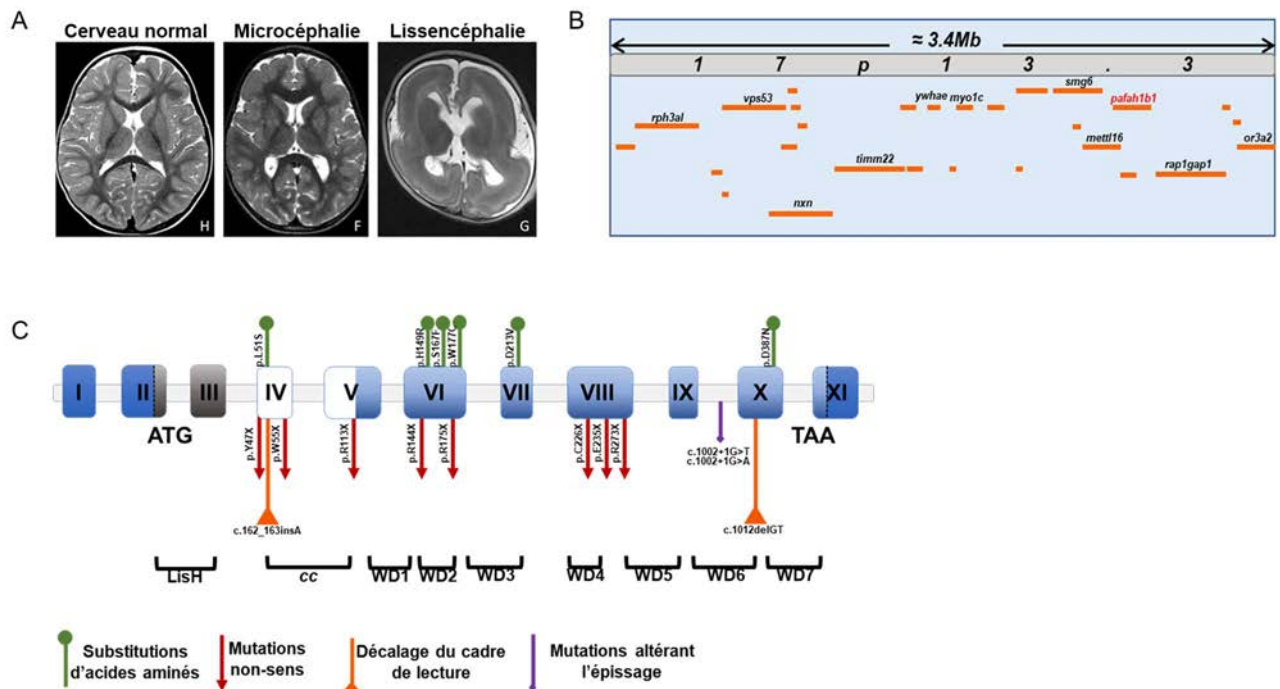


## 1. Conséquences neurologiques

Les conséquences neurologiques associées à des défauts d'expression de Lis1 peuvent être dues à différents types de mutation. En effet, il peut s'agir d'une perte hétérozygote de Lis1 parce que le gène est tronqué ou excisé, d'un gain de fonction par dérégulation de son expression et enfin de mutations ponctuelles sur le gène pouvant affecter la structure et la fonction de la protéine résultante (354-358).

Les lissencéphalies et microcéphalies sont des maladies neurologiques graves se caractérisant par la mauvaise organisation du cortex cérébral au cours du développement neural. Elle touche 1 nouveau-né sur 100000 et il n'existe pas de traitement curatif. Les enfants naissant avec ces maladies ont une espérance de vie d'environ dix ans dans les cas les plus graves. Les patients atteints de lissencéphalies présentent une texture lisse du cerveau, sans sillons cérébraux (agyrie). Dans le cas de microcéphalies, les sillons sont présents mais réduits (pachygyrie) (Fig. 18A). Le syndrome Miller-Dieker correspond à l'excision au niveau du locus 17p13.3 contenant le gène *pafah1b1* (359) (Fig. 18B). D'autres formes de lissencéphalies, ou microcéphalies, peuvent être dues à des mutations ponctuelles conduisant soit à la perte d'expression de *pafah1b1*, soit à l'expression d'une protéine tronquée ou inactive (360) (Fig. 18C). D'autres formes de lissencéphalies, plus rares, sont dues à l'expression exacerbée de *pafah1b1*. La taille du cerveau de ces patients est considérablement diminuée suggérant que l'expression de ce gène doit être précisément régulée (357).

Cependant, le gène *pafah1b1*, n'est pas seul responsable des cas de lissencéphalies et microcéphalies. En effet, ces maladies peuvent survenir par excision ou mutation d'autres gènes spécifiques comme *tubg1*, *dync1h1*, *kif5c* et *kif2a* (361).



**Figure 18 :** Lis1 dans la lissencéphalie

(A) IRM de patients sains, atteints de microcéphalie et de lissencéphalie. Adapté de « New insights into genotype–phenotype correlations for the doublecortin-related lissencephaly spectrum » par Bahi-Buisson et al., 2013. (B) Schématisation non à l'échelle du locus 17p13.3. Les gènes présentés ne représentent qu'une liste exhaustive. Adapté de Ensembl genome browser 92 (<https://www.ensembl.org/>). (C) Schématisation non à l'échelle du gène *paflah1b1* présentant quelques mutations retrouvées chez des patients atteints de lissencéphalie ou microcéphalie. Adapté de « *LIS1-related isolated lissencephaly: spectrum of mutations and relationships with malformation severity* » par Saillour et al., 2009

## 2. Développement tumoral

La perte d'hétérozygotie est une perte d'un locus ou d'une région de locus conduisant à la perte d'expression des gènes présents dans ce locus. Ce phénomène est retrouvé dans de nombreuses formes de cancer. La perte d'hétérozygotie au niveau du locus 17p13.3 est récurrente (362) et a été détectée dans des cas de leucémie, cancers du sein, cancers des ovaires (363), tumeurs astrocytaires (364). Le rôle exact de cette perte de locus dans le développement des cancers n'a pas été étudié en détail. L'analyse de médulloblastomes résultants de cette perte d'hétérozygotie ne conduit pas à la perte d'expression de Lis1 (365). Cependant, dans le cas du carcinome hépatique, elle s'accompagne de la diminution d'expression de Lis1. La transfection de sh-ARNm dirigé contre le transcrit Lis1, dans une lignée de cellules hépatiques conduit à des développements de colonies tumorales *in vitro*.

L'injection à des souris de cellules traitées par ce sh-ARNm entraîne le développement de tumeur hépatique, suggérant que la perte hétérozygote de Lis1 peut conduire au développement tumoral (366). En revanche, la surexpression de Lis1 dans ces lignées tumorales ne conduit pas au développement de tumeurs chez la souris.

Une étude a aussi révélé la présence de SNP dans le gène *pafah1b1* retrouvés chez de nombreux patients présentant des leucémies myéloïdes. Il n'y a aucune donnée vérifiant que le développement tumoral chez ces patients résulte d'une variation d'expression de Lis1 ou d'un problème fonctionnel lié à cette protéine (367).

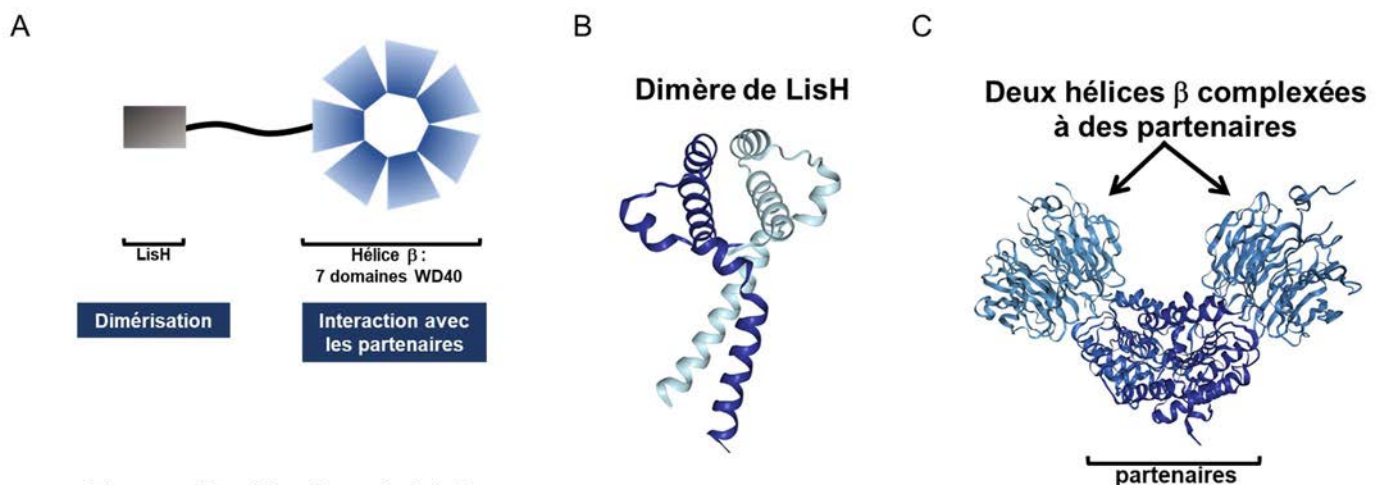
### **3. Conséquences immunitaires de la perte d'expression de Lis1**

Les conséquences immunitaires de la déficience en Lis1 n'ont jamais été rapportées à ce jour. Cependant, il existe un cas de patient pour lequel la lissencéphalie s'accompagne d'une diminution des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. L'analyse étant faite en 1989, il s'agissait du phénotype de la lissencéphalie sans certitude que Lis1 soit affectée chez ce patient, ou même que ce défaut ne soit dû qu'à un seul gène (368).

## **II. Fonctions moléculaires**

Lis1 est exprimée par le gène *pafah1b1* localisé sur le chromosome 17 chez l'homme et sur le chromosome 11 chez la souris. La protéine Lis1, d'une taille de 47KDa, est constituée d'un domaine de dimérisation N-terminal LisH et d'une région de 7 domaines WD40 formant une structure tridimensionnelle en hélice  $\beta$ . Lis1 agit sous forme homodimère justifiant l'importance du domaine LisH pour ses fonctions (Fig. 19). Des expériences de compétition démontrent que la surexpression de la région N-terminale de la protéine affecte la croissance des colonies d'*Aspergillus nidulans* (369). Par ailleurs, la délétion du domaine LisH chez la souris affecte le développement neural. L'absence de dimérisation ne permet plus l'interaction de Lis1 avec la dynéine ou le complexe PFAH-1B (370). L'expression d'un dimère artificiel de Lis1 dépourvu du domaine LisH (GST- $\Delta$ LisH) restaure la capacité de Lis1 à réguler la dynéine (371). L'hélice  $\beta$ , formée par les 7 domaines WD40, permet l'association de Lis1 avec ses partenaires (Fig. 19C). L'analyse structurale par cristallographie du complexe PFAH-1B, démontre que des interactions ioniques sont engagées entre cette région et les autres sous unités de ce complexe (372). Certains patients atteints de lissencéphalies, présentent des mutations ponctuelles dans leur génome conduisant à la substitution d'un résidu chargé par un résidu neutre. L'analyse de ces mutations dans des

lignées cellulaires démontre que, suite à ces substitutions, l'interaction entre Lis1 et ses partenaires est fortement compromise (373). La protéine Lis1 est très conservée au sein de l'évolution. La souris et l'homme partagent une identité de plus de 99% dans la séquence protéique. Lis1 et son homologue Pac1 chez la levure ont une identité de 30% et une similarité de 45% (374). Chez les végétaux, OsLIS-L1 est une protéine présentant un domaine de dimérisation LisH et sept domaines WD40 similaires à Lis1. De manière intéressante, des mutants pour OsLIS-L1 présentent un défaut de gamétogénèse et de croissance par défaut de la prolifération des cellules chez le riz (375). Nous verrons dans la suite de ce chapitre que Lis1 joue un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire.



**Figure 19 :** Structure de Lis1

(A) Schématisation de la protéine Lis1 avec un domaine de dimérisation LisH et une hélice  $\beta$  constituée de sept domaines WD40 pour l'interaction avec des partenaires. LisH et l'hélice  $\beta$  sont reliées par une région coiled-coil (B) Structure d'un dimère de LisH obtenue après diffraction des rayons X par Kim et al., 2004. (C) Structure de deux hélices  $\beta$  de Lis1 complexées à un dimère obtenu après diffraction des rayons X par Tarricone et al., 2004. (B) et (C) les images ont été obtenues après sélection de l'orientation d'intérêt sur « NGL viewer » par Rose et al., 2015 et Rose et al., 2016.

## 1. Régulation du complexe PAFAH-1B

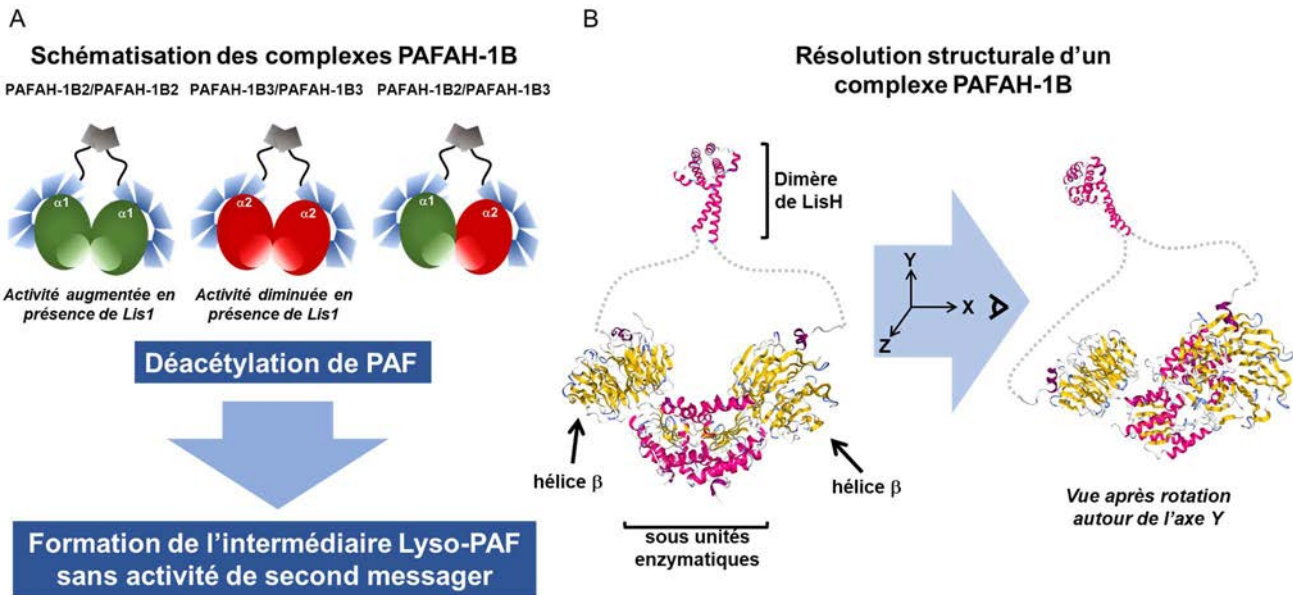
### 1.1. Le complexe PAFAH-1B

Le complexe Platelet activating factor acetylhydrolase 1B ou PAFAH-1B, fait partie de la famille enzymatique PAFAH comprenant la Lysoprotein-associated phospholipase A2, PAFAH-1B et PAFAH-2. Ces enzymes catalysent la déacétylation du second messager lipidique PAF (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine) conduisant à la formation de lyso-PAF, l'intermédiaire inactif de PAF. Ce second messager est synthétisé et

sécrété par les cellules suite à divers stimuli. La stimulation du récepteur de PAF (PAFR) par PAF entraîne l'activation de voies de signalisation par l'activation de phospholipases qui hydrolysent le PIP2 en DAG et en PIP3. Cette signalisation active l'expression et la sécrétion de facteurs inflammatoires par les cellules immunitaires et altère la sécrétion de neurotransmetteurs dans le système nerveux. La dérégulation de sa fonction conduit à des inflammations exacerbées et à des effets toxiques sur les neurones (376, 377).

#### 1.2. Rôle de Lis1 dans la fonction enzymatique de PAFAH-1B

Le complexe PAFAH-1B est un tétramère constitué de deux sous unités enzymatiques PAFAH-1B2 et/ou PAFAH-1B3. Le dimère de PAFAH-1B1, correspondant à Lis1, stabilise l'interaction du complexe enzymatique (372). La fonction de Lis1 au sein du complexe PAFAH-1B est complexe. En effet, son action dépend de la combinaison des sous unités enzymatiques de PAFAH-1B. Des expériences *in vitro*, révèlent que Lis1 augmente considérablement l'activité enzymatique du dimère PAFAH-1B2/PAFAH-1B2 alors qu'il n'a pas d'effet sur le dimère PAFAH-1B2/PAFAH-1B3. Au contraire, Lis1 aurait une activité répressive sur l'activité du dimère PAFAH-1B3/PAFAH-1B3 (378). Bien que chaque dimère soit capable de catalyser la déacétylation de PAF, ils peuvent avoir des spécificités à d'autres substrats et à différents tissus (Fig. 20).



**Figure 20** : Représentation de Lis1 au sein du complexe PFAH-1B

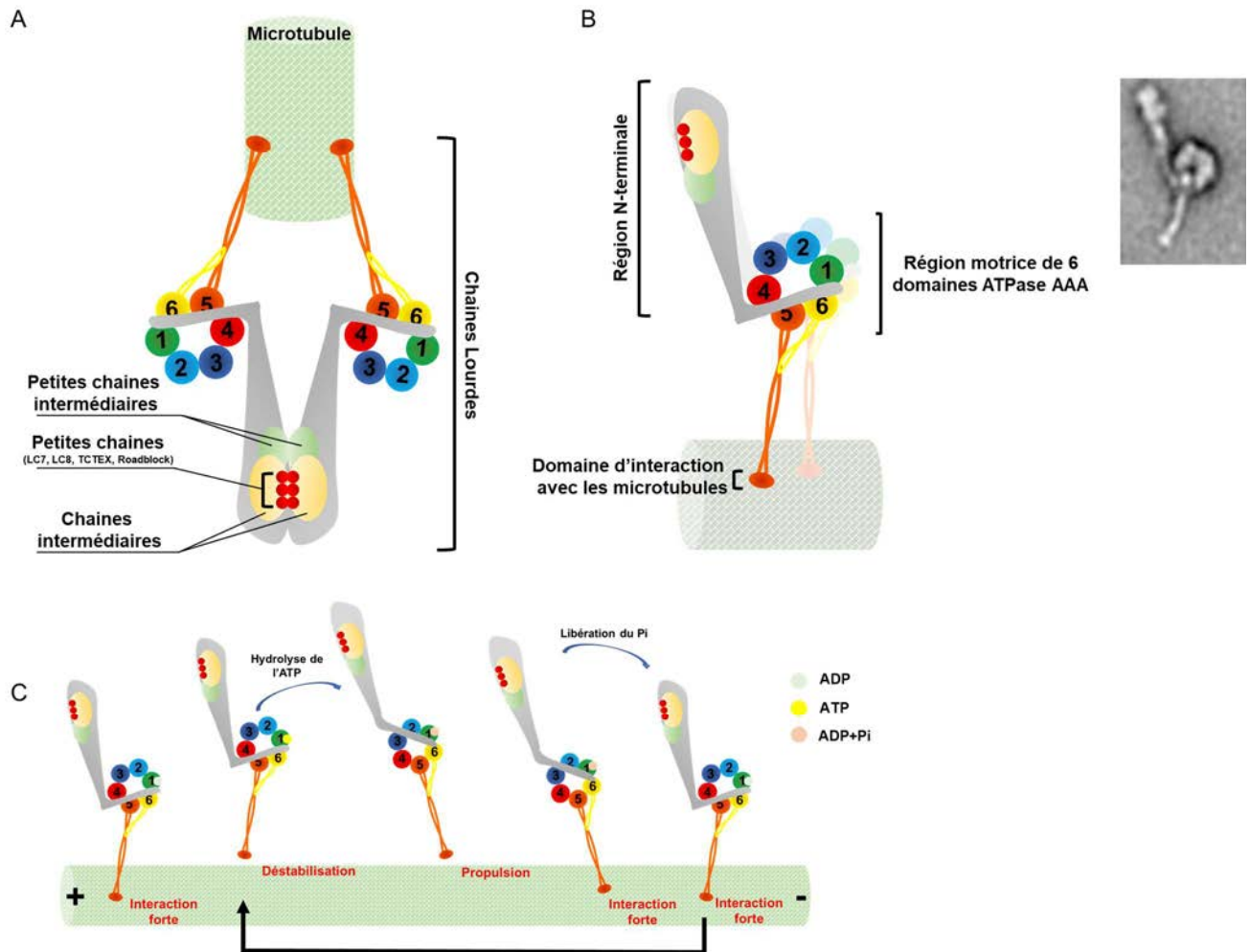
(A) Représentation schématique de Lis1 complexée aux dimères PFAH-1B2/PFAH-1B2, PFAH-1B2/PFAH-1B3 et PFAH-1B3/PFAH-1B3. Lis1 favorise l'activité déacétylase de PFAH-1B2/PFAH-1B2 ce qui conduit à la déacétylation de PAF pour inhiber la signalisation et l'inflammation associées à PAF. (B) Représentation structurale de complexe PFAH-1B obtenue par diffraction des rayons X. La résolution structurale des hélices  $\beta$  de Lis1 complexées au dimère de PFAH a été obtenue par Tarricone et al., 2004 et le dimère LisH par Kim et al., 2004. La rotation a été réalisée à l'aide de « NGL viewer » par Rose et al., 2015 et Rose et al., 2016.

## 2. Régulation de la Dynéine

### 2.1. Généralités sur dynéine

La dynéine est un complexe de haut poids moléculaire ( $\approx 1,5$ MDa) comprenant de nombreuses sous unités. Les deux chaînes lourdes contiennent chacune un domaine d'interaction avec les microtubules MTBD, un domaine flexible dit linker, une région C-terminale de dimérisation et d'interaction avec des cargos et une région motrice présentant 6 domaines ATPase AAA. Les domaines AAA1 à AAA4 sont capables de fixer l'ATP. Les fonctions précises des domaines AAA2 et AAA4 ne sont pas connues alors que les domaines AAA1 et AAA3 hydrolysent l'ATP et participent à l'action motrice de la dynéine. Le domaine AAA1 est le domaine essentiel au déplacement de la dynéine alors que le domaine AAA3 est important pour réguler le déplacement (379). La régulation du complexe se fait par le biais de ses domaines moteurs et des domaines d'interactions avec les microtubules. Deux

chaînes intermédiaires, deux petites chaînes intermédiaires et six petites chaînes sont aussi mises à contribution dans la régulation du complexe et des fonctions associées (Fig. 21).



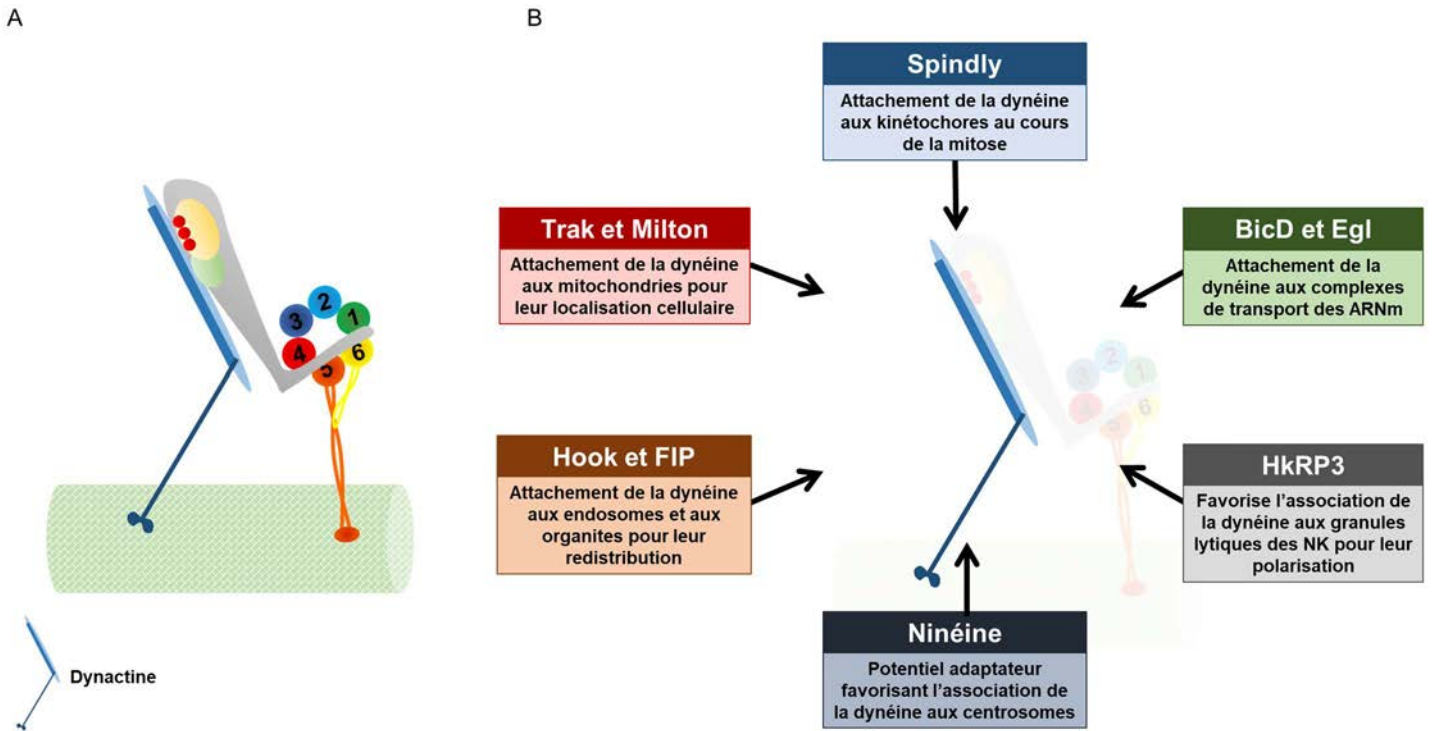
**Figure 21** : Représentation de la dynéine

(A) Représentation d'un dimère de dynéine sur un plan afin d'observer la composition des deux chaînes lourdes constituées d'une région motrice chacune. Ces chaînes lourdes ont sur leur extrémité N-terminale deux petites chaînes intermédiaires, deux chaînes intermédiaires et six petites chaînes qui participent à la dimérisation du complexe et à sa régulation. (B) Représentation de la dynéine vue de côté avec la deuxième chaîne lourde à l'arrière comme elle sera représentée dans la suite de cette thèse. L'encart est une chaîne lourde de la dynéine observée en microscopie électronique par Burgess et al., 2003 pour leur publication « *Dynein structure and power stroke* ». (C) Mouvement de la dynéine vers l'extrémité négative des microtubules. L'ATP se fixant sur AAA1 conduit à la déstabilisation de la dynéine des microtubules. L'hydrolyse de l'ATP entraîne un changement conformationnel propulsant la dynéine. Ce changement conformationnel est favorable à l'interaction avec les microtubules. La libération du Pi entraîne la conformation initiale de la dynéine qui peut de nouveau fixer une molécule d'ATP.

La dynéine, réalise un déplacement rétrograde sur les microtubules, de l'extrémité positive située au cortex cellulaire vers l'extrémité négative correspondant au centrosome à l'exception des neurones. La dynéine transporte de nombreux objets cellulaires, de la molécule comme l'ARNm à l'organite comme les mitochondries et les noyaux. Ce déplacement est dépendant de l'ATP s'hydrolysant dans les sous unités motrices AAA1 et conduisant à des changements conformationnels modifiant l'affinité du domaine MTBD avec les microtubules. De plus, ces changements structuraux conduisent à la propulsion de la dynéine pour son déplacement (380) (Fig. 21).

La fonction de la dynéine dans le transport ou dans la stabilisation de complexe est fortement dépendante du complexe dynactine et des régulateurs Lis1 et Asunder. La dynactine se fixe à la dynéine et agit comme un intermédiaire entre la dynéine et les adaptateurs moléculaires qui se fixent aux cargos. Elle déclenche la mobilité de la dynéine ou alors participe à sa stabilisation sur les microtubules selon les adaptateurs moléculaires associés. Ces adaptateurs sont des protéines ayant une spécificité plus ou moins grande pour les structures cellulaires à transporter (381). Alors que Spindly est impliquée dans l'attachement de la dyneine aux kinétochores lors de la mitose (382), Hook et FIP interviennent dans le transport d'endosomes et d'organites (383, 384). HkRP3 conduit au transport de granules lytiques dans les cellules NK vers la synapse immunologique et Trak est spécifique du transport mitochondrial (385, 386). BicD et Egl sont associées au transport d'ARNm par le complexe mRNP (387). Il a été récemment découvert que la ninéine représente un nouvel adaptateur de la dynéine. La ninéine est une protéine du centrosome ce qui suggère que celle-ci est importante dans le déplacement du centrosome (381) (Fig. 22).





**Figure 22 :** La dynéine interagit avec la dynactine qui recrute des adaptateurs spécifiques

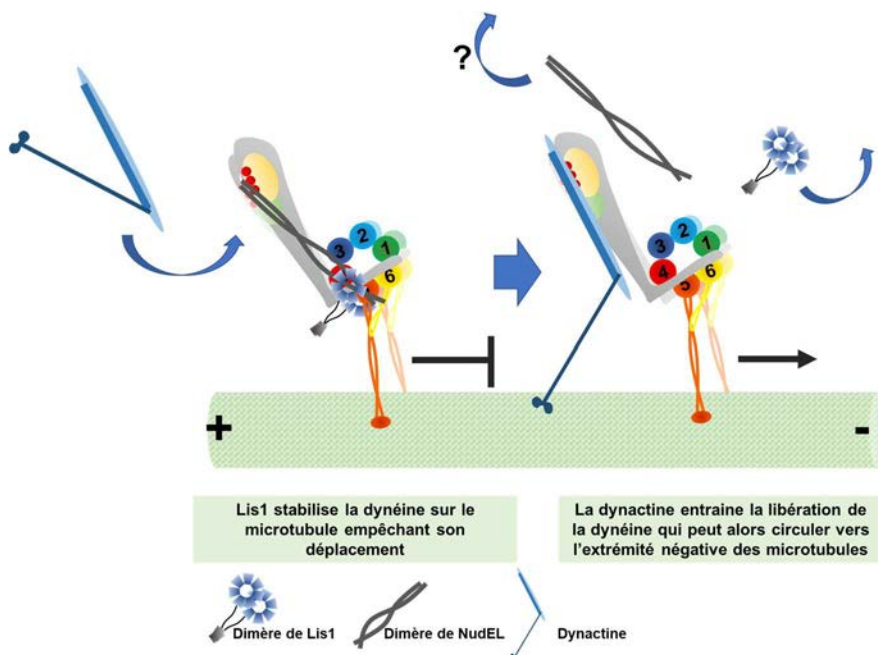
(A) Représentation de l'interaction entre la dynéine et la dynactine. La dynactine interagit avec les chaînes intermédiaires de la dynéine. (B) La dynactine recrute de nombreux adaptateurs spécifiques aux structures à véhiculer. Hook et FIP interviennent dans le transport des organites et des endosomes. Trak et Milton sont spécifiques de la relocalisation des mitochondries. Spindly entre en jeu lors de la mitose pour permettre l'accrochage des microtubules aux kinétochores. BicD et Egl interviennent pour le transport des ARNm. HkRP3 est mis en place pour la polarisation des granules lytiques vers la synapse immunologique des cellules NK. Enfin la ninéine est un potentiel adaptateur car interagit avec la dynéine et est spécifique des centrosomes mais il reste à déterminer la fonction de la ninéine associée à la dynéine.

## 2.2. Régulation de l'activité motrice

Il est solidement établi depuis de nombreuses années que Lis1 joue un rôle essentiel dans la régulation spatiale de nombreuses structures cellulaires. Cette régulation nécessite l'activité de la dynéine qui est finement modulée par Lis1. L'association de Lis1 à la dynéine nécessite les protéines Nde1 ou NdeL. En effet, *in vitro*, l'absence de ces protéines ne permet pas l'interaction de Lis1 avec la chaîne lourde de la dynéine. Nde1/NudeL interagit avec la région de sept domaines WD40 de Lis1 et avec les chaînes intermédiaires de la dynéine. Le complexe Lis1-Nde1/NudeL interagit avec la dynéine et favorise le recrutement de la

dynactine (388). Le complexe dynactine interagira ensuite avec les adaptateurs des structures d'intérêt. De nombreux modèles existent concernant les mécanismes de régulation de la dynéine par Lis1 :

*Lis1* initie le déplacement de la dynéine à partir des extrémités positives des microtubules : Des expériences *in vitro*, démontrent que la vitesse de déplacement de la dynéine sur les microtubules est considérablement augmentée en présence de Lis1 (389). Cependant, des expériences *in vivo* chez *Aspergillus nidulans* démontrent le contraire (390). De manière intéressante, NudE et la dynactine interagissent avec le même site d'interaction sur la chaîne intermédiaire de la dynéine. Des analyses biochimiques révèlent que la dynactine et NudE entrent en compétition pour interagir avec ce domaine. Ces données suggèrent fortement que la dynactine dissocie le complexe NudE-Lis1 de la dynéine pour activer la migration (391). Supportant cette idée, le suivi de la migration d'endosomes par kymographie, démontre que Lis1 ne colocalise pas avec les endosomes durant leur mouvement au contraire de la sous unité p25 de la dynactine (390, 392). Ceci suggère que Lis1 initie le mouvement de la dynéine sur les microtubules mais ne régule pas sa vitesse de déplacement lors du transport d'organelles (Fig. 23).

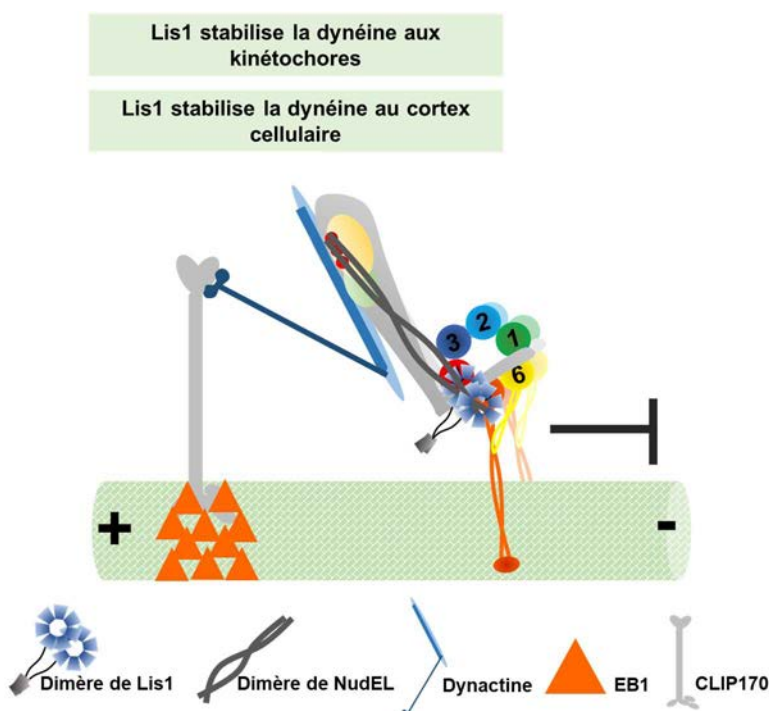


**Figure 23 :** Lis1 initie le déplacement de la dynéine

Lis1 est recrutée à la dynéine par les molécules NudE/NudEL et stabilise la dynéine sur les microtubules. L'interaction de la dynactine avec la dynéine conduit à la libération de Lis1 et donc à son déplacement

*Lis1 recrute et stabilise la dynéine aux extrémités positives des microtubules :*

Lis1 est fortement concentrée aux extrémités positives des microtubules et n'est pas détectée au cours du déplacement des objets cellulaires par la dynéine. Lis1 peut conduire au recrutement de la dynéine à l'extrémité positive des microtubules en favorisant l'interaction de la dynactine avec EB1 et CLIP170 (393, 394). Cela permet le recrutement de IQGAP1 au niveau du cortex cellulaire, ce que nous discuterons dans la partie « Fonctions cellulaires » (395). Par ailleurs, en favorisant l'interaction de la dynactine avec EB1 et CLIP170, Lis1 favorise le recrutement de la dynéine au niveau des kinétochores lors de la mitose (396, 397) (Fig. 24).



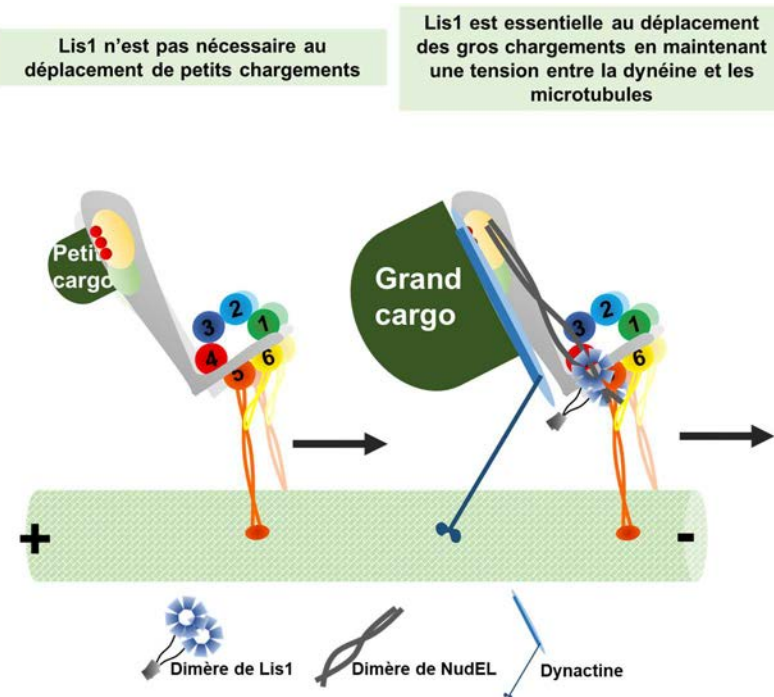
**Figure 24 :** Lis1 stabilise la dynéine aux extrémités positives des microtubules

Lis1 est recrutée à la dynéine par les molécules NudE/NudEL et stabilise la dynéine sur les microtubules. Le recrutement de la dynactine conduit à l'association de la dynéine avec CLIP170 ce qui le stabilise au niveau des kinétochores et du cortex cellulaire

*Lis1 facilite le transport des gros chargements par la dynéine*

Lis1 est importante pour le déplacement des structures cellulaires telles que les noyaux, les vésicules et d'autres structures cellulaires (390, 397-399). Cependant, il a été clairement observé que l'extinction du gène *pafah1b1* conduit à un défaut de migration majeur de lysosomes de taille importante alors que les petits lysosomes sont moins affectés (400). Ces données suggèrent que la fonction de Lis1 sur la dynéine dépend du chargement à transporter. Une publication récente démontre, dans des lignées cellulaires COS-7, que le complexe Lis1-dynéine-Nde1 permet de maintenir l'interaction entre la dynéine et les

microtubules. Lis1 serait seulement importante pour l'initiation du transport des charges légères mais contribuerait au transport des charges lourdes tout au long de leur déplacement sur les microtubules. Dans ce cas précis, Lis1 permettrait de maintenir l'interaction de la dynéine avec les microtubules et son cargo (401) (Fig. 25).

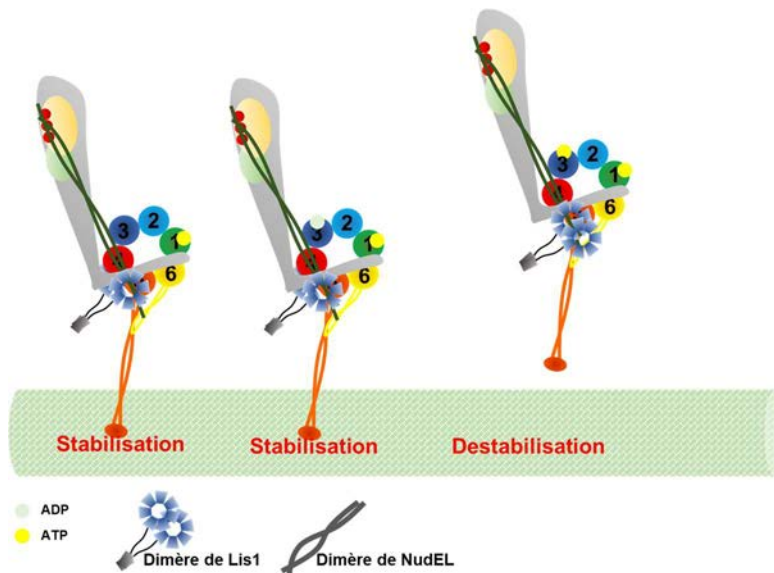


**Figure 25 :** Lis1 facilite le transport de chargements de taille importante

Lis1 est recrutée à la dynéine par les molécules NudE/NudEL et stabilise la dynéine chargée de grands cargos sur les microtubules pour maintenir une tension suffisante entre la dynéine et les microtubules. Pour les petits chargements, Lis1 n'est pas indispensable.

Sur le plan moléculaire, des études de diffraction aux rayons X et de microscopie électronique révèlent que Lis1 interagit avec la région AAA3/4 de la dynéine (389). L'interaction de la dynéine avec les microtubules n'impacte pas l'hydrolyse de l'ATP dans le domaine AAA1. Lis1 exerce des modifications structurales sur la dynéine et modifie ainsi l'affinité du domaine MTBD pour les microtubules. Cet effet dépend du statut nucléotidique du domaine AAA3. En absence de nucléotide ou en présence d'ADP dans cette région, Lis1 augmente l'affinité de la dynéine pour les microtubules. Cependant, Lis1 fragilise cette interaction lorsque le domaine AAA3 fixe une molécule d'ATP. Le statut nucléotide du domaine AAA3 régule les modes d'interaction de Lis1 avec la dynéine. Par microscopie électronique et reconstruction atomique du complexe dynéine et Lis1, les auteurs ont révélé que deux domaines en hélice  $\beta$  d'un dimère de Lis1 se fixe sur la dynéine en présence d'ATP. L'un interagit avec le domaine AAA3 alors que l'autre contacte la région *coiled-coil* de la chaîne lourde faisant l'intermédiaire entre le moteur et le domaine MTBD. Au contraire, en absence de nucléotide ou en présence d'ADP, seulement une hélice  $\beta$  interagit avec la

dynéine au niveau de AAA3. En présence d'ATP, l'interaction d'un domaine en hélice  $\beta$  de Lis1 fragiliserait le domaine *coiled-coil* et déstabiliserait l'interaction de la dynéine avec les microtubules entraînant son décrochement (402) (Fig. 26).



**Figure 26 :** L'état nucléotidique de AAA3 régule l'activité de Lis1 vis-à-vis de la dynéine

La présence d'ATP sur le domaine AAA3 conduit à l'interaction d'une hélice  $\beta$  de Lis1 avec le domaine *coiled-coil* de AAA6 entraînant la déstabilisation. En présence d'ADP ou sans nucléotide, l'hélice  $\beta$  interagit seulement au AAA5 et stabilise la dynéine sur les microtubules.

### III. Fonctions cellulaires

Comme mentionné dans les paragraphes précédents, Lis1 est un régulateur de la dynéine et de PAFAH-1B. Lis1 est donc impliquée dans de nombreux processus cellulaires dépendants de ces complexes moléculaires.

#### 1. Lis1 dans la migration cellulaire

La fonction de Lis1 dans la migration cellulaire a été fortement analysée au cours d'études portant sur la lissencéphalie. En effet, chez des souris hétérozygotes pour Lis1, la structure du cortex cérébral est fortement altérée et le suivi de la migration des neurones révèle un retard de migration des cellules (370, 403). De plus, l'extinction de Lis1 par ARNm interférents dans des neurones conduit au défaut majeur de la migration des neurones (404). La surexpression de Lis1 affecte également l'organisation du cortex cérébral (357, 405). Ces données démontrent l'importance du dosage de Lis1 dans la migration neurale. Mais la fonction de Lis1 dans la régulation de la migration cellulaire n'est pas spécifique aux neurones et peut être mise en jeu dans d'autres types cellulaires. Dans la lignée de

fibroblastes NIH3T3, l'extinction de Lis1 conduit à la diminution de la vitesse de migration (406).

Lis1 peut affecter la migration des cellules par différents mécanismes. La migration cellulaire dépend de la polarisation de molécules effectrices permettant les protrusions cellulaires et l'agrippement des cellules à un substrat par le biais de molécules d'adhésion. La migration dépend aussi du recyclage de ces molécules d'adhésion et de la réorganisation des organites au sein des cellules (407).

### 1.1. Recrutement et polymérisation d'actine corticale

L'actine corticale représente les filaments d'actines polymérisés au niveau du cortex cellulaire. Suite au chimiotactisme, des fibres d'actine sont polymérisées au niveau des récepteurs aux chimiokines permettant alors la formation des protrusions cellulaires. Cette polymérisation polarisée d'actine est due à la régulation de petites protéines G CDC42, Rac1 et RhoA. L'activation de ces molécules se fait par échange de leur GDP en GTP. Rac1 et CDC42 sont activées au niveau du lamellipode à l'avant de la cellule en migration alors que RhoA est activée à l'uropode de celle-ci (407). Il a été démontré que la perte hétérozygote de Lis1 dans les neurones de souris conduit à la diminution des lamellipodes lorsque les cellules sont mises en culture sans stimulation. L'analyse de l'activation des petites protéines G démontre une forte diminution de l'activation de Rac1 et CDC42 mais l'augmentation de RhoA<sup>GTP</sup>. Cela s'accompagne d'une réduction de la polymérisation d'actine au lamellipode (408). Dans un contexte d'activation neuronale par engagement de récepteurs NMDA, l'activation de Rac1, CDC42 et même RhoA est diminuée dans les cellules partiellement déficientes pour Lis1. L'activation de ce récepteur, conduit au déclenchement du flux calcique qui n'est pas affecté par l'absence de Lis1. Cependant, une diminution de recrutement de la protéine IQGAP1 au niveau du cortex cellulaire a été constatée. IQGAP1 est activée par le calcium et permet de stabiliser les formes Rac1<sup>GTP</sup> et CDC42<sup>GTP</sup>. IQGAP1 formerait un complexe avec Lis1 et CLIP170 suite à un flux calcique pour stabiliser Rac1<sup>GTP</sup> et CDC42<sup>GTP</sup> au niveau du cortex cellulaire et favoriser la polymérisation d'actine corticale (395).

### 1.2. Adhérence des cellules et adhérence focale

L'adhérence des cellules au substrat pour la migration peut se faire par des protéines de la famille des intégrines et des cadhérines. Ces protéines forment des points d'adhésion focaux afin que le cytosquelette puisse diriger la cellule et ses composants vers l'avant. Une étude

publiée cette année, a montré que le nombre d'adhérences focales est spécifiquement diminué au lamellipode suite à l'extinction de Lis1 par interférence à ARNm dans des cellules NIH3T3. Ceci est corrélé à une réduction de la force de traction des cellules (406). Chez la drosophile, il a été démontré que la déficience en Lis1 conduit à la diminution de E-cadhérine à la surface de cellules souches germinales. La fonction moléculaire de Lis1 sur l'expression à la surface des cellules de cette molécule d'adhésion reste encore inconnue (409). Par ailleurs, il a été établi par des expériences de biochimie que Lis1 interagit avec le domaine C-terminal de la protéine APC (410, 411). La déficience en APC affecte la localisation de Lis1 et de la dynéine suggérant qu'APC régule la localisation de Lis1 au cours de la migration (190). APC est transportée vers le lamellipode par la kinésine et interagit au niveau des adhérences focales avec IQGAP1. APC permet de dissocier les adhérences focales et permet ainsi la progression des cellules (411, 412).

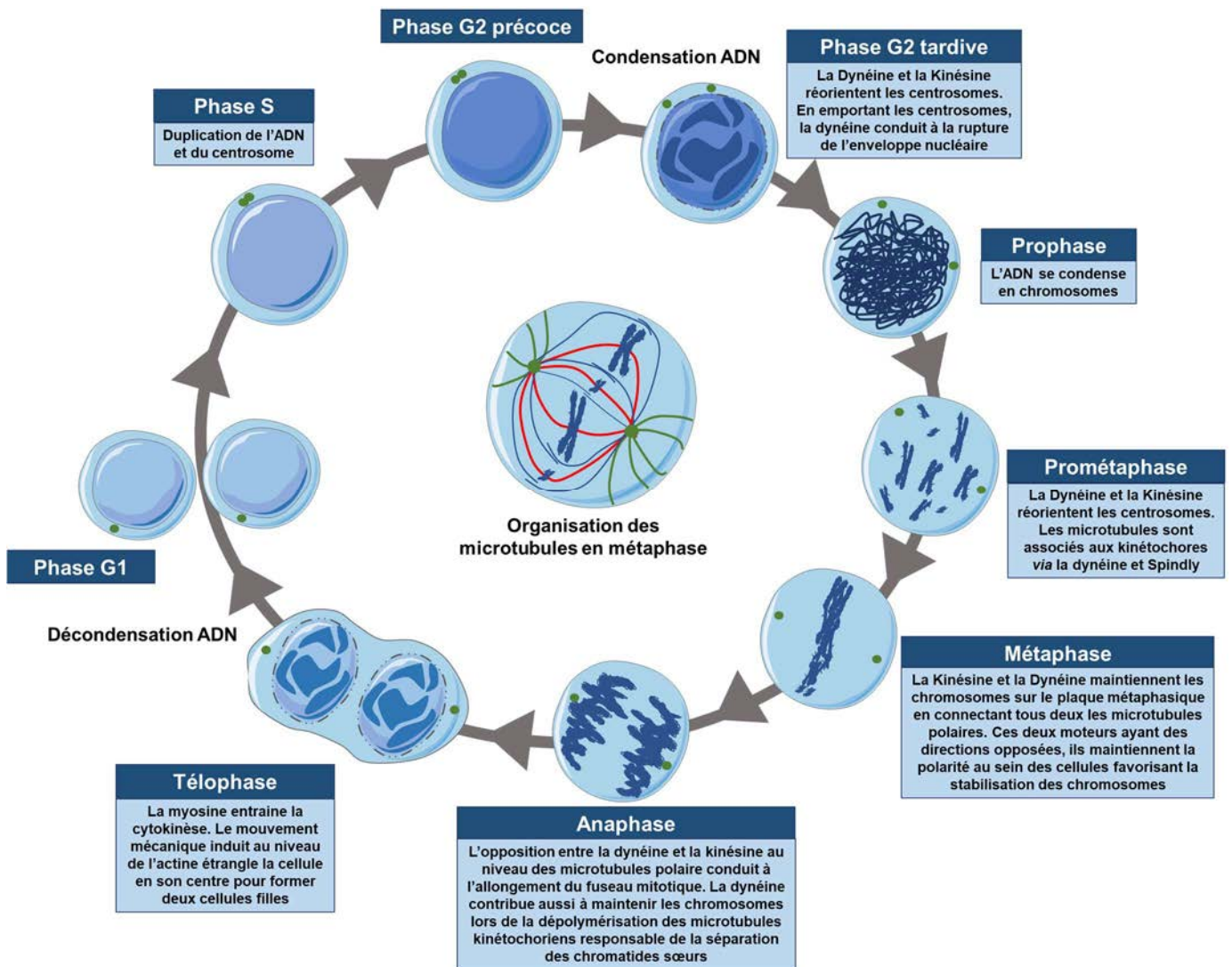
### 1.3. Mouvement d'organites au cours de la migration

Au cours de la migration cellulaire, le noyau se réoriente vers l'uropode alors que l'appareil de golgi et le centrosome se placent à l'avant du noyau (407). L'intérêt du remaniement nucléaire n'est pas totalement compris. Il semblerait cependant qu'il favoriserait le déplacement des cellules en facilitant l'interaction du cytosquelette avec la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des protéines d'adhésions (413, 414). Les déplacements du golgi et du centrosome en revanche semblent être indispensables à la migration cellulaire puisqu'ils permettraient de diriger les vésicules vers le lamellipode (415). Par ailleurs, la connexion du centrosome et du noyau est importante pour le mouvement du noyau au cours de la migration. Dans des cellules en cours de migration, la déficience en Lis1 affecte le couplage entre le centrosome et le noyau. Lis1 et DCX pourraient ainsi collaborer dans la migration neuronale en maintenant l'association du centrosome avec le noyau par le biais des microtubules et de la dynéine (416-418). Par ailleurs, Lis1 est concentrée au niveau du lamellipode de cellules NIH3T3 en migration. L'expression d'un dominant négatif de Lis1 affecte la réorientation du centrosome et par conséquent la migration des cellules (419). Lis1 est donc importante dans la relocalisation du centrosome et du noyau au cours de la migration cellulaire.

## 2. Régulation de la division cellulaire

La prolifération des cellules se caractérise par la progression de chaque cellule dans le cycle cellulaire. Les cellules au repos sont dans une phase de quiescence appelée G0 au cours de laquelle l'activité intracellulaire est diminuée. Suite à des stimuli, les cellules quittent cet état de quiescence, entrent en phase G1 et se préparent à dupliquer leur ADN. Cette préparation nécessite l'expression de protéines impliquées dans la réplication comme l'ADN polymérase. La synthèse de l'ADN se réalise pendant la phase S au cours de laquelle la quantité d'ADN est doublée (420). Le centrosome se duplique également pendant cette phase (421). Suite à la phase S, les cellules entrent en phase G2 et se préparent à la séparation de l'ADN et par conséquent à la division cellulaire lors de la mitose. Les centrosomes nouvellement formés commencent à se séparer. La dynéine sur les microtubules issus des centrosomes interagit avec la dynactine et l'adaptateur BicD2 associé aux pores nucléaires. Ce déplacement entraîne, par la suite, la dissolution de l'enveloppe nucléaire au début de la prophase (422). La mitose est un processus séquentiel, hautement régulé, qui assure la bonne répartition de l'ADN et de diverses protéines vers les pôles opposés de la cellule qui généreront les cellules filles. Elle se caractérise par la condensation de l'ADN lors de la prophase au cours de laquelle la membrane nucléaire, l'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique se fragmentent. Les chromosomes formés lors de la prométaphase rejoignent ensuite la plaque équatoriale de la cellule. L'alignement de ces chromosomes lors de la métaphase est un processus finement régulé. Les chromatides sœurs sont maintenues sur la plaque métaphasique par des tensions mécaniques générées par les moteurs moléculaires kinésines et dynéines au niveau des microtubules. Par ailleurs, ces chromatides sœurs sont liées entre elles par la cohésine. L'activation d'APC/C conduit à la dégradation de la sécurine libérant la séparase. Cette dernière dégrade la cohésine et conduit à la séparation des chromatides sœurs (423). L'inactivation de l'une ou de l'autre de ces protéines motrices conduit à un déséquilibre affectant alors l'organisation des chromosomes. Ces moteurs moléculaires sont aussi mis à contribution au cours du transport des chromatides sœurs vers les pôles opposés des cellules. Par ailleurs, le traitement au nocodazole synchronise les cellules lors de la prométaphase indiquant l'importance capitale des microtubules dans ce processus (424) (Fig. 27).





**Figure 27** : Déroulement du cycle cellulaire

Schématisation du cycle cellulaire au cours duquel les cellules se divisent en deux cellules filles. Au cours de la phase S se déroule la duplication de l'ADN et du centrosome. Les centrosomes composés de centrioles se séparent au cours de la phase G2 à l'aide des protéines motrices. L'ADN se condense en chromosomes au cours de la prophase et ces chromosomes se réorientent par la polarité donnée par les centrosomes (les points verts). Au cours de l'anaphase les chromatides sœurs se séparent pour former deux cellules filles constituées de la même quantité de matériel génétique. Au centre de l'image est représentée l'organisation des microtubules en mitose. Trois groupes de microtubules se distinguent : les microtubules astraux (en vert) qui fixent les centrosomes au cortex cellulaire, les microtubules kinétochoriens (en rouge) dont l'extrémité positive s'enchaîne dans les kinétochores et enfin les microtubules polaires (en bleu) qui se croisent et sont responsables du maintien de la polarité des cellules en mitose grâce aux moteurs moléculaires.

Lis1 joue un rôle essentiel au cours de la division cellulaire (425, 426). La délétion totale du gène *pafah1b1* est létale chez la souris. L'analyse de la prolifération au stade précoce de l'embryogénèse dans ces souris démontre une division fortement altérée. Lis1 est donc importante dans la prolifération des cellules au cours de l'embryogénèse probablement par la régulation de la dynéine (403, 427). Dans le cas de souris hétérozygotes, la fréquence des cycles de prolifération n'est pas affectée de façon majeure. Cependant, la symétrie des divisions est compromise ce qui entraîne la différenciation accrue des cellules souches (428, 429). La fonction de Lis1 dans la prolifération cellulaire est fortement conservée entre les espèces comme le démontre son implication au sein de *Aspergillus nidulans*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* et chez les végétaux en plus de chez les mammifères (369, 375, 426, 429, 430).

### 2.1. Fonctions de Lis1 au cours de la phase G2 du cycle cellulaire

Durant la phase G2 se déroule la séparation des centrosomes dupliqués au cours de la phase S du cycle cellulaire. La duplication des centrosomes est essentielle pour le bon déroulement de la mitose (422). Dans des lignées cellulaires MEF, la déficience en Lis1 dans un modèle inducible par le tamoxifène ER<sup>Cre</sup> Lis1<sup>fl/fl</sup> conduit d'une part à l'amplification des centrosomes et à la mauvaise localisation de ces derniers. La multipolarité aberrante résultante de l'amplification des centrosomes peut conduire à la mauvaise organisation des chromosomes en métaphase. L'amplification du centrosome peut être le résultat de plusieurs phénomènes. Elle peut être la conséquence de la fragmentation des centrioles due à la mauvaise régulation de l'élongation des centrioles et/ou au retard important de la prométaphase (431-434). Par ailleurs, l'amplification du centrosome peut survenir en cas de fragmentation du matériel péri-centriolaire entourant les centrioles et étant à la base de la nucléation des microtubules (432, 435). L'analyse fine par microscopie confocale des centrosomes dans le modèle ER<sup>Cre</sup> Lis1<sup>fl/fl</sup> révèle une augmentation du nombre de centrioles dans le matériel péri-centriolaire. Cependant, les mécanismes précis de cette amplification sont encore mal compris (436).

### 2.2. Fonctions de Lis1 dans le déroulement de la mitose

La mitose est un événement essentiel dans la prolifération des cellules. Elle représente la phase finale du cycle cellulaire et entraîne la séparation de deux cellules filles. Celles-ci bénéficieront d'un matériel génétique identique. Cependant, dans le cas d'une division

asymétrique, la distribution des protéines est différente. La déficience en Lis1 dans le lignée cellulaire MEF par le modèle ER<sup>Cre</sup> Lis1<sup>fl/fl</sup> conduit à une augmentation du temps de la transition métaphase à anaphase (437). Par ailleurs, l'analyse de la métaphase démontre une mauvaise organisation des chromosomes sur la plaque métaphasique (397). Le bon déroulement de la mitose, nécessite l'interaction de la dynéine avec les kinétochores au niveau des chromosomes mais aussi la capacité de la dynéine à réaliser un mouvement rétrograde (438). Le maintien des chromosomes en métaphase nécessite aussi la capacité de la dynéine à connecter les microtubules polaires et kinétochoriens (439). Le maintien des chromosomes sur la plaque métaphasique nécessite des tensions entre la dynéine et la kinésine (440, 441). L'inhibition de la dynéine ou de la kinésine déstabilise cet équilibre et conduit à un défaut d'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. En revanche, l'inhibition concomitante de la kinésine et de la dynéine améliore l'organisation des chromosomes (442). La mauvaise organisation des chromosomes dans les cellules déficientes pour Lis1 est restaurée par l'inhibition de la kinésine Eg5. Ces résultats démontrent donc l'importance de Lis1 dans l'équilibre des forces entre la dynéine et la kinésine au cours de la mitose (442). Lis1 colocalise avec les kinétochores comme le révèlent des expériences d'imagerie (396). Un des composants des kinétochores, CENP-F, est important dans le recrutement de Lis1 et de Nde1/NdeL au niveau des chromosomes (443). Le mouvement des chromosomes par la dynéine vers les pôles des cellules, nécessite l'adaptateur Spindly. Comme attendu, l'extinction de Lis1 par interférence à ARNm entraîne une réduction du transport de Spindly vers le centrosome (444).

### 3. Transport d'organelles

Les découvertes des fonctions cellulaires et moléculaires de Lis1 ont été réalisées en partie au cours d'études sur le modèle *Aspergillus nidulans* pour comprendre la migration du noyau dans ces cellules. Ces données montrent clairement que Lis1 est importante dans le mouvement du noyau au sein de la cellule. Lis1 est aussi importante dans la migration des endosomes et des peroxysomes dans ces cellules. De manière intéressante, la mutation de Lis1 chez la drosophile augmente le transport mitochondrial antérograde et rétrograde. Cependant, cette mutation n'entraîne pas la délétion totale de Lis1 dans ces souches. Cette observation suggère que Lis1, dans certaines conditions, peut réguler négativement le transport des mitochondries (445). Cependant, l'extinction totale de Lis1 par interférence à ARNm conduit à une réduction majeure du transport rétrograde et antérograde des mitochondries et des lysosomes dans des lignées cellulaires (446, 447). De manière

intéressante, Lis1 est capable d'interagir avec la kinésine, responsable du transport antérograde. La délétion de Lis1 affecte le mouvement de la kinésine vers l'extrémité positive des microtubules mais pas son transport rétrograde. De manière intéressante, la délétion de Nde1 ou NdeL n'affecte que le transport rétrograde des mitochondries. Ces résultats suggèrent que Lis1 est capable de réguler l'activité de la kinésine de manière indépendante de Nde1 au cours du transport d'organelles (446).

#### **4. Transport et recyclage des molécules**

##### **4.1. Transport d'ARNm**

Le transport d'ARNm vers une zone spécifique de la cellule peut conduire à la régulation localisée de l'expression de protéines (448). L'investigation des composants de la machinerie de localisation des ARNm chez la drosophile révèle que la dynéine, la dynactine et Lis1 sont recrutées à la séquence signal de localisation des ARNm. L'analyse fine par imagerie de drosophiles mutantes pour Lis1 démontre que la mutation de Lis1 affecte la relocalisation des ARNm au sein des cellules. Lis1 est importante pour le recrutement de la dynéine et de la dynactine à la séquence de localisation des ARNm. Cependant la mutation de Lis1 n'affecte pas le recrutement de Egl et BicD qui sont les adaptateurs associés au transport d'ARNm. Egl et BicD sont donc directement associés à la séquence de localisation des ARNm et Lis1 favorise l'association de Egl et BicD à la dynéine et à la dynactine (449).

##### **4.2. Transport de protéines**

Le transport et le recyclage des protéines peuvent se faire grâce aux vésicules endocytées et exocytées. Il a été démontré que Lis1 joue un rôle important dans l'endocytose comme je l'ai présenté dans un paragraphe antérieur. Une fonction bien décrite de Lis1 est sa capacité à faire retourner la dyneine à sa position d'origine à l'extrémité positive des microtubules. Il a été démontré que la déficience en Lis1 conduit à la diminution du transport antérograde de dynéine par la kinésine. Cette donnée démontre donc l'importance de Lis1 dans le transport de la dynéine vers l'extrémité positive des microtubules (450).

#### **5. Lis1 au sein dans la signalisation cellulaire**

Bien que Lis1 ne semble pas être impliquée dans une voie de signalisation spécifique, elle pourrait être mise en jeu dans le transport ou la stabilisation de complexe de signalisation. Cependant, les données démontrant la fonction de Lis1 dans la signalisation diffèrent.

En effet, il a été montré que Lis1 interagit avec la protéine BRAP, un régulateur négatif de la voie des MAPK. La déficience en Nde1, conduit à l'augmentation du recrutement de KSR, un adaptateur des MAP kinase, et par conséquent une augmentation de la phosphorylation de Mek et Erk suite à la stimulation par des doses réduites de EGF et FGF. Le recrutement de KSR est réduit en l'absence de Lis1 également. De par ces résultats, les auteurs ont interprété que Lis1 jouerait un rôle dans le recrutement de BRAP au niveau de KSR (451, 452). Une publication récente suggère que Lis1 stimule la phosphorylation de Erk et de Akt en contrôlant l'expression des récepteurs FGFR. Dans cet article, les auteurs ont utilisé un modèle conditionnel supprimant complètement le gène codant Lis1. La perte de Lis1 entraîne une diminution d'expression du récepteur FGFR qui est liée à l'augmentation de sa dégradation par les lysosomes et la diminution de son recyclage. L'engagement du récepteur FGFR conduit à la phosphorylation de Nde1 interrompant l'interaction entre Lis1 et Nde1 accompagnée de la dégradation du récepteur par le lysosome (453).

#### **IV. Régulation de Lis1**

L'expression ou l'activité de Lis1 est hautement régulée dans les cellules. Comme longuement discutée dans ce chapitre, l'expression excessive ou la perte d'expression de Lis1 sont associées à des troubles physiologiques graves. La régulation d'expression ou d'activité des protéines peut se faire à plusieurs niveaux, qu'elle soit par leur localisation cellulaire, par leur expression ou même par des modifications post-traductionnelles.

##### **1. Régulation d'expression génique**

Les facteurs de transcription régulant l'expression de Lis1 ne sont pas connus, bien que l'expression de ce gène soit fortement régulée. En effet, l'expression de Lis1 est différente selon les stades de développement, après la naissance mais aussi entre les différents types cellulaires et tissus (404).

##### **2. Régulation post-transcriptionnelle**

MAGOH entre en jeu dans le complexe de traduction des ARNm en protéines. Dans le cas de délétion hétérozygote de *magoh*, le niveau de transcrite de Lis1 est identique au contrôle alors que la proportion de protéines est diminuée. Les souris hétérozygotes pour *magoh* présentent un phénotype comparable à celui observé dans le cas de souris hétérozygotes

pour Lis1 (454). L'expression de l'ARNm provenant du gène *pafah1b1* en protéine pourrait aussi être régulée par des petits ARN. Dans la lignée cellulaire PC12, le petit ARN miR-139-5p conduit à la diminution d'expression de Lis1. Ce petit ARN régule le développement neural chez le rat. Dans les lignées cellulaires PC12 et HCN-2, l'absence de Lis1 et de miR-139-5p entraîne une faible migration des cellules. L'expression de Lis1 conduit à une augmentation considérable de la migration qui est diminuée drastiquement en présence de miR-139-5p (455).

### 3. Modifications post-traductionnelles

#### 3.1. Phosphorylation

Des expériences anciennes suggèrent que Lis1 peut être phosphorylée sur une sérine. Des tests de phosphorylation *in vitro* en présence de différentes kinases révèlent que Lis1 peut être phosphorylée par la kinase CKII (456). De plus, Lis1 est phosphorylée après traitement des neurones à la D-sérine, un agoniste capable de stimuler les neurones. La phosphorylation de Lis1 pourrait réguler la localisation de Lis1 au sein de la cellule de façon CLIP170 dépendante (394). Le rôle précis de cette phosphorylation n'est pour le moment pas connu. Cependant, la phosphorylation des partenaires de Lis1 peut réguler les interactions. En effet, la phosphorylation de Nde1 et NdeL1 sur leur thréonine T<sup>131</sup> et T<sup>132</sup> respectivement par PKA conduit à la perte de l'interaction entre Lis1 et Nde1 ou NdeL1. L'activité de PKA est modulée par le complexe PDE4/DISC suite à une élévation du niveau d'AMPc dans la cellule. Cette phosphorylation est enrichie dans le noyau et dans les centrosomes au cours de la mitose probablement pour réguler l'action de Lis1 dans ce processus (457). Nde1 et NdeL1 peuvent aussi être substrats d'autres protéines kinases telles que CDK1, CDK5 et Aurora A régulant l'interaction de Lis1 avec Nde1/NdeL1 et du complexe Nde1-Lis1 avec la dynéine. La phosphorylation de la sérine S<sup>231</sup> par CDK5 au cours de la prophase des cellules neurales réduit l'interaction de Lis1 et Nde1 au niveau de l'enveloppe nucléaire (458). Par conséquent, les phosphorylations de Nde1 et NdeL1 peuvent réguler, indirectement, la fonction de Lis1 vis à vis de la dynéine.

#### 3.2. Sumoylation et ubiquitination

Il a été démontré, chez la levure, que Pac1p, un homologue de Lis1, peut être sumoylé et ubiquitiné. La fonction de ces modifications post-traductionnelles reste inconnue. Cependant, cet article a démontré que la sumoylation de Pac1p pouvait entraîner

l'ubiquitination de cette protéine. Cela pourrait alors conduire à sa dégradation par le protéasome (459).

#### **4. Régulation spatiale et de sa stabilité**

##### **4.1. Stabilité fonctionnelle**

Comme je l'ai présenté largement dans ce chapitre, Lis1 est à la fois une sous unité du complexe enzymatique PFAH-1B et un régulateur de la dynéine. Nde1 et NdeL1 sont indispensables pour la fonction de Lis1 dans la régulation de la dynéine. De manière intéressante, Nde1 et NdeL1 entrent en compétition avec les sous unités PFAH-1B2/3 pour leur interaction avec Lis1 (372). La surexpression des sous unités PFAH-1B2 et PFAH-1B3 dans des lignées cellulaires conduit à la diminution consécutive du transport rétrograde et à du retard mitotique. En revanche, l'expression ectopique de NdeL1 dans ces cellules surexprimant les sous unités PFAH-1B2 et PFAH-1B3 restaure le positionnement des organelles. La fonction de Lis1 dans le complexe PFAH-1B n'entre donc pas en jeu dans la régulation de la dynéine. Ces données démontrent que la stabilité fonctionnelle de Lis1 dans le complexe enzymatique PFAH-1B ou dans l'activité de la dynéine peut être régulée négativement par Nde1/NdeL1 et les sous unités PFAH-1B2/3 respectivement (404). Par ailleurs, la surexpression des sous unités PFAH-1B2/3 dans un contexte mitotique conduit à l'augmentation de l'anormalité du nombre de centrosomes et de noyaux. L'analyse par imagerie démontre la localisation affectée de Lis1 en cas de surexpression de sous unités de PFAH-1B (460). Dans les neurones, l'activité de Lis1 est régulée par la signalisation de la Reelin. Suite à l'association de la Reelin sur le récepteur VLDLR, Dab1 est recrutée au récepteur VLDLR entraînant la phosphorylation de Dab1. Dab1 interagit donc avec Lis1 conduisant à la dissociation de Lis1 du complexe PFAH-1B. Par conséquent, Lis1 devient disponible pour son activité de régulateur de la dynéine au cours du développement neural (461).

##### **4.2. Stabilité structurale**

La stabilité de Lis1 peut être régulée, comme mentionné précédemment, par sumoylation et ubiquitination (459). Mais la protéine NudC participerait à la stabilisation de Lis1. En effet, l'extinction du gène *nudC* par interférence à ARNm conduit à la diminution du niveau de Lis1 dans des cellules HeLa. Ce résultat s'accompagne de la diminution de l'interaction entre Lis1

et la protéine chaperonne Hsp90. Lis1 peut interagir avec la protéine NudC qui stabilise son interaction avec la chaperonne Hsp90 (462, 463).

#### 4.3. Régulation spatiale

La kinésine est essentielle dans la relocalisation de Lis1, de la dynéine et de la dynactine à l'extrémité positive des microtubules. Chez une souche d'*Aspergillus nidulans* et *Ustilago maydis* déficientes pour une kinésine, la dynéine et Lis1 sont concentrées à l'extrémité négative des microtubules en comparaison à des souches sauvages. Ceci s'accompagne d'un défaut de mouvement des endosomes suite à l'absence de dynéine disponible à l'extrémité positive des microtubules (392, 464).

Par ailleurs, l'interférence à ARNm de NudC conduit à la mauvaise localisation de la dynéine et des organelles. L'analyse par imagerie démontre qu'en absence de NudC, les protéines Lis1, NdeL1 et des sous unités de la dynactine, sont accumulées au voisinage du noyau. Cela suggère qu'en absence de NudC, ces protéines ne parviennent pas à être relocalisées. La protéine NudC, connue pour interagir avec Lis1 (465), interagit aussi avec la protéine motrice kinésine. Lis1 interagit avec la dynéine et la tubuline lors du transport antérograde par la kinésine (450). L'analyse de la migration intracellulaire dans les neurones démontre une forte diminution du mouvement antérograde de la dynéine suite au traitement avec un anticorps anti-NudC. Ces résultats démontrent donc que NudC fait l'intermédiaire entre la kinésine et le complexe Lis1-dynéine pour leur transport vers l'extrémité positive des microtubules (466). L'arrivée du complexe Lis1-dynéine-kinésine à l'extrémité positive des microtubules, nécessite la libération du complexe pour la réactivation de la dynéine. Il a été démontré que Rab6a conduit à la libération de la dynéine en favorisant la dissociation de Lis1 et de la dynéine (467). Par ailleurs, la localisation de Lis1 peut être dépendante de la protéine Asunder, un autre régulateur de la dynéine. La diminution de concentration en Asunder dans des drosophiles conduit à une diminution de la localisation de Lis1 au niveau des chromosomes dans des cellules germinales en cours de méioses (468).

Enfin, la région cellulaire de traduction de l'ARNm codant pour Lis1 peut aussi réguler sa localisation spatiale. En effet, l'abondance de l'ARNm Lis1 est augmentée suite à la stimulation par NGF dans les axones des neurones (469).



## V. Lis1 dans le système immunitaire

La fonction de Lis1 dans le système immunitaire a été peu étudiée. Cependant, quelques publications révèlent l'importance de cette protéine dans le développement et l'homéostasie de plusieurs cellules du système immunitaire.

### 1. Fonctions de Lis1 dans les lignées hématopoïétiques

Comme expliqué au cours du chapitre I de cette thèse, les CSH sont à l'origine du système myéloïde et lymphoïde. Le modèle  $Vav1^{Cre} Lis1^{fl/fl}$  se caractérise par la délétion de Lis1 au sein des CSH. Cependant, les souris  $Vav1^{Cre} Lis1^{fl/fl}$  ne sont pas viables car elles présentent un phénotype dépourvu de sang dit « bloodless ». L'analyse chez les fœtus de cette lignée démontre une proportion réduite de CSH par rapport aux fœtus contrôles. Bien que la prolifération des cellules ne soit pas affectée de façon majeure, une forte augmentation de la phase G2/M du cycle cellulaire est observée. L'analyse fine par imagerie des cellules en mitose démontre une mauvaise répartition des chromosomes au cours de la mitose et un nombre anormal de centrosomes. Cela conduit à l'augmentation du nombre de cellules aneuploïdes qui s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules en apoptose (470). Dans un modèle inductible  $Lis1^{fl/fl} Rosa26^{CreER}$ , conduisant à la délétion de Lis1 au sein des CSH suite au traitement par le tamoxifène, la proportion de cellules souches diminue chez des souris adultes. Cependant, les auteurs ne trouvent pas d'impact de l'absence de Lis1 sur la prolifération et la mitose de ces cellules. L'étude par imagerie de la distribution de Numb, une protéine impliquée dans la polarisation des divisions cellulaires, révèle que la déficience en Lis1 accroît l'asymétrie des divisions cellulaires. Cette dérégulation de la symétrie des divisions accroît les processus de différenciation cellulaire et diminue ainsi la proportion de CSH (429). Ces deux publications démontrent donc l'importance de Lis1 dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. D'une part en régulant la répartition des chromosomes sur le plan métaphasique et d'autre part pour la redistribution équitable des protéines au sein des cellules en cours de division.

### 2. Rôles de Lis1 dans la fonction des lymphocytes B

Une publication faite en 2017 démontre le rôle de Lis1 dans la fonction des LB périphériques. Ces auteurs ont utilisé le modèle  $AID^{Cre} Lis1^{fl/fl}$  afin d'obtenir une déficience en Lis1 spécifiquement dans les LB activés. Le nombre de LB dans les centres germinatifs est fortement réduit suite à la délétion du gène *pafah1b1*. L'analyse par imagerie des cellules en

migration révèle que la déficience en Lis1 conduit à l'accumulation d'actine à l'uropode. Parce que l'uropode des cellules en migration présente une forte concentration en récepteurs BCR et en corécepteurs et que le cytosquelette est important dans la réponse à la stimulation, les auteurs ont analysé si la déficience en Lis1 affecte la signalisation induite par ces récepteurs. La phosphorylation d'AKT et de Erk est augmentée dans les LB AID<sup>Cre</sup> Lis1<sup>fl/fl</sup> MD4 transgéniques. Les auteurs montrent aussi que le cycle cellulaire est bloqué en mitose en absence de Lis1. L'apoptose des cellules est augmentée et conduit à la diminution de la proportion des LB activés. Lis1 a donc une fonction importante dans les LB en permettant un bon déroulement de la mitose suite à leur activation. Lis1 semble aussi essentielle dans la polarisation des cellules afin de permettre une signalisation et par conséquent une stimulation régulée (471).

### 3. Rôles de Lis1 dans la fonction des lymphocytes T

En 2016, Ngoi et al ont publié un article montrant les conséquences de la déficience conditionnelle de Lis1 dans les LT en utilisant un modèle CD4<sup>Cre</sup> Lis1<sup>fl/fl</sup>. Ce modèle conduit à la délétion du gène *pafah1b1* à partir du stade double positif du développement des LT. Le phénotypage de cette lignée démontre que l'absence de Lis1 n'affecte pas le développement des LT. En revanche, une forte lymphopénie a été mise en évidence avec une augmentation de la proportion des LT activés CD44<sup>hi</sup>. Des expériences de transfert adoptif de thymocytes SP matures Lis1<sup>fl/fl</sup> CD45.1 et de Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup> CD45.2 dans des souris receveuses montrent que les thymocytes déficients pour Lis1 migrent normalement vers les organes lymphoïdes secondaires. Cependant, la prolifération homéostatique des cellules en réponse à la stimulation par l'IL-7 est fortement impactée que ce soit dans le compartiment T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>. La déficience en Lis1 accroît l'apoptose des cellules en cours de prolifération lors de cette stimulation. La déficience en Lis1 affecte aussi prolifération des LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> induite suite à l'engagement des TCR. Néanmoins, les auteurs concluent que la déficience en Lis1 a un impact plus sévère sur la prolifération induite par l'IL-7 que sur celle induite par les TCR. L'analyse des résultats présentés suggère, par ailleurs, que la déficience en Lis1 affecte plus fortement la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> que celle des CD8<sup>+</sup> lors de l'engagement des TCR. *In vivo*, l'immunisation de souris OT-I par une forme de *Listeria monocytogenes* exprimant le peptide OVA montre que Lis1 n'affecte pas l'expansion initiale des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène et la production d'IFN $\gamma$  dans ce modèle. La production d'IFN $\gamma$  est aussi normale *in vitro* dans les cellules polarisées en Th1. En revanche, la déficience en Lis1 entraîne une diminution de LT CD8<sup>+</sup> mémoires suite à l'infection par *Listeria*. De plus, la stimulation

antigénique par le peptide OVA des LT CD8<sup>+</sup> OT-I naïfs en présence d'IL-15 ou IL-2 montre que les cellules déficientes pour Lis1 ne parviennent pas à se différencier en LT CD8<sup>+</sup> mémoires *in vitro*. Ces résultats suggèrent que Lis1 exercerait un effet sélectif sur la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> mémoire (472). Une autre étude montre que Lis1 est recrutée au sein de la synapse immunologique suite à la stimulation de cellules Jurkats par des CPA et des superantigènes SEE. Nde1 est essentielle au recrutement de Lis1 et de la dynéine à la synapse immunologique. L'absence de Nde1 affecte la formation de la synapse immunologique et entraîne une diminution de recrutement du centrosome à proximité de la synapse (473). Ce phénotype est similaire à celui observé dans un modèle de cellules Jurkats déficientes en une sous unité de la dynéine (159).

## OBJECTIFS DE LA THESE

THEMIS1 est une protéine de signalisation fortement impliquée dans les évènements de sélection positive et de sélection négative au sein du thymus (337-339). Bien que THEMIS1 soit recrutée aux complexes de signalisation par Grb2, mon équipe s'est intéressée à l'interactome de THEMIS1 dans le but de déterminer de nouveaux partenaires. Mon équipe d'accueil analysa l'interactome de THEMIS1 par spectrométrie de masse et par criblage double hybride. Parmi les partenaires de THEMIS1, sont détectées de nombreuses protéines de signalisation mais aussi la protéine Lis1 qui n'avait jamais été étudiée dans les LT (347)(Annexe1). Au début de mon doctorat, je me suis intéressé à cette interaction, et nous avons déterminé les domaines d'interaction entre ces deux protéines (Annexe 4). Cependant, afin de comprendre la fonction de l'interaction entre THEMIS1 et Lis1, nous nous sommes demandés si Lis1, comme THEMIS1, peut jouer un rôle au cours des sélections thymiques. L'analyse des conséquences de la déficience en Lis1 dans le développement thymique ne démontre pas d'effet de l'absence de Lis1 sur le développement des LT dans un modèle CD4<sup>Cre</sup>. Des analyses complémentaires confirment que la sélection positive ne sont pas affectés dans ce modèle. En revanche, comme Ngoi et al l'ont publié lors de mon doctorat, les conséquences sur la population des LT périphériques sont fortes avec une diminution conséquente de la proportion des LT périphériques. Les auteurs ont déterminé un fort impact de la prolifération des LT périphériques suite à la stimulation par IL-7 (472). Dans notre quête pour la compréhension de l'interaction entre THEMIS1 et Lis1, nous avons utilisé un modèle de déficience en Lis1 différents de Ngoi et al. En effet, le modèle CD4<sup>Cre</sup> semble conduire à une délétion trop tardive des gènes, et nous pensions que ce modèle ne nous permettrait pas de détecter d'éventuels défauts au cours des processus de sélection (244). Nous avons donc croisé des souris dans le but de créer une délétion de Lis1 dans les stades précoces du développement des LT. Dans ce modèle CD2<sup>Cre</sup>, nous remarquons une forte diminution de la cellularité thymique avec l'accumulation des cellules au cours des stades précoces du développement des LT. Manifestement, les deux modèles utilisés dans cette thèse ne nous ont pas permis de déterminer une éventuelle fonction de Lis1 dans les évènements de sélection. Par conséquent, nous nous sommes intéressés à comprendre le blocage du développement précoce des LT en absence de Lis1 et à déterminer les conséquences moléculaires du blocage de la prolifération des LT périphériques. Dans notre modèle, nous observons un blocage au cours des stades DN3 du développement des LT. Cependant, la  $\beta$ -sélection n'est pas affectée. Mais nous avons remarqué que la prolifération des thymocytes précoces est fortement altérée tout comme la prolifération des LT

périphériques. Par des analyses de cytométrie en image, nous observons une accumulation des cellules en cours de mitose avec la diminution des cellules en métaphase. Grâce à des analyses de microscopie confocale et de vidéo-microscopie, nous avons pu mettre en évidence un défaut au cours de la prométaphase de la mitose ainsi qu'au cours de l'anaphase. Cela conduit à la distribution inégale du matériel génétique au cours de l'anaphase, entraînant la formation de cellules filles n'ayant pas la même quantité d'ADN, lorsque les cellules parviennent à se séparer. Ce phénomène s'accompagne de l'apoptose importante des cellules pouvant expliquer l'absence de thymocytes aux stades DP et la forte diminution de LT périphériques.

# RESULTATS

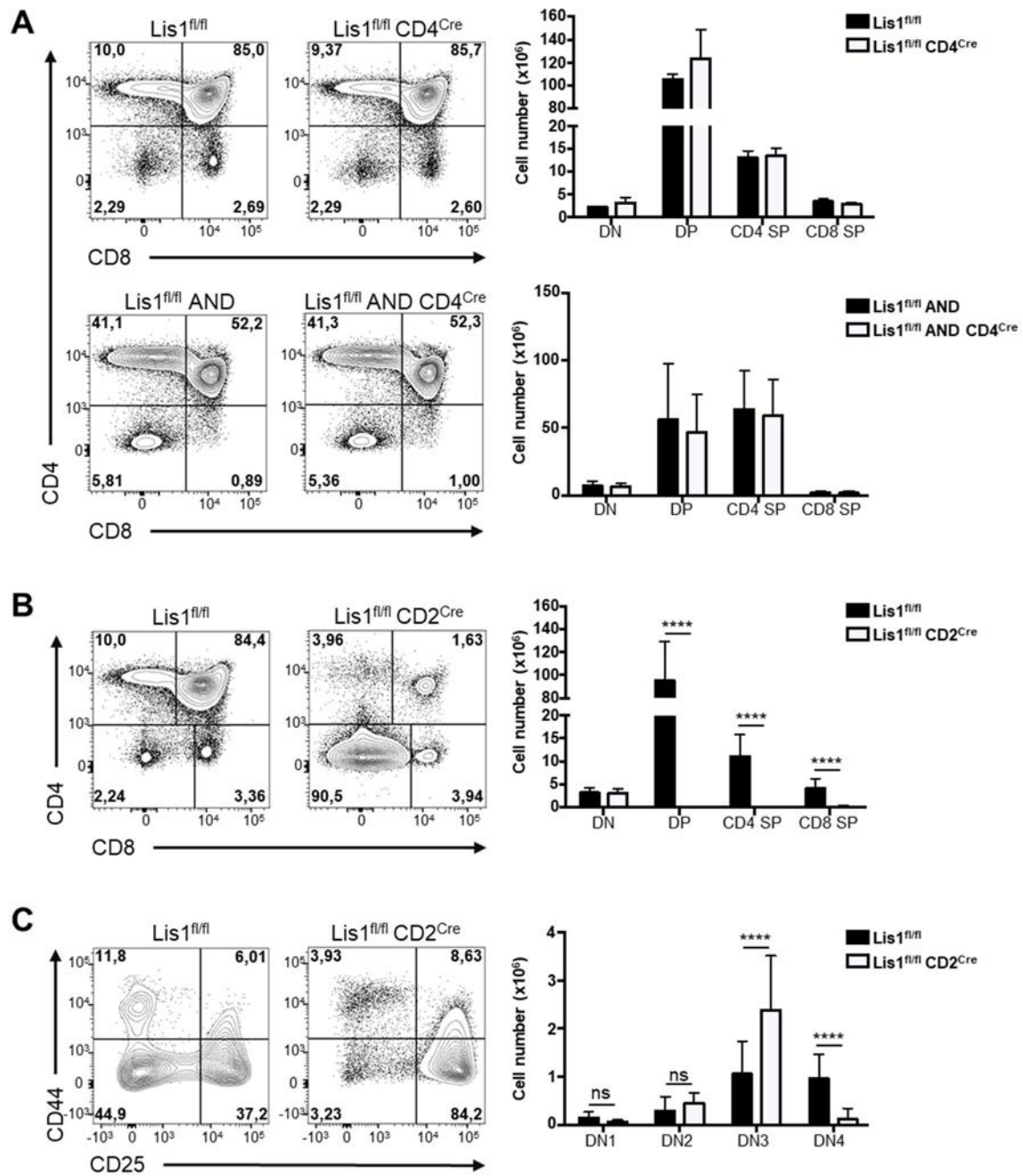
## **Lis1 est essentielle au développement précoce des lymphocytes T**

Pour analyser le rôle de Lis1 dans le développement des LT et la fonction potentielle de son interaction avec THEMIS1, nous avons croisé des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur CD2 ou CD4 avec des souris présentant dans leur génome deux séquences LoxP flanquant les exons 3 à 6 du gène *pafah1b1* (Fig. S1A)(403). La Cre recombinase est exprimée soit entre les stades DN1 et DN3, dans le modèle de souris transgénique CD2<sup>Cre</sup> (474-476), soit plus tardivement, entre les stades DN4 et DP, dans le modèle de souris transgénique CD4<sup>Cre</sup> (477). Dans les deux modèles, les animaux sont fertiles et ne présentent pas de signes cliniques apparents.

Confirmant une étude précédente réalisée dans un modèle similaire (472), nous montrons que la déficience en Lis1 dans les souris CD4<sup>Cre</sup> ne modifie pas la cellularité du thymus et la proportion des sous populations de thymocytes DN, DP, CD4-SP et CD8-SP (Fig. S1B et Fig. 1A). Les pourcentages de cellules SP CD24<sup>lo</sup> matures sont aussi normales dans ces souris (Fig. S1C). Nous observons également des proportions normales de cellules DP et SP exprimant un niveau élevé de TCR (TCR<sup>hi</sup>), suggérant que la déficience en Lis1 n'affecte pas la sélection positive (Fig. S1D). Pour confirmer cette observation, nous avons analysé la sélection positive des thymocytes CD4 SP dans des souris Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup> exprimant le TCR transgénique AND qui est restreint aux molécules du CMH-II. Confirmant nos conclusions précédentes, nous montrons que l'absence de Lis1 dans ces souris n'affecte pas le nombre et le pourcentage thymocytes CD4 SP (Fig. 1A). L'ensemble de ces résultats suggère que Lis1, contrairement à THEMIS1, n'est pas essentielle au développement tardif des thymocytes (87, 337-339).

Cependant, la délétion de Lis1 dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> conduit à une forte diminution de la cellularité du thymus et à une augmentation de la proportion de cellules DN (Fig. S1B et Fig. 1B). Le nombre absolu de cellules DN est similaire entre les souris Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup> et les animaux Lis1<sup>fl/fl</sup> alors que les populations DP et SP sont quasiment inexistantes, illustrant un blocage du développement précoce des LT (Fig. 1B). L'analyse de Lis1 par cytométrie en flux montre que les cellules DP et SP persistantes dans ce modèle expriment partiellement

ou totalement Lis1 suggérant qu'une partie ou que la totalité de ces cellules ait échappé à la délétion du gène codant Lis1 par la Cre recombinase (Fig. suppl. 2A). L'analyse des sous-populations DN dans les souris Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup>, indique une accumulation de cellules DN3 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>) et une diminution majeure du nombre de cellules DN4 (Fig. 1C). Contrairement aux animaux CD2<sup>Cre</sup> Lis1<sup>fl/fl</sup> qui présentent un phénotype sévère, les souris CD2<sup>Cre</sup> Lis1<sup>fl/+</sup> hétérozygotes qui ont une déficience partielle pour Lis1 n'entraîne pas d'anomalie significative du développement des LT (Fig. S2B). Ces résultats montrent que Lis1 est essentielle au développement précoce des LT. Comme la Cre recombinase dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> est également exprimée au stade précoce du développement des LB, nous avons aussi analysé l'effet de la déficience en Lis1 sur le développement de ces cellules. La déficience en Lis1 dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> conduit à une diminution drastique du nombre de LB en développement (B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup>) se traduisant par la diminution des cellules proB (B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> c-kit<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup>), preB (B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> c-kit<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup>) et LB immature (B220<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> c-kit<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup>) dans la moelle osseuse. La population des cellules précurseurs des LB (B220<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>) est diminuée mais légèrement en comparaison aux populations plus matures, suggérant que la perte de Lis1 dans ce modèle entraîne un blocage à ce stade de développement (Fig. S3).



**Figure 1 : Le développement précoce de lymphocytes T est affecté en absence de Lis1**

(A, B) Marquage de surface de CD4 et CD8 sur des thymocytes issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) et déficientes en Lis1 dans les modèles CD4<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>) et CD4<sup>Cre</sup> AND (Lis1<sup>fl/fl</sup> AND CD4<sup>Cre</sup>) (A) et CD2<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup>) (B). (C) Marquage de surface de CD44 et CD25 après gating sur la population thymique DN (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) issue de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) et déficientes dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup>). Les valeurs dans les cadres représentent les proportions de cellules au sein des principales populations thymiques. Les histogrammes regroupent les nombres absolus de cellules au sein des différentes populations. Ces figures totalisent deux (A), cinq (B) et huit expériences indépendantes (C) chacune constituée de 3 à 5 souris par groupe. \**p*<0.05 (Test non paramétrique de Mann-Whitney)



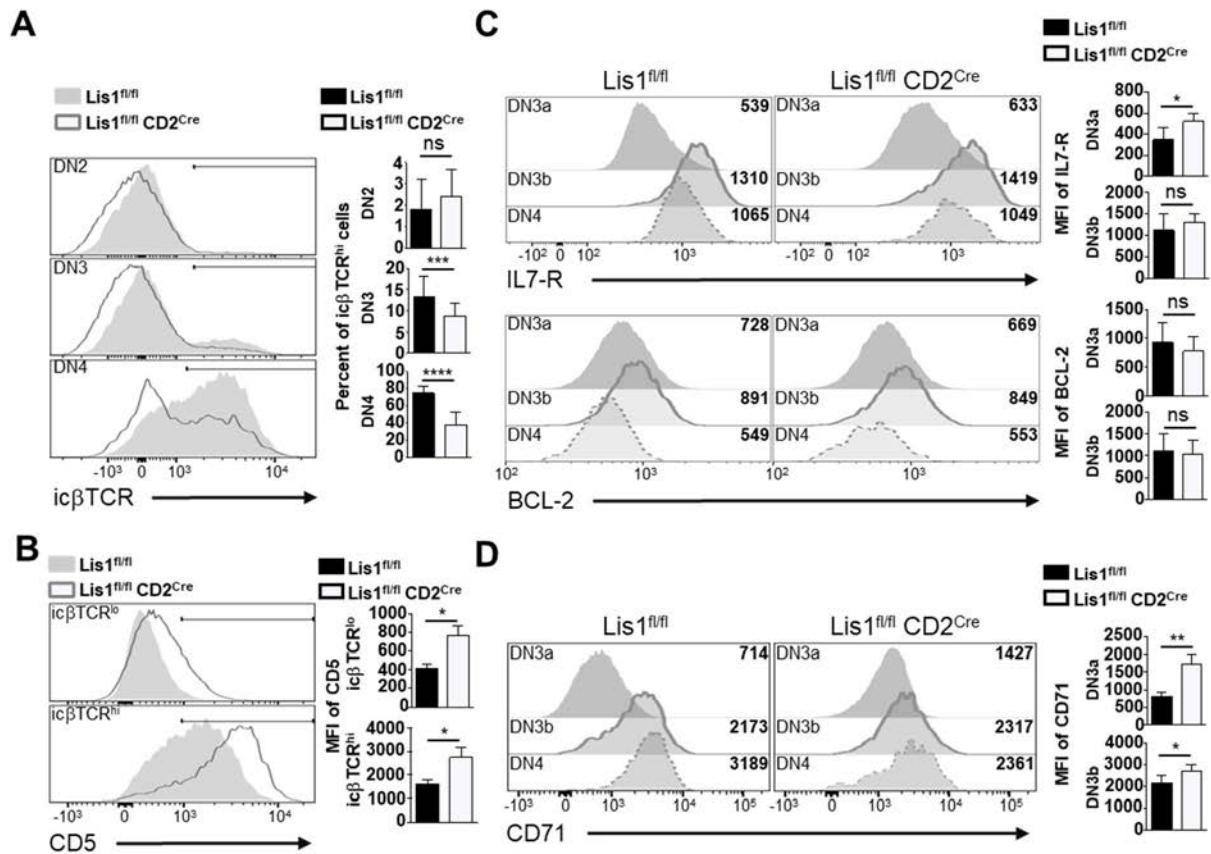


## **Lis1 n'est pas essentielle à la $\beta$ -sélection des thymocytes doubles négatifs**

La sélection  $\beta$  est une étape de transition essentielle entre les stades DN3 et DN4 entraînant la survie et la prolifération des thymocytes précoces ayant procédé à des réarrangements fonctionnels de la chaîne  $\beta$  du TCR (259-261). Pour évaluer le rôle de Lis1 dans ce processus, nous avons analysé l'expression intracellulaire de la chaîne  $\beta$  du TCR (ic $\beta$ TCR) par cytométrie en flux. Nous observons que la proportion de cellules DN3 et DN4 ic $\beta$ TCR<sup>+</sup> est diminuée de 30% et 50% respectivement dans les animaux Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup> en comparaison aux animaux contrôles. La déficience en Lis1 dans les cellules DN3 et DN4 ic $\beta$ TCR<sup>+</sup> n'affecte pas les niveaux d'expression de la chaîne  $\beta$  du TCR, suggérant que Lis1 n'est pas essentielle au réarrangement de la chaîne  $\beta$  dans ces cellules (Fig. 2A). L'expression d'une chaîne  $\beta$  fonctionnelle déclenche des événements de signalisation qui entraînent la prolifération et la survie des cellules. Pour déterminer l'effet de la déficience en Lis1 sur la signalisation déclenchée par la chaîne  $\beta$  des TCR, nous avons comparé l'expression de CD5, un corécepteur dont le niveau d'expression est corrélé à l'intensité des signaux délivrés par les pre-TCR et les TCR, sur les cellules DN3 exprimant ou non la chaîne  $\beta$  des TCR. L'expression de CD5 est augmentée sur les cellules DN3 ic $\beta$ TCR<sup>hi</sup> en comparaison aux cellules DN3 ic $\beta$ TCR<sup>lo</sup> conformément à ce qui a été décrit (478). Le niveau d'expression de CD5 est augmenté dans ces deux populations en absence de Lis1 indiquant que le blocage du développement des LT à ce stade ne résulte pas d'une diminution de la signalisation dans ces cellules (Fig. 2B).

Deux populations de thymocytes DN3 se distinguent. Les thymocytes DN3a (ic $\beta$ TCR<sup>lo</sup> CD5<sup>lo</sup>), n'expriment pas de chaîne  $\beta$  fonctionnelle et ont une faible capacité à survivre et à proliférer. Les thymocytes DN3b (ic $\beta$ TCR<sup>hi</sup> CD5<sup>hi</sup>) expriment une chaîne  $\beta$  et des niveaux élevés de protéines favorisant leur survie, leur prolifération et leur maturation telles que le récepteur à l'IL-7, la protéine BCL-2 ou le récepteur trophique CD71 (262). Nous observons que l'expression du récepteur à l'IL-7 et de BCL-2 est similaire entre les souris Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup> et Lis1<sup>fl/fl</sup> suggérant que les pre-TCR délivrent des signaux de survie et de maturation efficaces en absence de Lis1 (Fig. 2C). L'expression basale de CD71 est augmentée sur les cellules DN3a et DN3b déficientes en Lis1 en comparaison de ces mêmes populations cellulaires dans les souris contrôles, suggérant que les cellules parviennent à ajuster leur activité métabolique après la  $\beta$ -sélection (Fig. 2D). L'ensemble de ces données suggère que la

déficiences en Lis1 n'entraînent pas un blocage des événements moléculaires et cellulaires précoces liés au passage de la  $\beta$ -sélection.



**Figure 2 : La déficience en Lis1 n'affecte pas le déroulement de la β-sélection**

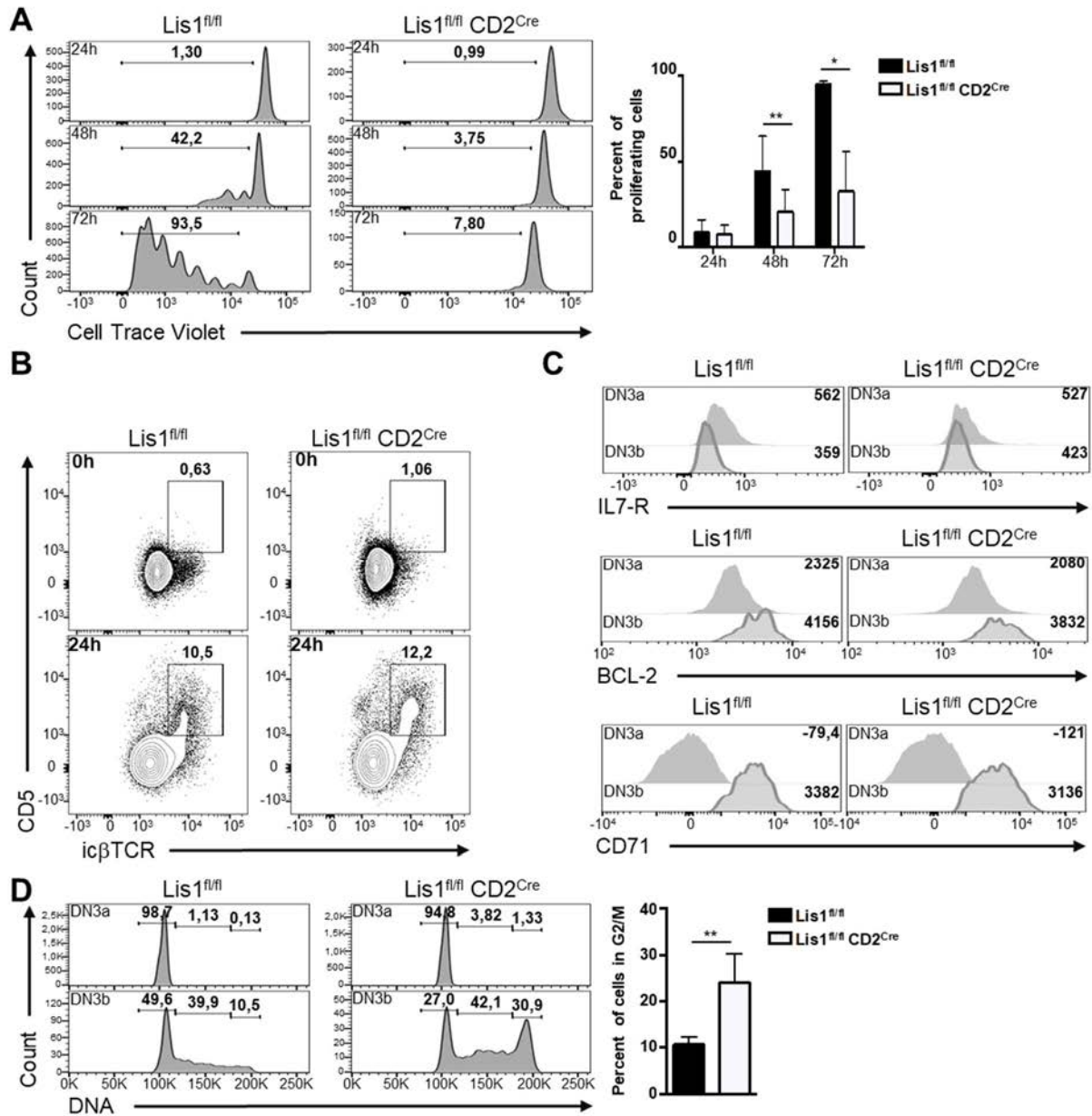
(A) Marquage intracellulaire du βTCR sur des thymocytes DN issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) et déficientes en Lis1 dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup>). Les histogrammes barres représentent les proportions de cellules icβTCR<sup>hi</sup> au sein des sous populations DN2 (CD44<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>), DN3 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>) et DN4 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>). Les droites tracées sur les histogrammes FACS intègrent les populations icβTCR<sup>hi</sup>. (B) Marquage de surface de CD5 sur des thymocytes DN3 icβTCR<sup>hi</sup> et DN3 icβTCR<sup>lo</sup> issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) et déficientes en Lis1 dans les modèles CD2<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup>). Les droites tracées sur les histogrammes FACS intègrent les populations CD5<sup>hi</sup>. Les histogrammes barres représentent les valeurs de MFI de CD5 au sein des sous populations DN3 icβTCR<sup>hi</sup> et DN3 icβTCR<sup>lo</sup>. (C, D) Marquage de surface de IL7-R, BCL-2 et CD71 sur des thymocytes DN3a (icβTCR<sup>lo</sup> CD5<sup>lo</sup>), DN3b (icβTCR<sup>hi</sup> CD5<sup>hi</sup>) et DN4 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) et déficientes en Lis1 dans les modèles CD2<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup>). Les histogrammes barres représentent les valeurs de MFI au sein des sous populations DN3a et DN3b. Les valeurs inscrites sur les histogrammes FACS représentent les valeurs de MFI des marqueurs correspondants. Ces résultats totalisent cinq (A), deux (B,C) et trois expériences indépendantes (D) chacune constituée de 3 à 4 souris par groupe. \**p*<0.05 (Test non paramétrique de Mann-Whitney)



### **Lis1 est essentielle à la prolifération des thymocytes DN3 après la $\beta$ -sélection**

Nous avons ensuite évalué le rôle de Lis1 dans les événements de prolifération qui suivent la  $\beta$ -sélection. Dans ce but, des thymocytes DN3a ont été isolés par FACS, marqués au Cell Trace Violet (CTV) et mis en culture sur une lignée de cellules stromales OP9 exprimant le ligand NOTCH DLL-1. La figure 3A montre que la déficience en Lis1 entraîne une diminution majeure du pourcentage de cellules en cours de prolifération. L'expression de la chaîne  $\beta$  du TCR, de CD5, de CD71, de IL7-R et de BCL-2 est similaire dans les thymocytes  $Lis1^{fl/fl} CD2^{Cre}$  et les thymocytes contrôles  $Lis1^{fl/fl}$ , confirmant que la signalisation induite par les pre-TCR n'est pas affectée par l'absence de Lis1 (Fig. 3B et Fig. 3C). Nous avons ensuite déterminé si Lis1 était importante pour le déroulement normal du cycle cellulaire en marquant l'ADN par du DAPI. L'analyse montre que la déficience en Lis1 entraîne une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire (Fig. 3D), indiquant un blocage des cellules au cours du cycle cellulaire. Ces résultats suggèrent que Lis1 est essentielle à l'expansion des cellules DN3 après la sélection  $\beta$ .





**Figure 3 : La prolifération des thymocytes DN est compromise par l'absence de Lis1**

(A) Analyse de la prolifération des cellules DN3 mis en culture sur lignée OP9 DLL-1 issues d'un pool de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) ou déficientes en Lis1 dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup>) après 24h, 48h et 72h. Les droites sur l'histogramme FACS représentent les populations en prolifération. L'histogramme barre résume les proportions de cellules en prolifération. (B) Marquage intracellulaire de  $\beta$ TCR et marquage de surface de CD5 des cellules DN3 Lis1<sup>fl/fl</sup> et Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup> mis en culture sur lignée OP9 DLL-1. Le cadran démarque les cellules DN3b (ic $\beta$ TCR<sup>hi</sup> CD5<sup>hi</sup>) et les nombres les proportions de cellules DN3b au sein de la population DN3. (C) Marquage de surface de IL7-R, BCL-2 et CD71 des DN3a (ic $\beta$ TCR<sup>lo</sup> CD5<sup>lo</sup>) et DN3b (ic $\beta$ TCR<sup>hi</sup> CD5<sup>hi</sup>) après 24h de culture des cellules DN3 Lis1<sup>fl/fl</sup> et Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup> sur lignée OP9 DLL-1. Les valeurs indiquées sur les histogrammes FACS correspondent aux valeurs de MFI du marqueur correspondant. (D) Marquage de l'ADN par DAPI des cellules DN3a (ic $\beta$ TCR<sup>lo</sup> CD5<sup>lo</sup>) et DN3b (ic $\beta$ TCR<sup>hi</sup> CD5<sup>hi</sup>) après 48h de culture des cellules DN3 Lis1<sup>fl/fl</sup> et Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup> sur lignée OP9 DLL-1. Les droites sur les histogrammes FACS déterminent la

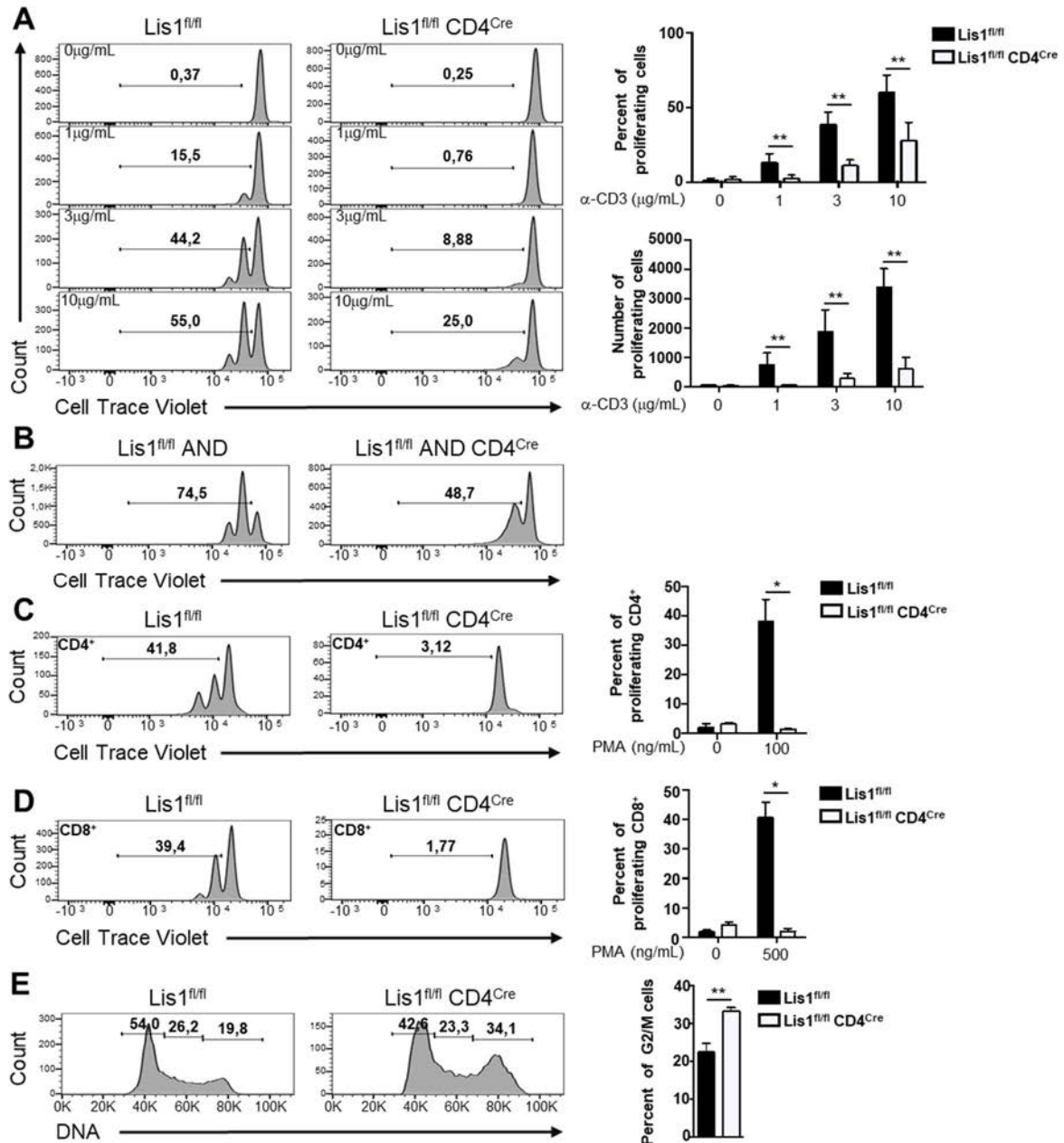


population en phase G0/G1 (100K), S (150K) et G2/M (200K) du cycle cellulaire. Les nombres indiqués représentent les proportions de cellules G0/G1, S et G2/M. L'histogramme barre résume la proportion de cellules G2/M au sein de la population DN3b. Les figures **(A)** et **(D)** totalisent sept et six expériences indépendantes respectivement. Les figures **(B)** et **(C)** sont représentatives de quatre et trois expériences indépendantes respectivement. \* $p < 0.05$  (t-test avec correction de Welch)

## Lis1 régule la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques

Nos résultats indiquent que Lis1 joue un rôle majeur dans la prolifération des thymocytes induite par le pre-TCR. Or une étude récente utilisant des souris Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup> suggère que la déficience en Lis1 n'a qu'un effet modéré sur la prolifération des LT périphériques induite après engagement des TCR (472). Pour déterminer si Lis1 agit plus sélectivement sur la prolifération des thymocytes, nous avons analysé l'effet de la déficience en Lis1 sur la prolifération des LT périphériques. Confirmant l'analyse précédente dans les souris Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>, nous montrons que la déficience en Lis1 dans ce modèle entraîne une diminution majeure du nombre de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans les organes lymphoïdes secondaires. La déficience en Lis1 dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> conduit à un phénotype similaire (Fig. S4A et Fig. S4B). Néanmoins, l'expression de Lis1 dans les LT périphériques issus de ces souris est comparable à celle observée les LT contrôles, révélant une nouvelle fois que les LT qui parviennent à se développer dans ces souris échappent à l'effet de la Cre recombinase sur le gène codant Lis1 (résultats non montrés). Nous avons donc utilisé le modèle CD4<sup>Cre</sup> pour étudier l'effet de Lis1 sur la prolifération des LT périphériques. Des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ont été isolés, marqués au CTV et stimulés par des anticorps anti-CD28 et anti-CD3. La dilution du CTV montre que l'absence de Lis1 dans ces cellules entraîne une diminution majeure de la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> périphériques (Fig. 4A) mais n'a pas d'impact détectable sur la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> périphériques (Fig. S5A). La prolifération des LT CD4<sup>+</sup> exprimant le TCR transgénique AND est aussi fortement bloquée en absence de Lis1 lorsque les cellules sont stimulées par des cellules présentatrices d'antigènes chargées avec des peptides de MCC (Moth cytochrome C) spécifique du TCR AND (Fig. 4B). L'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD25 est normale dans les LT CD4<sup>+</sup> déficients pour Lis1 après 24h de stimulation, indiquant que Lis1 n'est pas essentielle aux signaux précoces d'activation délivrés par les TCR (Fig. S5B). De plus, la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> est fortement diminuée en absence de Lis1 lorsque les cellules sont stimulées par de la PMA/ionomycine, suggérant un rôle de Lis1 en aval des voies de signalisation déclenchées par les TCR (Fig. 4C). La prolifération des LT CD8<sup>+</sup> est également fortement diminuée en absence de Lis1 lorsque les cellules sont stimulées avec de la PMA/ionomycine, montrant que la déficience en Lis1 a un impact différent sur la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> selon le type stimulation utilisé (Fig. 4D). Nous avons ensuite analysé l'effet de la déficience en Lis1 sur le cycle cellulaire. Comme pour les thymocytes, nous montrons que la déficience en Lis1 dans les LT CD4<sup>+</sup> entraîne une accumulation des cellules en phase G2/M (Fig. 4E). En

conclusion, nos résultats suggèrent que, à l'instar des thymocytes, la prolifération des LT périphériques est fortement diminuée en absence de Lis1.



**Figure 4 : La déficience en Lis1 affecte la prolifération des LT périphériques**

(A,C) Analyse de la prolifération après 48h de culture en présence d'anticorps anti-CD28 et anti-CD3 (A) ou de PMA/ionomycine (C) de LT CD4<sup>+</sup> issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) ou déficientes en Lis1 dans le modèle CD4<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>). Les concentrations indiquées en (A) sur les histogrammes FACS indiquent la concentration d'anti-CD3 utilisée. Les histogrammes barres présentent la proportion de cellules en prolifération. (B) Analyse de la prolifération après 48h de culture sur lignée de cellules P13.9 chargées de peptide MCC de LT CD4<sup>+</sup> AND issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup> AND) ou déficientes en Lis1 dans le modèle CD4<sup>Cre</sup> AND (Lis1<sup>fl/fl</sup> AND CD4<sup>Cre</sup>). (D) Analyse de la prolifération après 48h de culture en présence de PMA/ionomycine de LT CD8<sup>+</sup> issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) ou déficientes en Lis1 dans le modèle CD4<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>). (A, B, C, D) Les droites tracées sur les histogrammes FACS délimitent la population de cellules en prolifération et les nombres inscrits correspondent à la proportion de cellules en prolifération. (E) Marquage de l'ADN par DAPI des LT

CD4<sup>+</sup> stimulés 48h en présence d'anti-CD28 et anti-CD3. Les droites sur les histogrammes FACS déterminent la population G0/G1 (40K), S (60K) et G2/M (80K). Les nombres indiqués représentent les proportions de cellules G0/G1, S et G2/M. L'histogramme barre résume la proportion de cellules G2/M au sein de la population LT CD4<sup>+</sup>. **(A, C, D)** Les données totalisent deux expériences indépendantes. La figure **(E)** représente une expérience parmi deux et la figure **(B)** n'est représentative que d'une souris. \* $p < 0.05$  (t-test avec correction de Welch)

## **Lis1 régule la redistribution des chromosomes lors de la mitose dans les lymphocytes T**

Nos résultats précédents indiquent que la déficience en Lis1 entraîne un blocage des LT en phase G2 ou en mitose (M) du cycle cellulaire. Pour déterminer plus spécifiquement la phase du cycle cellulaire dans laquelle les cellules sont bloquées, des LT CD4<sup>+</sup> ont été stimulés sur des plaques adsorbées d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 puis marqués avec du DAPI et analysés par imagerie en flux. Le paramètre « Bright Detail intensity» (BDI) qui permet d'évaluer l'état de condensation de l'ADN a été utilisé pour discriminer les cellules en G2 des cellules en phase M (pour plus de détails voir la section matériels et méthodes). Nous observons que la déficience en Lis1 dans les LT CD4<sup>+</sup> entraîne une accumulation des cellules en cours de mitose, suggérant un blocage au cours de ce processus (Fig. 5A et Fig. S6C). En utilisant une approche similaire, nous avons ensuite analysé plus spécifiquement l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique, un processus qui implique une participation active des moteurs moléculaires sur les microtubules (440, 441). Des LT CD4<sup>+</sup> ont été stimulés sur des plaques adsorbées d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pendant 48h. Après 24h de culture, les cellules ont été synchronisées au nocodazole. Après synchronisation, le nocodazole a été éliminé et les cellules ont été traitées au MG132 pour les stabiliser en métaphase (436). Les cellules sont ensuite analysées par imagerie en flux, après marquage de l'ADN, en utilisant le paramètre « elongatedness » qui calcule le rapport de la longueur et de la largeur d'un masque DAPI et permet ainsi d'isoler les cellules en métaphase. Nous remarquons une forte diminution des cellules avec une valeur supérieure à 1.5 lorsque les cellules mises en culture sont déficientes en Lis1 (Fig. 5B et Fig. S6D). L'analyse des résultats montre que la déficience en Lis1 entraîne une diminution du pourcentage de cellules en métaphase, suggérant que Lis1 est importante pour la réorganisation des chromosomes au cours de la mitose. Pour déterminer le rôle de Lis1 sur la dynamique de redistribution des chromosomes, nous avons analysé la division des LT CD4<sup>+</sup> par vidéo-microscopie. Les cellules ont été mises en culture pendant 24h dans des chambres adsorbées d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 puis l'ADN a été marqué avec du Hoechst. Les images ont ensuite été acquises au spinning disk pendant 18h et traitées par ImageJ pour le montage des vidéos. Nous constatons que la durée moyenne des mitoses est augmentée en absence de Lis1 (Fig. 5C). Par ailleurs, nous observons que les mitoses sont souvent interrompues dans les cellules déficientes en Lis1 et qu'elles conduisent parfois à l'émergence de deux ou trois cellules filles avec une asymétrie apparente de la distribution du matériel génétique et la présence de noyaux multilobés. La présence de noyaux

multilobés dans la phase S et G2 des LT CD4<sup>+</sup> déficients en Lis1 ainsi que l'augmentation de la phase subG1 confirme que la déficience en Lis1 conduit à la mauvaise organisation des chromosomes et par conséquent à la mauvaise division des cellules (Fig. S6E). L'ensemble de ces données montre que Lis1 est essentielle au déroulement normal de la mitose et régule la répartition ordonnée du matériel génétique au sein des LT.

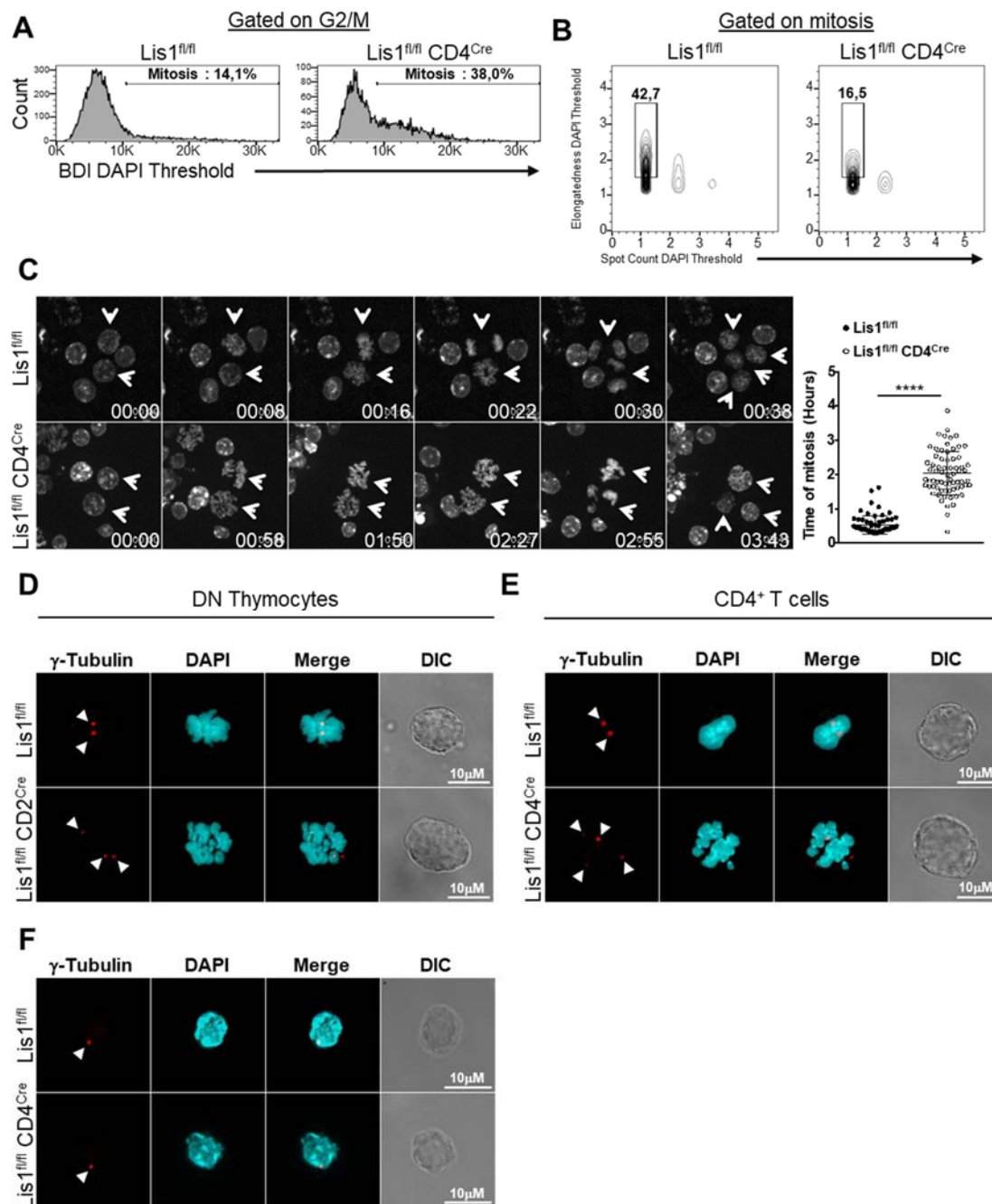
La désorganisation des chromosomes peut être la conséquence d'un dysfonctionnement des centrosomes qui sont responsables de la mise en place des fuseaux mitotiques au cours de la mitose (479, 480). Au cours de la phase S, les centrosomes se dupliquent et se séparent au cours de la phase G2 pour démarrer la mitose (481). Pour examiner le rôle de Lis1 dans ce processus, nous avons d'abord analysé le nombre de centrosomes dans des thymocytes DN3b en mitose isolés du thymus *ex-vivo*. Nous observons qu'une proportion accrue de cellules contient un nombre anormalement élevé de centrosomes dans les thymocytes déficients en Lis1. Nous avons ensuite analysé le nombre de centrosomes dans des LT CD4<sup>+</sup> stimulés par des anticorps anti-CD3. Pour déterminer si l'effet exercé par Lis1 sur les centrosomes est concomitant à la division cellulaire nous avons comparé les LT CD4<sup>+</sup> blastique en cours de division (FSC<sup>hi</sup>) et non-blastique (FSC<sup>lo</sup>). Nous montrons que la déficience en Lis1 n'affecte pas le nombre de centrosomes retrouvé dans les LT CD4<sup>+</sup> non blastique (Fig. 5F). En revanche, une fraction importante des LT CD4<sup>+</sup> FSC<sup>hi</sup> déficients pour Lis1 contient un nombre de centrosomes supérieur à deux. De plus, ces centrosomes ne sont pas organisés au sein des cellules en mitose déficientes en Lis1 au contraire des cellules contrôles (Fig. 5E). Ces résultats suggèrent que le défaut d'alignement des chromosomes peut être la conséquence de l'amplification et de la désorganisation des centrosomes.

La réorganisation des chromosomes, l'amplification et la redistribution des centrosomes dépendent du complexe dynéine qui recrute des protéines adaptatrices sur ces organites cellulaires par l'intermédiaire du complexe dynactine (381). Des études précédentes suggèrent que Lis1 régule le transport des organites cellulaires par le complexe dynéine en favorisant son interaction avec la dynactine (444, 449)(388). Pour déterminer si Lis1 exerce un effet similaire dans les LT, nous avons analysé la co-immunoprécipitation de p150<sup>glued</sup>, une sous unité de la dynactine, avec la chaîne intermédiaire de la dynéine dans des LT exprimant ou non Lis1, stimulés pendant 48h. Nous observons que l'interaction entre la dynéine et la dynactine est fortement diminuée dans les LT déficients pour Lis1 en comparaison aux LT contrôles. Ces résultats montrent que Lis1 stabilise l'interaction de la

dynéine avec la dynactine dans les LT. Ils suggèrent que Lis1 contribue au déroulement normal des mitoses dans ces cellules en régulant la formation des complexes dynéine/dynactine qui sont essentiels au transport des structures cellulaires telles que les centrosomes et les chromosomes (Fig. S7).







**Figure 5 : Le déroulement de la mitose est affecté par la déficience en Lis1**

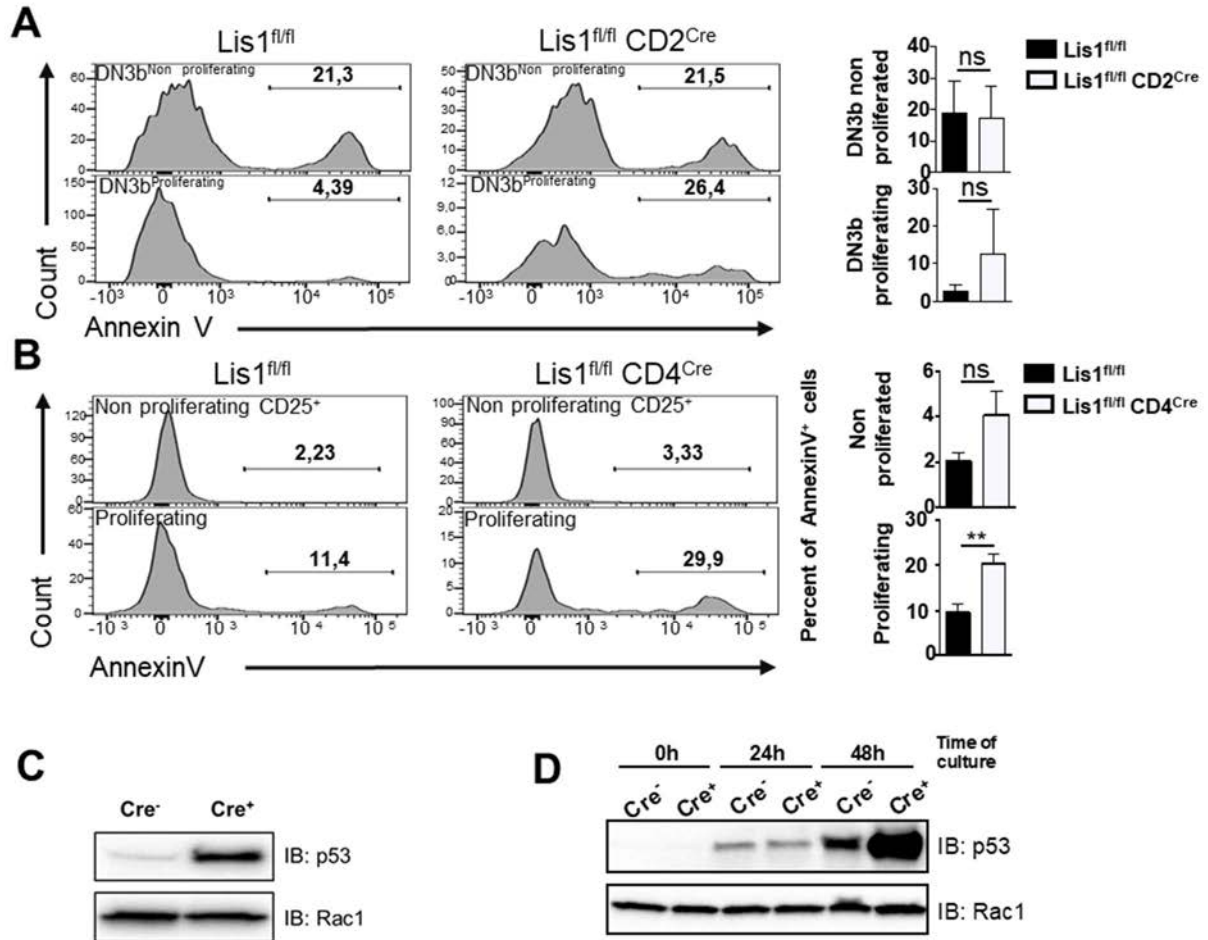
(A, B) Représentation issue de l'acquisition de LT CD4<sup>+</sup> mis en culture issus de souris contrôles (*Lis1<sup>fl/fl</sup>*) et déficientes en *Lis1* dans les modèles *CD4<sup>Cre</sup>* (*Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>*). (A) Histogramme représentant le paramètre « Bright Detail Intensity » de LT CD4<sup>+</sup> *Lis1<sup>fl/fl</sup>* et *Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>* en phase G2/M après 48h de culture en présence d'anticorps anti-CD28 et anti-CD3. Les droites sur les histogrammes délimitent les populations en mitose (BDI<sup>hi</sup>) et les valeurs correspondent aux proportions de cellules en mitose au sein de la population de cellules en phase G2/M. Ce résultat est représentatif de deux expériences avec acquisition d'environ 30,000 cellules dans la population G2/M. Chaque expérience est constituée d'une souris par génotype. (B) Représentation en dot-plot des paramètres « Elongatedness » et « Spot count » des LT CD4<sup>+</sup> *Lis1<sup>fl/fl</sup>* et *Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>* en mitose après 24h de culture en présence d'anticorps anti-CD28 et anti-CD3 suivie de la synchronisation par le nododazole et MG132. Le cadran

représente la population de cellules de valeur « Elongatedness » haute et constituée d'un seul noyau. Les valeurs indiquent la proportion de cellules en métaphase au sein de la population de mitose. Ce résultat est représentatif de deux expériences avec acquisition d'environ 5000 cellules dans la population en mitose (BDI<sup>hi</sup>). Chaque expérience est constituée d'une à trois souris par groupe. **(C)** Time-lapse représentant les noyaux marqués au Hoechst des cellules en mitose après culture en présence d'anticorps anti-CD28 et anti-CD3 de LT CD4<sup>+</sup> issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) et déficientes en Lis1 dans le modèle CD4<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>). Le temps indiqué sur chaque image est au format H : min. Les flèches pointent les cellules en cours de mitose. L'histogramme représente le temps de mitose en heure de chaque cellule observée. Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes chacune constituée d'une souris par génotype. \**p*<0.05 (Test non paramétrique de Mann-Whitney) **(D, E, F)** Maximum Intensity Projection de Z-stacks obtenus au microscope confocal après marquage du centrosome par la  $\gamma$ -tubuline et du noyau par le DAPI de cellules DN3b **(D)** et de LT CD4<sup>+</sup> stimulés 48h en présence d'anticorps anti-CD28 et anti-CD3 et triées FSC<sup>hi</sup> **(D)** et FSC<sup>lo</sup> **(E)**. Les figures **(D, E, F)** sont représentatives de deux expériences chacune dans laquelle ont été acquises 20 à 50 cellules.

## **La perte de Lis1 favorise l'apoptose des cellules en cours de prolifération**

La répartition des chromosomes lors de la métaphase est soumise à un point de contrôle qui vérifie le bon alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique pour une répartition ordonnée du matériel génétique (423). La formation de cellules contenant des quantités anormales de matériel génétique conduit aussi à l'expression de facteurs pro-apoptotiques entraînant la mort des cellules (482). L'analyse du marquage AnnexinV dans des thymocytes DN3a stimulés par des cellules OP9 DLL1 montre que la déficience en Lis1 entraîne un accroissement de la fréquence des cellules en apoptose lorsque les cellules ont été engagées dans des cycles de divisions cellulaires (CTV<sup>lo</sup>). En revanche le pourcentage de cellules en apoptose est comparable dans les thymocytes activées (CD5<sup>hi</sup>) qui n'ont pas encore été engagés dans des divisions cellulaires (CTV<sup>hi</sup>) (Fig. 6A). De la même façon, les LT CD4<sup>+</sup> stimulés par des anticorps anti-CD3 ayant subi des cycles de divisions cellulaires sont davantage en apoptose que les mêmes populations cellulaires dans les souris contrôles (Fig. 6B). Par contre, la déficience en Lis1 n'a pas d'impact significatif sur la mortalité cellulaire dans les cellules activées (CD25<sup>hi</sup>) mais non divisées. Le mauvais déroulement de la mitose et la mauvaise répartition du matériel génétique déclenche l'expression de p53 conduisant à l'apoptose des cellules (482). Nous montrons que l'expression de p53 est augmentée dans les thymocytes DN de souris déficientes en Lis1 dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> (Fig. 6C). De plus, l'expression de p53 dans les LT CD4<sup>+</sup> déficients pour Lis1 est augmentée par rapport aux LT contrôles après 48h de stimulation (Fig. 6D). L'ensemble de ces données démontre que Lis1 prévient la mort cellulaire des thymocytes et des LT en contribuant à la réorganisation des chromosomes et des centrosomes lors de la mitose.

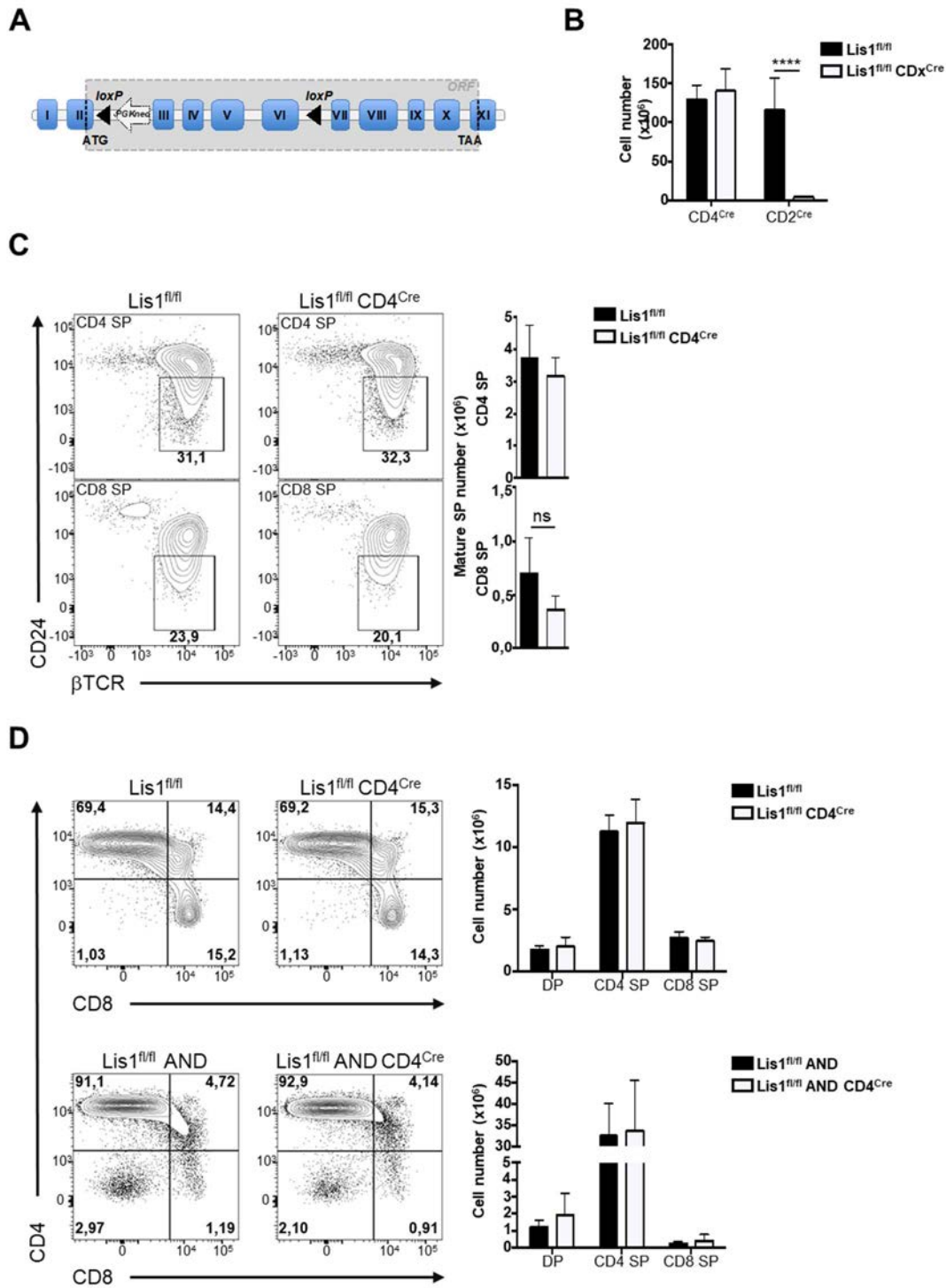




**Figure 6 : La perte de Lis1 favorise l'apoptose des cellules en prolifération**

(A, B) Marquage de surface par AnnexinV sur un pool de thymocytes DN3b (CD5<sup>hi</sup>) issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) ou déficientes en Lis1 dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup>) après culture sur lignée OP9 (A) et de LT CD4<sup>+</sup> issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) et déficientes en Lis1 dans les modèles CD4<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>) (B). Les droites sur les histogrammes FACS délimitent les populations AnnexinV<sup>+</sup> et les valeurs représentent la proportion de cellules positives pour l'annexinV au sein de la population DN3a, DN3b et DN4 (A) ou LT CD4<sup>+</sup> (B). Les histogrammes barres représentent la proportion de cellules positives pour l'AnnexinV. (C, D) Westernblot révélant l'expression de p53 au sein des DN totaux (C) et de LT CD4<sup>+</sup> stimulés de 0 à 48h (D). Rac1 a été utilisée comme contrôle de quantité. (A, B) Ces figures totalisent trois (A) et une (B) expériences indépendantes. (C, D) Ces données sont représentatives de deux expériences indépendantes. \**p*<0.05 (t-test avec correction de Welch)



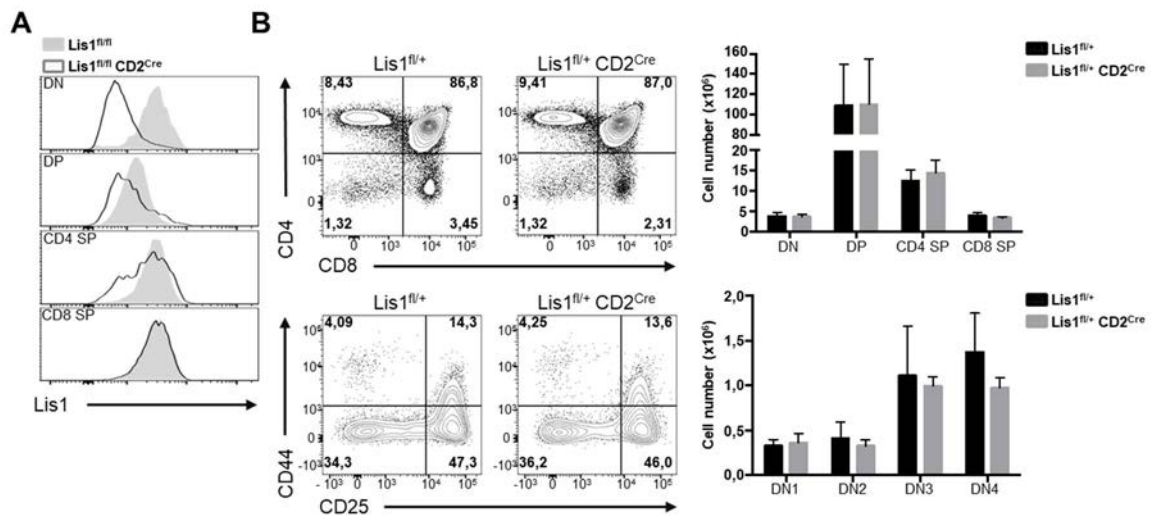


**Figure Supplémentaire 1 : Le développement précoce des LT n'est pas affecté par la déficience en Lis1**

(A) Représentation non à l'échelle du gène *pafah1b1* flanqué de deux séquences LoxP entre l'exon 3 et l'exon 6. (B) Quantification du nombre total de thymocytes au sein de thymus issus de souris contrôles ( $Lis1^{fl/fl}$ ) et déficientes en Lis1 dans les modèles  $CD4^{Cre}$  ( $Lis1^{fl/fl} CD4^{Cre}$ ) et  $CD2^{Cre}$  ( $Lis1^{fl/fl} CD2^{Cre}$ ). Résultats représentatifs de deux et huit expériences indépendantes.  $*p < 0.05$  (Test non paramétrique de Mann-Whitney). (C) Marquage de surface de CD24 et  $\beta$ TCR sur des thymocytes



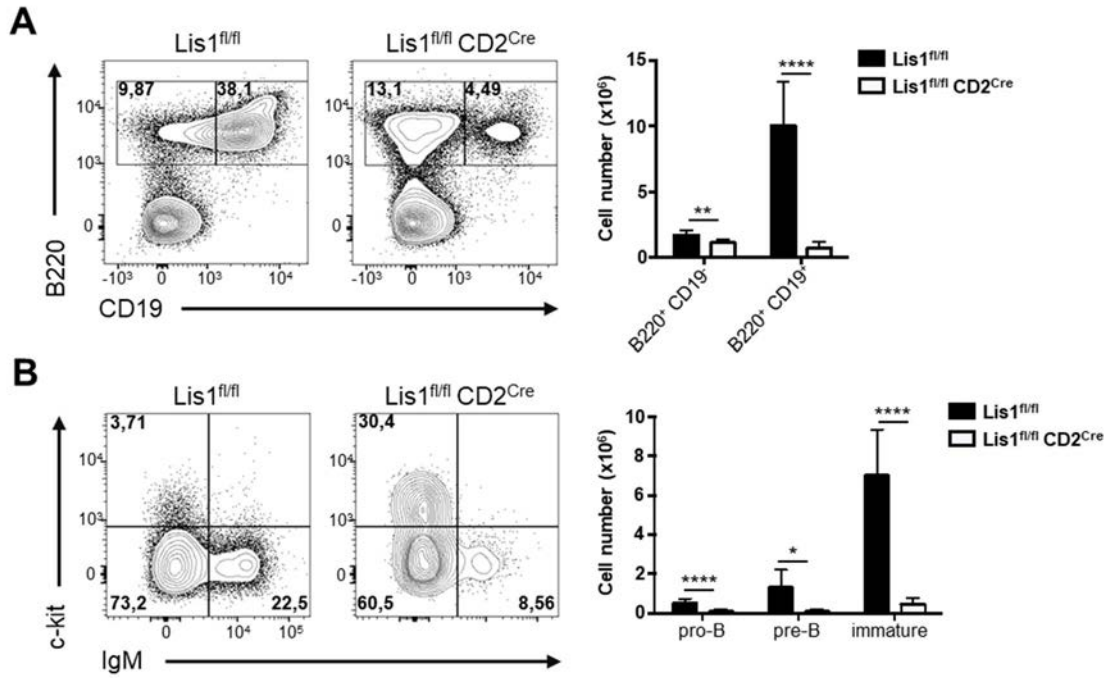
issus de souris contrôles ( $Lis1^{fl/fl}$ ) et déficientes en Lis1 dans le modèle  $CD4^{Cre}$  ( $Lis1^{fl/fl} CD4^{Cre}$ ). Les cadrans délimitent les populations de thymocytes CD4 SP matures et CD8 SP matures. Les valeurs indiquées caractérisent la proportion de cellules matures au sein des populations SP. Les histogrammes barres représentent les nombres absolus de CD4 SP matures et CD8 SP matures. **(D)** Marquage de surface de CD4 et CD8 sur des thymocytes  $TCR^{hi}$  issus de souris contrôles ( $Lis1^{fl/fl}$ ) et déficientes en Lis1 dans les modèles  $CD4^{Cre}$  ( $Lis1^{fl/fl} CD4^{Cre}$ ) et  $CD4^{Cre} AND$  ( $Lis1^{fl/fl} AND CD4^{Cre}$ ). Les valeurs dans les cadrans représentent les proportions de cellules au sein des principales populations thymiques. Les histogrammes barres représentent les nombres absolus de cellules au sein des différentes populations thymiques. **(C, D)** Ces expériences totalisent deux expériences indépendantes. \* $p < 0.05$  (Test non paramétrique de Mann-Whitney)



**Figure Supplémentaire 2 : Le développement précoce des LT n'est pas affecté par la perte partielle de Lis1**

(A) Marquage intracellulaire de Lis1 de thymocytes issus de souris contrôles ( $Lis1^{fl/fl}$ ) et déficientes en Lis1 dans le modèle  $CD2^{Cre}$  ( $Lis1^{fl/fl} CD2^{Cre}$ ). (B) Marquage de surface de CD4 et CD8 (en haut) et de CD44 et CD25 (en bas) sur des thymocytes issus de souris contrôles ( $Lis1^{fl/+}$ ) et hétérozygotes en Lis1 dans les modèles  $CD2^{Cre}$  ( $Lis1^{fl/+} CD2^{Cre}$ ). Les valeurs dans les cadrans représentent les proportions de cellules au sein des principales populations thymiques. Les histogrammes barres représentent les nombres absolus de cellules au sein des différentes populations thymiques.

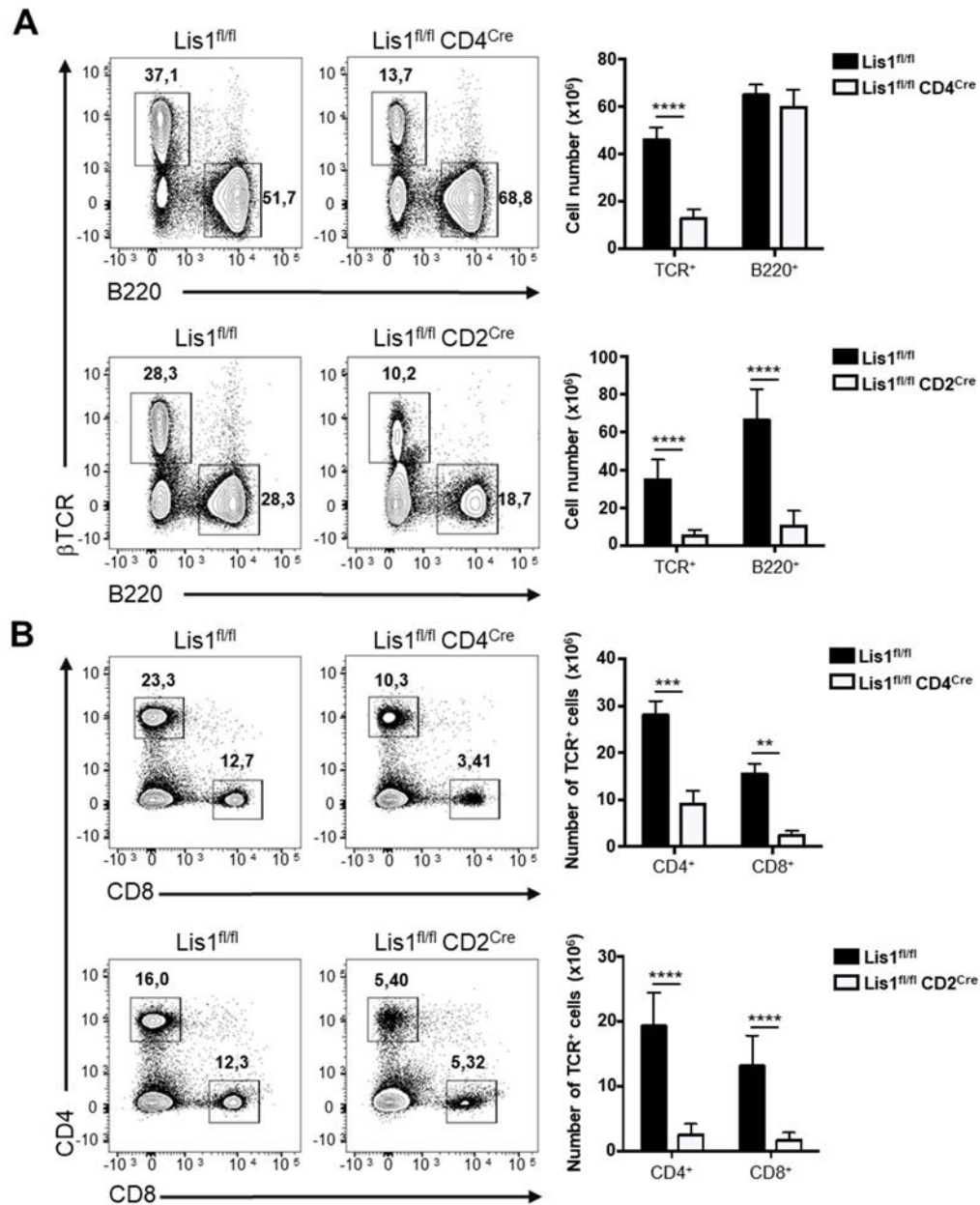




**Figure Supplémentaire 3 : Le développement des LB est fortement affecté par l'absence de Lis1**

(A) Marquage de surface de B220 et CD19 sur des cellules issues de moelle osseuse de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) et déficientes en Lis1 dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup>). Les valeurs dans les cadrans représentent les proportions de cellules au sein des principales populations. L'histogramme barre représente les nombres absolus de cellules au sein des différentes populations de la moelle osseuse. (B) Marquage de surface de c-kit et IgM sur des cellules B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> issues de moelle osseuse de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) et déficientes en Lis1 dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD2<sup>Cre</sup>). Les valeurs dans les cadrans représentent les proportions de cellules au sein des différentes sous populations. L'histogramme barre représente les nombres absolus de cellules au sein des différentes populations de la moelle osseuse. Ces expériences totalisent 2 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$  (Test non paramétrique de Mann-Whitney)

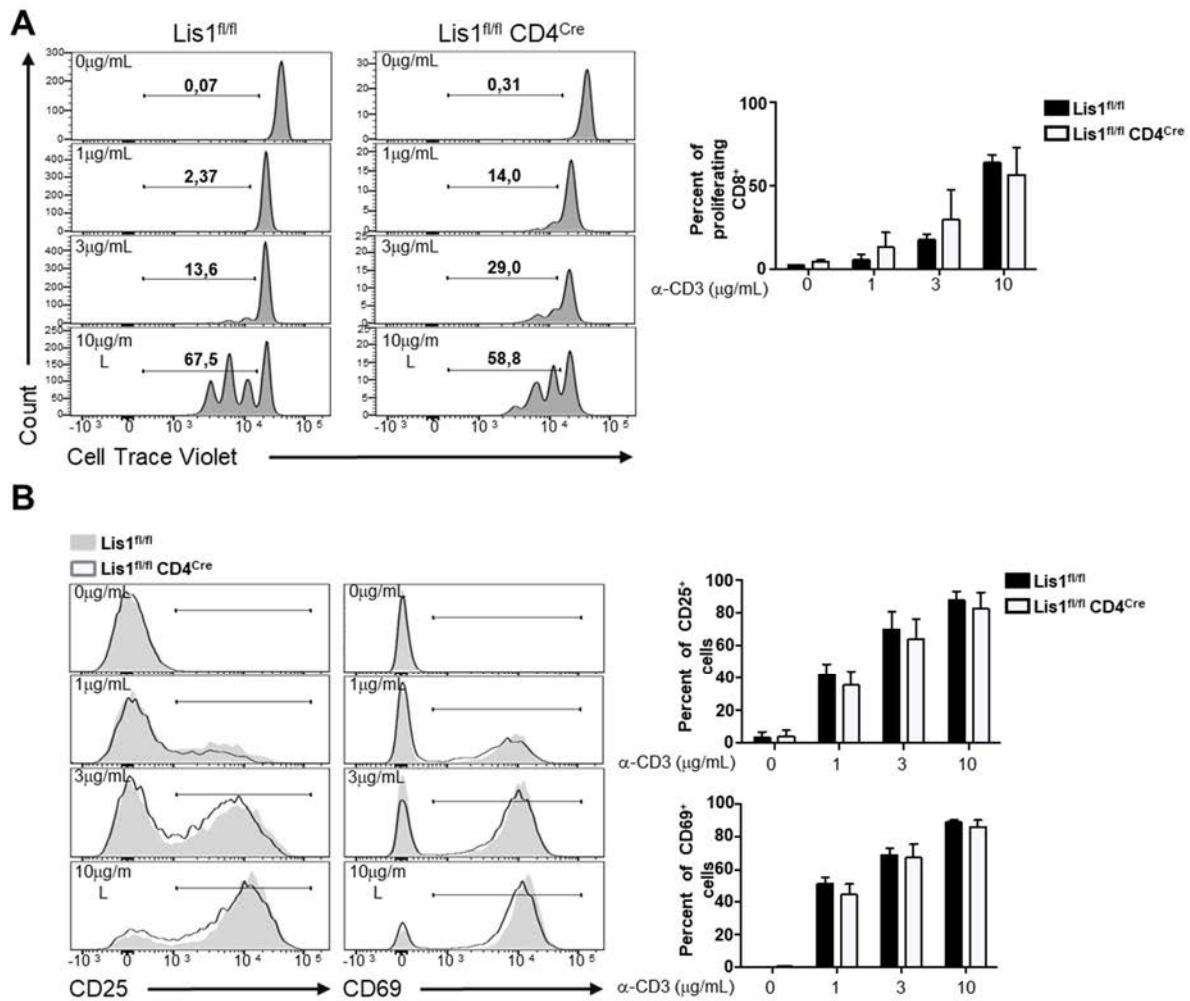




**Figure Supplémentaire 4 : La déficience en Lis1 affecte les LT périphériques**

Marquage de surface de B220 et  $\beta$ TCR (A) et CD4 et CD8 (B) sur des splénocytes issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) et déficientes en Lis1 dans le modèle CD4<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>). Les valeurs dans les cadrans représentent les proportions de cellules au sein des principales populations. L'histogramme barre représente les nombres absolus de cellules au sein des différentes populations de la rate. Ces expériences totalisent deux (A) et quatre expériences indépendantes (B) chacune constitué de 3 à 4 souris par groupe. \* $p < 0.05$  (Test non paramétrique de Mann-Whitney)



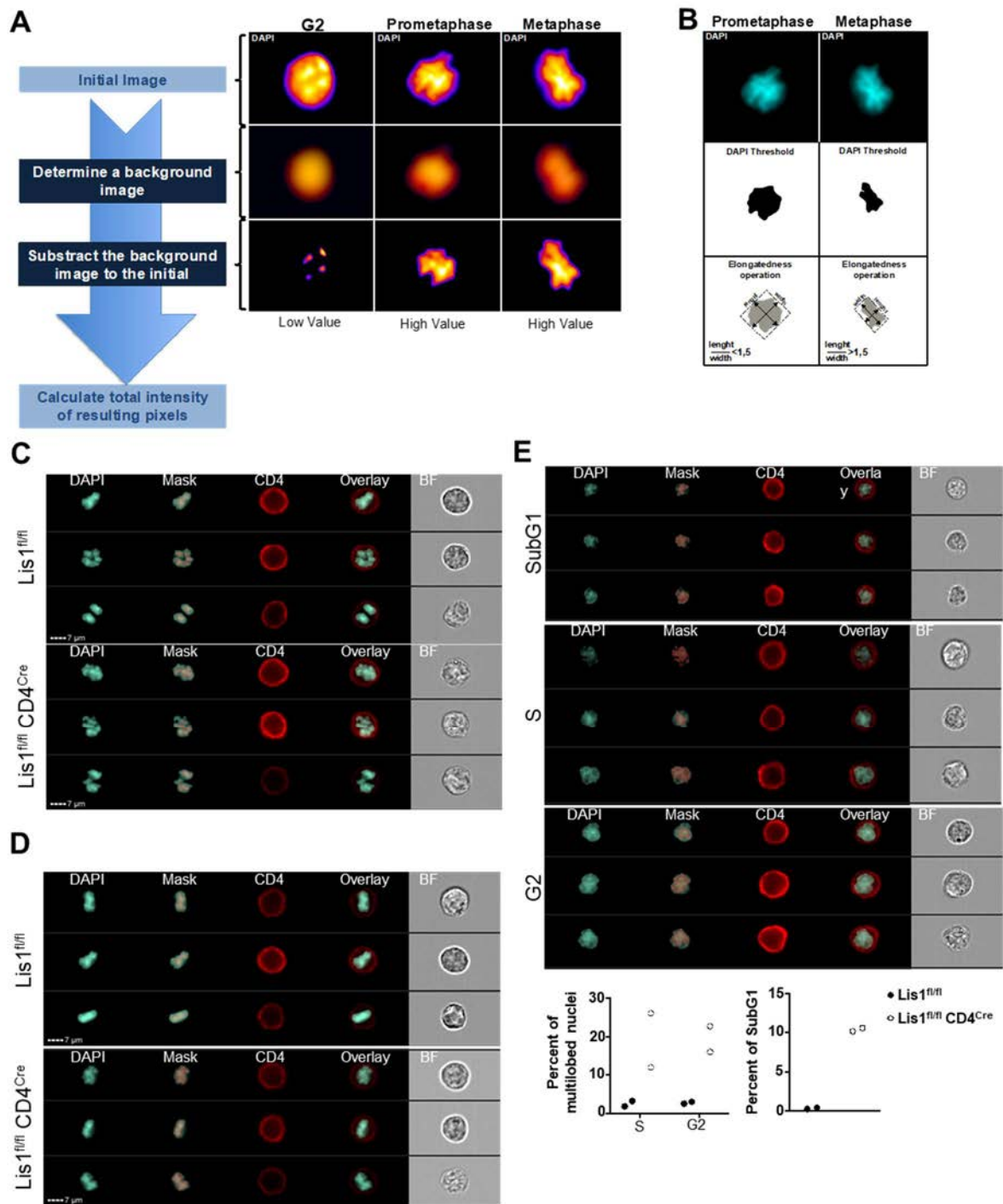


**Figure Supplémentaire 5 : La déficience en Lis1 n’affecte pas la prolifération de LT CD8<sup>+</sup> périphériques suite à la stimulation par des anticorps.**

(A) Analyse de la prolifération après 48h de culture en présence d’anticorps anti-CD28 et anti-CD3 de LT CD8<sup>+</sup> issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) ou déficientes en Lis1 dans le modèle CD4<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>). Les concentrations indiquées sur les histogrammes FACS indiquent la concentration d’anti-CD3 utilisée. Les histogrammes barres présentent la proportion de cellules en prolifération. (B) Marquage de surface de CD25 et CD69 de LT CD4<sup>+</sup> Lis1<sup>fl/fl</sup> et Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup> après 24h de culture en présence d’anticorps anti-CD28 et anti-CD3. Les droites représentées sur l’histogramme FACS délimitent les populations CD25<sup>+</sup> et CD69<sup>+</sup>. Les concentrations indiquées sur les histogrammes FACS indiquent la concentration d’anti-CD3 utilisée. Les histogrammes barres résument les proportions de cellules CD25<sup>+</sup> et CD69<sup>+</sup> au sein de la population LT CD4<sup>+</sup> n’ayant pas proliféré. Ces expériences totalisent deux expériences indépendantes, chacune constituée d’une à trois souris par groupe. \* $p < 0.05$  (t-test avec correction de Welch)



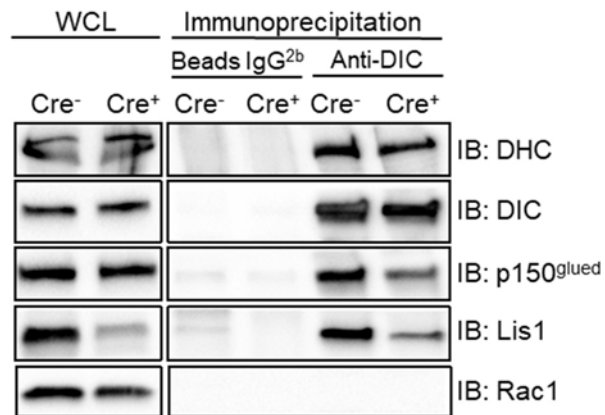




### Figure Supplémentaire 6 : La déficience en Lis1 affecte la mitose des lymphocytes T

(A, B) Schématisation des paramètres « Bright Detail Intensity » (A) et « Elongatedness » (B). Cette représentation n'est pas issue du traitement de IDEAS® mais provient d'une modification d'image réalisée sur ImageJ. (C, D) Image de cellules acquises par ImageStreamX représentant le BDI<sup>hi</sup> (C) et Elongatedness >1,5 (D). (E) Image provenant d'imageStreamX de LT CD4<sup>+</sup> stimulés en présence d'anti-CD28 et anti-CD3 provenant de souris déficientes en Lis1 dans le modèle CD4<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>) après gating sur la population subG1, S et G2 du cycle cellulaire. L'histogramme de gauche représente

la proportion de cellule présentant des noyaux multilobés après quantification manuelle de 400cellules. L'histogramme à droite représente la proportion de cellules subG1 du cycle cellulaire. Ce résultat est représentatif de deux expérimentations contenant une souris par génotype.



**Figure Supplémentaire 7 : L'interaction de la dynéine avec la dynactine est interrompue en absence de Lis1**

Westernblot représentant la chaîne lourde de la dynéine (DHC), la chaîne intermédiaire de la dynéine (DIC), la sous unité de la dynactine p150<sup>glued</sup>, Lis1 et Rac1 après immunoprécipitation contrôle (Beads IgG<sup>2b</sup>) et immunoprécipitation de DIC (Anti-DIC) sur des LT CD4<sup>+</sup> issus de souris contrôles (Lis1<sup>fl/fl</sup>) ou déficientes en Lis1 dans le modèle CD4<sup>Cre</sup> (Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>). La condition « WCL » représente le lysat total avant immunoprécipitation. Rac1 a été utilisée comme contrôle de quantité dans la condition WCL. Ce résultat est représentatif d'une expérience.



## Matériels et méthodes

### Animaux

Les souris  $Lis1^{fl/fl}$  (129S-*Pafah1b1*<sup>tm2Awb</sup>/J) et  $CD2^{Cre}$  (B6.Cg-Tg(CD2-icre)4Kio/J) proviennent de The Jackson Laboratory. Les lignées  $CD4^{Cre}$  et  $AND^{Tg}$  ont été données par Dr Olivier Joffre (INSERM UMR1043, Toulouse) et par Dr Paul Love (National Institutes of Health, Bethesda, USA) respectivement. Toutes les expérimentations ont été réalisées avec concordances des âges et des sexes entre animaux âgés de un à trois mois. Les souris ont été croisées au sein de l'unité US006 de l'INSERM sous le statut sanitaire SOPF (Specific and Opportunistic Pathogen Free) et ont été maintenues sous le statut sanitaire SPF (Specific Pathogen Free). Toutes les expériences ont été réalisées sous protocoles approuvés par le comité éthique local selon les règles françaises et de l'Union Européenne concernant le bien-être et la protection des animaux de laboratoire (Directive EC 2010/63)

### Lignées cellulaires

Les cellules OP9-DLL1 ont été fournies par Dr Sophie Laffont-Pradines (INSERM UMR1043, Toulouse) et sont maintenues dans un milieu MEM $\alpha$  (Gibco Cat# 22561) complété de 20% SVF (Sigma Aldrich Cat# F7524) et de 1% pénicilline/streptomycine (Gibco Cat# 15140). Les cellules P13.9 ont été données par Pr Ronald Germain (National Institutes of Health, Bethesda, USA) et sont maintenues dans un milieu DMEM-L-glutamax (Gibco Cat# 31966) complété de 10% SVF et de pénicilline/streptomycine. Ces cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>

### Cytométrie en flux

La liste qui suit, énumère les anticorps primaires couplés à un fluorochrome utilisé pour la cytométrie en flux dans ce travail : CD8 $\alpha$  (clone 53-6.7), CD4 (clone RM4-5), CD24 (clone M1/69),  $\beta$ TCR (clone H57-597), V $\alpha$ 11 (clone RR8-1), CD5 (clone 53-7.3), CD69 (clone H1.2F3), B220 (clone RA3-6B2), Gr1 (clone RB6-8C5), CD11b (clone M1/70), CD11c (clone N418), Ter119 (clone TER119), CD3 (clone 145-2C11), NK1.1 (clone PK136), TCR $\gamma\delta$  (clone GL3), CD44 (clone IM7), CD25 (clone PC61.5), CD71 (clone R17217), IL7-R (clone A7R34), BCL-2 (clone 3F11), CD19 (clone 1D3/CD19), c-kit (clone 2B8), IgM (clone RMM-1).

Pour tous les marquages de surface, les cellules sont resuspendues dans une solution PBS 2%SVF 2mM EDTA contenant les anticorps primaires. Pour les marquages intracellulaires, les cellules sont fixées dans une solution de PFA 4% et incubées avec les anticorps dans le tampon « permeabilization buffer » (Invitrogen Cat# 00-833-56). Toutes les cellules analysées par cytométrie en flux ont été préalablement marquées par le marqueur de viabilité (ThermoFisher scientific Cat# 65-0865-14).

Pour le phénotypage des thymocytes, les thymus sont broyés et les corécepteurs CD4 et CD8 sont marqués. Pour l'analyse de la population DN, les thymocytes sont marqués par des anticorps dirigés contre le linéage LIN (Gr1, CD11b, CD11c, Ter119, CD3, B220, NK1.1 et TCR $\gamma\delta$ ), CD8 $\alpha$  et CD4. Après sélection des populations Lin<sup>-</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>-</sup>, les cellules sont analysées grâce au marquage de surface CD44, CD25, CD5, CD71 et IL7-R et au marquage intracellulaire BCL-2 et  $\beta$ TCR. Pour le phénotypage des splénocytes, les rates sont broyées et les globules rouges sont lysés à l'ACK (Gibco Cat# A10492) avant le marquage des marqueurs CD4, CD8, CD24 et  $\beta$ TCR.

Pour l'analyse de la moelle osseuse, les fémurs de souris sont broyés sur mortier et filtrés. Les cellules sont ensuite marquées pour détecter par cytométrie en flux les marqueurs CD19, B220, c-kit et IgM.

Les données ont été acquises sur le cymomètre LSR II (BD Biosciences) et analysées à l'aide du logiciel FlowJO (Tree Star Inc.)

### **Culture de cellules primaires de souris**

L'ensemble des cellules primaires sont mises en culture dans un incubateur à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> et maintenue dans du milieu RPMI (Sigma Aldrich Cat# R0883) complété de 10% SVF (Gibco cat# 10270), 1% pénicilline/streptomycine, MEM (Gibco Cat# 11140), 10mM HEPES (Gibco Cat# 15630), 1mM Sodium Pyruvate (Sigma-Aldrich Cat# S8636), 2mM L-glutamine (Gibco Cat# 25030), 50 $\mu$ g/mL gentamycine (Sigma-Aldrich Cat# G1397), 50 $\mu$ M 2-mercapthoéthanol (Gibco Cat# 31350).

### **Analyse *in vitro* de la prolifération des DN**

Les cellules DN sont isolées par sélection négative après marquage du CD4 et du CD8 par des anticorps générés au laboratoire et après incubation dans les billes Dynabeads magnetic beads (Invitrogen Cat# 11415D). Les cellules DN3a (Lin<sup>-</sup> CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup> ou Lin<sup>-</sup> CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> CD71<sup>-</sup>) sont triées sur trieur cellulaire FACSARIA II (BD Biosciences) ou FACSARIA SORP (BD Biosciences) après marquage des DN dans un tampon PBS 2% SVF 2mM EDTA. Pour l'analyse de la prolifération, une partie des DN3a est marqué au Cell Trace Violet (CTV)(Invitrogen Cat# C34557) avant d'être mise en culture sur une lignée de cellules OP9-DLL1 pour les temps indiqués dans les résultats en présence de 10ng/mL d'IL-7 murin recombinant (Peprotech Cat# 217-17). Aux différents temps indiqués, les DN3 sont récupérés et marqués pour la détection des marqueurs de surface CD5, CD71 et IL7-R et des marqueurs intracellulaires BCL-2 et  $\beta$ TCR. Pour le marquage par l'AnnexinV, les cellules sont préalablement marquées avec les anticorps de surface présentés ci-dessus puis reprises dans le tampon de marquage AnnexinV (BD Biosciences Cat# 556454) contenant l'AnnexinV (BD Biosciences Cat# 561012). Les cellules n'ayant pas été marquées au CTV, sont marquées au DAPI après fixation dans une solution de PFA 4% et perméabilisation par le tampon « permeabilization buffer » (Invitrogen). Le DAPI (Sigma-Aldrich Cat# D9542) est ajouté aux cellules à 1 $\mu$ g/mL dans du PBS pour l'acquisition.

### **Analyse *in vitro* de la prolifération des LT périphériques**

Les LT CD4<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup> sont isolés par sélection négative après marquage du CD8, B220, CMH-II, NK1.1, Fc $\gamma$  et CD11b et du CD4, B220, CMH-II, NK1.1, Fc $\gamma$  et CD11b respectivement, par des anticorps générés au laboratoire et après incubation dans les billes Dynabeads magnetic beads (Invitrogen). Pour l'analyse de la prolifération, une partie des LT est marquée au cell trace violet avant d'être mise en culture pour les temps indiqués dans les résultats. Les LT sont stimulés sur des plaques adsorbées des différentes doses indiquées d'anticorps anti-CD3 (anticorps produit au laboratoire) et de 2 $\mu$ g/mL d'anti-CD28 (clone 37-51 BioXCell Cat# BE0015-1). Pour la stimulation par PMA et ionomycine, les cellules sont stimulées en présence 100ng/mL de PMA (Sigma Aldrich Cat# P8139) et 100ng/mL de ionomycine (Sigma Aldrich Cat# I0634). Les LT CD4<sup>+</sup> AND<sup>Tg</sup> sont stimulés sur cellules P13.9 chargées de 1 $\mu$ M de peptide MCC (Moth cytochrome C 88-103 : ANERADLIAYLKQATK) (Produit à façon par GeneCust) pendant 2H. Les LT sont stimulés



pendant 48h à hauteur de 4 LT par P13.9. Aux différents temps de culture, les LT sont récupérés et marqués pour analyser par cytométrie en flux le marquage CD25 et CD69. Pour le marquage par l'AnnexinV, les cellules sont préalablement marquées avec des anticorps reconnaissant les marqueurs CD25 et CD69 puis reprises dans le tampon de marquage AnnexinV contenant l'AnnexinV. Les LT CD4<sup>+</sup> non marqués au CTV, sont marqués au DAPI après fixation dans une solution de PFA 4% et perméabilisation par le tampon « permeabilization buffer » (Invitrogen). Le DAPI est ajouté aux cellules à 1µg/mL dans du PBS pour l'acquisition.

### **Cytométrie en image**

Pour l'analyse de la population G2/M, les LT CD4<sup>+</sup> sont stimulés par 10µg/mL d'anticorps anti-CD3 et 2µg/mL d'anti-CD28 adsorbés sur des plaques pendant 48h. Pour l'analyse de la métaphase, les LT CD4<sup>+</sup> sont stimulés par 10µg/mL d'anticorps anti-CD3 et 2µg/mL d'anti-CD28 adsorbés sur des plaques pendant 24h. Après 24h de culture du Nocodazole (Sigma Aldrich Cat# M1404) a été ajouté pour 100ng/mL final pendant 18h. Les cellules synchronisées sont lavées dans du RPMI complété de SVF puis traitées avec 10µM de MG132 (Sigma Aldrich Cat# M7449) pendant 3h. Les cellules ont été acquises sur ImageStreamX (Millipore) après marquage de CD4, de la viabilité et de l'ADN suivant les protocoles décrits précédemment.

Les données ont été analysées sur le logiciel d'analyse IDEAS (Millipore). Pour la discrimination des cellules mitose et celles en cellules en phase G2, nous avons utilisé le paramètre « Bright Detail Intensity » (BDI). Celui-ci, soustrait le bruit de fond aux images acquises et calcule l'intensité des pixels restants (Fig. S6A)(483). L'homogénéité du marquage au sein d'une cellule conduit à une valeur de BDI importante. Les cellules en mitose ayant l'ADN condensé présentent une meilleure homogénéité de marquage DAPI que les cellules G2 à ADN décondensé (Fig. S6C).

Pour l'analyse des cellules en métaphase, nous avons utilisé le paramètre « Elongatedness » sur le masque DAPI que nous avons prédéfini. Ce paramètre calcule le rapport de la longueur et de la largeur d'un masque DAPI (Fig. S6B). L'allongement du masque DAPI des cellules en métaphase conduit à l'augmentation du paramètre dépassant alors un ratio de 1.5 (Fig. S6D).

## **Imagerie cellulaire**

Les thymocytes DN3b (Lin<sup>-</sup> CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> ou Lin<sup>-</sup> CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> CD71<sup>+</sup>) sont triés sur trieur cellulaire FACSARIA II ou FACSARIA SORP. Les LT CD4<sup>+</sup> triés par sélection négative sont marqués au CTV et stimulés sur des plaques adsorbées de 10µg/mL d'anti-CD3 et 2µg/mL pendant 48h. La population CTV<sup>hi</sup> (non proliférante) a été triée sur trieur cellulaire FACSARIA SORP. Les DN3b ou les LT CD4<sup>+</sup> CTV<sup>hi</sup> sont déposées sur lames adsorbées de 0,01% de poly-L-lysine (Sigma aldrich Cat# P8920), fixées par PFA 4% dans du PBS et perméabilisé dans 0,1% de Saponine (Sigma Aldrich cat# 47036). Le marquage  $\gamma$ -tubuline (clone 14C11 BioLegend Cat# 629201) est réalisé à 4°C dans 0,1% de Saponine 3% BSA 10mM HEPES pendant 18h et le marquage secondaire anti-souris IgG<sup>2b</sup> (Invitrogen Cat# A21147) dans la même solution pendant 1h à température ambiante. Le marquage de l'ADN est réalisé au DAPI pendant 15min à température ambiante dans du PBS. Les lames sont ensuite montées en présence d'une solution de DABCO (Sigma Aldrich Cat# D27802) et les images sont acquises au microscope confocal LSM710 (Zeiss)

Pour la vidéo microscopie, les LT CD4<sup>+</sup> sont isolés par sélection négative et mis en culture pendant 24h sur une chambre (IBIDI Cat# 80821) adsorbée de 10ug/mL d'anti-CD3 et de 2ug/mL d'anti-CD28. Pour le marquage de l'ADN, du Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Cat# B2261) a été ajouté dans le milieu sur les LT pour une concentration finale de 50ng/mL. Les cellules en présence de Hoechst 33342 sont observées au microscope confocal Spinning disk pendant 18h dans une chambre à 37°C et 5%CO<sub>2</sub>. Les images obtenues en z-stack sont ensuite montées en film et analysées à l'aide d'ImageJ.

## **Immunoprécipitation et westernblot**

Pour l'immunoprécipitation de la chaîne intermédiaire de la dynéine (DIC), les LT CD4<sup>+</sup> sont isolés par sélection négative et lysés dans un tampon de lyse (Tris pH7,2 10mM, NaCl 150mM, Triton 1%, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2mM, NaF 5mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, leupeptine 1µg/mL, Aprotinine, 2µg/mL, pepstatine 1µg/mL) pendant 20min dans la glace. Le lysat est clarifié par centrifugation à 12000rpm pendant 15min. Le surnageant est incubé avec des billes adsorbées d'anti-DIC (clone 74-1 Santa-Cruz Cat# sc-13524) ou IgG<sup>2b</sup> (Santa-Cruz Cat# sc-3879) pendant 2 heures sur roue à 4°C. Après immunoprécipitation, les billes sont lavées avec du tampon de lyse et les protéines sont éluées dans du tampon LDS blue (Invitrogen Cat# NP0007) et de l'agent réducteur (Invitrogen Cat# NP0009) 10min à 70°C.

Pour l'analyse de p53, les LT CD4<sup>+</sup> sont triés par sélection négative et mis en culture sur plaque adsorbée de 10µg/mL d'anti-CD3 et de 2µg/mL d'anti CD28 pendant 24h et 48h. Après chaque temps de culture, les cellules sont récupérées et lysées. Les thymocytes DN totaux sont isolés par sélection négative et lysés directement.

Les lysats sont déposés sur des gels SDS-PAGE précoulés (Bio-Rad) 4-15% et mis à migrer dans un tampon Tris-Glycine-SDS 1X (Bio-Rad Cat# 161.0772). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Millipore Cat# IPVH00010) de maille 0,45µm par transfert semi-sec dans du tampon de transfert : éthanol 20% ; Tris-Glycine (Euromedex Cat# EU0550) pendant 1h à 25V. Les membranes sont saturées dans du tampon Tris-Buffered-Salin (Euromedex Cat# ET220) ; Tween20 0,1% (Sigma Aldrich Cat# P1379) (TBST) et 5% de lait (régilait). Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires anti-Lis1 (Santa-Cruz Cat# sc-15319), anti-Rac1 (clone 23A8 Millipore Cat# 05-389), anti-DHC (Santa-Cruz Cat# sc-9115), anti-p150<sup>glued</sup> (clone 1/p150Glued BD Biosciences Cat# 610473) ou anti-p53 (clone 1C12 Cell Signaling Tech. Cat# 2524) sur la nuit à 4°C. Les membranes sont lavées avec du TBST puis incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-souris (Jackson ImmunoResearch Cat# 115-035-003) ou anti-lapin couplé à l'HRP (Jackson ImmunoResearch Cat# 111-035-003). Enfin, les membranes sont révélées par incubation dans une solution de Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3 (Sigma Aldrich Cat# CPS3100) et les photos sont obtenues par BioRad XRS+ imager.

### **Analyses statistiques**

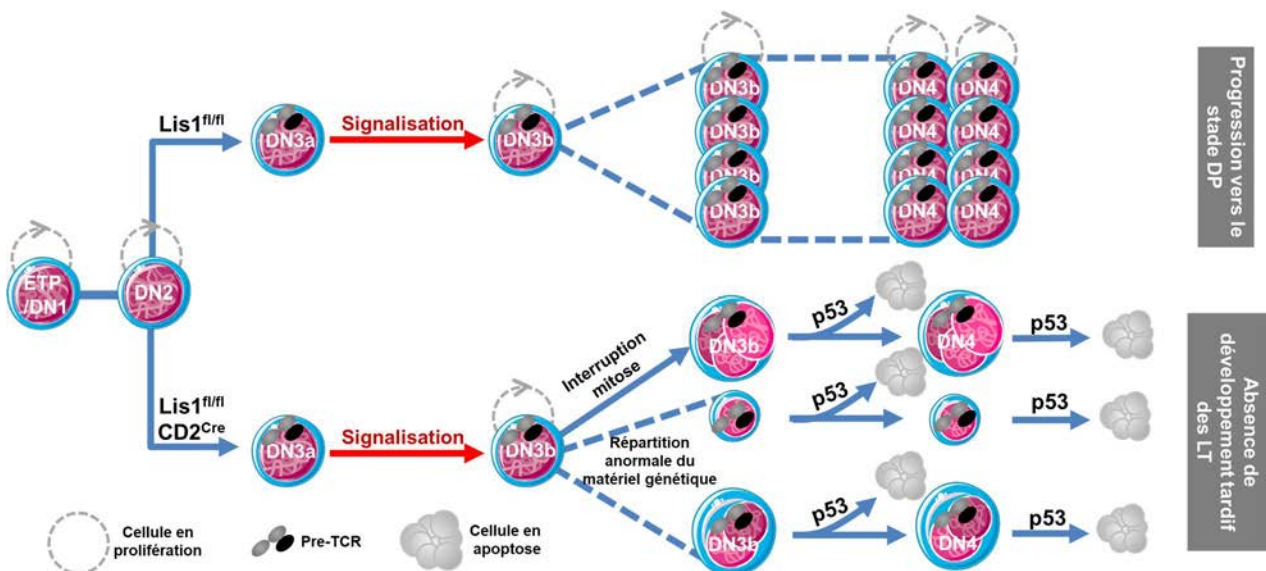
L'ensemble des résultats a été statistiquement analysé par test de Mann-Whitney ou par t-test suivi de correction de Welch. La p-value est indiquée dans la légende de chaque figure (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

# DISCUSSION

Le développement et les fonctions des LT sont régulés par des voies de signalisation qui entraînent la mobilisation de facteurs de transcription déclenchant des programmes génétiques. L'activation et la différenciation des LT entraînent et nécessitent des réarrangements du cytosquelette qui contribuent au recrutement de protéines de signalisation, à la réorientation des organites et à la polarisation de cytokines effectrices vers les cellules cibles. Bien que de nombreuses études se concentrent à étudier les voies de signalisation et la régulation des gènes, peu de travaux s'intéressent aux événements mécaniques associés au cytosquelette dans des LT. Les fonctions du cytosquelette sont régulées par de nombreuses protéines motrices qui permettent le transport de structures cellulaires ou de molécules à travers la cellule.

Les moteurs moléculaires kinésines, dynéines et myosines ont très peu été étudiés dans les LT. La myosine est essentielle dans l'activité et la stabilisation de la synapse immunologique en s'associant au cytosquelette d'actine (149-152). Au niveau des microtubules, la kinésine est importante dans la sécrétion des granules lytiques au cSMAC (163). Enfin la dynéine joue un rôle important dans l'établissement de la synapse immunologique et dans la fonction de celle-ci (160-162). La majorité des études réalisées sur les moteurs moléculaires et le cytosquelette utilise des lignées cellulaires ou des cellules primaires. Seule l'étude de la kinésine KIF-7 utilise un modèle murin déficient ou hétérozygote pour KIF-7 afin d'étudier les fonctions physiologiques de cette protéine dans le système immunitaire. Dans ce travail, les auteurs ont utilisé des souris hétérozygotes pour KIF-7 suite à la létalité de la délétion totale du gène. Les animaux hétérozygotes ne leur permettent pas de démontrer une implication de KIF-7 dans le développement des LT et dans leurs fonctions. En revanche, l'étude des embryons déficients pour KIF-7 au stade E16.5 du développement embryonnaire démontre que la déficience en KIF7 affecte légèrement la transition DN-DP. Le transfert de cellules de foie fœtal d'embryons déficients en KIF-7 dans des souris receveuses déficientes pour RAG, entraîne un profil normal des populations de LT périphériques, avec une légère diminution de l'activation cellulaire après 24h de stimulation (484). Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au régulateur de la dynéine Lis1 afin de comprendre ses fonctions physiologiques au sein des LT. Comme pour la délétion totale de KIF-7, la perte totale de Lis1 est létale (403). Afin de comprendre les fonctions physiologiques de Lis1 dans les LT, nous avons produit des souris déficientes en Lis1 spécifiquement dans les lymphocytes.

Bien que Ngoi et al, ne démontrent pas de défaut majeur du développement des LT en absence de Lis1 (472), l'utilisation d'une lignée différente nous a permis de conclure de la fonction critique de Lis1 dans le développement thymique précoce. Les résultats acquis au cours de ce travail de thèse et les interprétations en découlant, ont permis de démontrer la fonction indispensable de Lis1 au cours de la prolifération des thymocytes précoces. Lis1 ne joue pas de rôle au cours de la  $\beta$ -sélection mais est essentielle à la prolifération des DN exprimant une chaîne  $\beta$  du TCR fonctionnelle. L'accumulation des cellules au cours des stades DN résulte du défaut de prolifération des cellules, qui ne parviennent plus à organiser et distribuer leur matériel génétique. Ce même défaut de prolifération, a été retrouvé lors de l'analyse de LT périphériques après leur stimulation. Ces affections se caractérisent par le ralentissement de la mitose et la distribution inégale de chromosomes entre les cellules filles lorsque celles-ci parviennent à se séparer. L'effet majeur de la déficience en Lis1 se solde par la mort cellulaire programmée afin d'éliminer ces cellules potentiellement dangereuses.



**Figure 28 :** Schéma de conclusion décrivant les conséquences de la perte de Lis1 sur le développement des LT

La déficience en Lis1 conduit au blocage du développement des LT au cours des stades précoces. Les analyses ont démontré que l'expression du pré-TCR est normale ainsi que la signalisation. En absence de Lis1, la signalisation conduit à l'expression des marqueurs de survie suggérant que la déficience en Lis1 n'affecte pas les mécanismes de survie cellulaire suivant la  $\beta$ -sélection. Cependant, les analyses du cycle cellulaire démontrent un blocage de la phase G2/M du cycle cellulaire. Les analyses moléculaires fines réalisées sur des LT CD4<sup>+</sup> révèlent que la mitose est bloquée avec la formation de cellules multilobées suite à l'interruption de la mitose ou à la répartition anormale du matériel génétique. Cela conduit à la mort par apoptose suite à l'expression de p53 au cours des stades DN3b et aussi probablement DN4.

## I) Fonctions physiologiques de Lis1 dans les lymphocytes T

### 1. Blocage précoce du développement des LT dans le modèle $Lis1^{fl/fl} CD2^{Cre}$

Mon travail de thèse montre que le développement précoce des LT est bloqué au stade DN3 lorsque la Cre recombinase est exprimée sous le contrôle du promoteur CD2 (Fig. 1B et Fig. 1C). Les résultats obtenus *in vitro* à l'aide des cellules OP9-DLL1, suggèrent que la diminution de cellules aux stades DP est la conséquence d'un défaut de prolifération des cellules après la  $\beta$ -sélection (Fig. 3). Nous montrons dans ce système que la déficience en Lis1 entraîne un accroissement du taux d'apoptose dans les populations ayant subi un ou plusieurs cycles de divisions cellulaires. En revanche, la déficience en Lis1 n'augmente pas la proportion de cellules en apoptose dans les cellules non divisées ayant reçu des signaux de stimulation ( $CD5^{hi}$ ) (Fig. 6A). Par ailleurs, l'absence de stimulation après 24h et 48h conduit à une proportion similaire de la mortalité cellulaire (données non montrées). Ce blocage de la prolifération ne permet pas l'amplification de cellules exprimant une chaîne  $\beta$  fonctionnelle induisant alors la diminution de la proportion de DN3  $TCR^{hi}$ . Ceci suggère que Lis1 n'est pas essentielle à la survie des thymocytes non proliférants mais qu'elle est nécessaire au déroulement normal des cycles de prolifération. L'accumulation des cellules au stade DN3 et le blocage de la prolifération, ne résultent pas d'un défaut d'expression de la chaîne  $\beta$  du TCR (Fig. 2A). L'expression normale de CD5 dans les cellules exprimant la chaîne  $\beta$  du TCR déficientes pour Lis1 suggère que Lis1 n'est pas essentielle à la signalisation des cellules par le pré-TCR dans les thymocytes précoces (Fig. 2B). Nous montrons aussi que la déficience en Lis1 n'affecte pas l'expression du récepteur à l'IL-7 qui est nécessaire à la survie des cellules à ce stade et à leur différenciation en cellules DN4 et DP (Fig. 2C). L'induction de l'IL7-R par interaction avec son ligand entraîne l'activation de la voie Jak/STAT5 conduisant à la phosphorylation de STAT5 et à sa translocation dans le noyau. STAT5, au sein du noyau, est responsable de la transactivation de gènes de survie tels que *Bcl-2*. Suite à la stimulation du récepteur à l'IL-7, l'expression de BCL-2 diminue (262). En revanche, le passage de la  $\beta$ -sélection est corrélée avec l'augmentation de l'expression de BCL-2A1 (263). Il n'existe pas de donnée physiologique quant aux conséquences de la perte de BCL-2A1 au cours du développement précoce des LT. Cependant, il est clair que l'expression de ce facteur de survie est considérablement augmentée après engagement du pre-TCR et du récepteur CXCR4 dans les cellules DN4 (485). L'expression de BCL-2 n'est pas affectée dans les souris déficientes en Lis1 (Fig. 2C). Afin de vérifier que la diminution de la proportion de cellules DN4 chez les souris déficientes

en Lis1 ne provient pas de l'absence d'expression de BCL-2A1, il serait important de vérifier l'expression de CXCR4 et l'induction de BCL-2A1.

Le phénotype observé conduit au blocage de la prolifération suite à la perte totale de l'expression de Lis1. L'analyse de la quantité d'ADN montre une augmentation de la proportion des cellules en G2/M en absence de Lis1 suggérant que le défaut de prolifération des thymocytes est la conséquence d'un blocage des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire (Fig. 3D).

Une publication récente, démontre qu'au cours de la  $\beta$ -sélection, des divisions asymétriques ont lieu pour contrôler le devenir des cellules. La délétion de Scribble, une protéine régulant la polarité cellulaire, conduit à l'augmentation de cellules DN4 dans les souris (272). Un travail précédent montre que la déficience en Lis1 dans les cellules hématopoïétiques conduit à l'asymétrie des divisions de CSH (429). Nous pouvons penser que la déficience en Lis1 dans notre modèle favorise l'asymétrie des divisions, ce qui contribuerait à la diminution des thymocytes DN4. L'analyse sur des cellules DN3 stimulées par OP9 DLL1 de la répartition de Scribble et aPKC, des protéines impliquées dans la polarisation cellulaire, nous permettrait de quantifier la proportion de cellules en division asymétrique.

## **2. La sélection positive est normale dans le modèle Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup>**

Le développement tardif des LT se caractérise par des évènements de sélection importants conduisant à la survie ou à l'apoptose des cellules selon l'affinité du TCR pour les peptides du soi présentés par les molécules du CMH dans le thymus. Nous montrons que la déficience en Lis1 dans les souris Lis1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre</sup> n'affecte pas les sous-populations de thymocytes CD4 SP et CD8 SP et n'affecte pas la sélection positive de LT CD4<sup>+</sup> exprimant le TCR AND (Fig. 1A). Il est possible que Lis1 ne soit pas essentielle à la maturation et à la sélection de ces cellules. Il est aussi possible que les modèles utilisés ne permettent pas de conclure quant à l'importance de Lis1 dans le développement tardif. Le modèle CD2<sup>Cre</sup> entraîne un blocage quasiment complet du développement thymique au cours des stades DN et ne permet pas d'analyser les étapes ultérieures. Le modèle CD4<sup>Cre</sup> entraîne peut-être une délétion trop tardive de Lis1 ne permettant pas de révéler l'effet de cette protéine sur la sélection positive. En faveur de cette dernière hypothèse, l'utilisation du modèle CD4<sup>Cre</sup> dans l'étude de l'adaptateur moléculaire Grb2 ne démontre pas d'effet de la déficience en Grb2 dans le développement des LT. En revanche, l'utilisation de modèle LCK<sup>Cre</sup>, entraînant une délétion

plus précoce, conduit à la diminution de la population CD4 et CD8 SP démontrant une implication de cet adaptateur au cours des évènements de sélection thymique (244).

Le développement tardif des LT nécessite une signalisation des TCR finement régulée. Des résultats précédents obtenus dans des neurones indiquent que Lis1 participe à la régulation de la signalisation dans ces cellules en stabilisant l'activation de Rac1 au niveau du cortex cellulaire suite à la stimulation neuronale (395). De plus, il a été démontré que la déficience en Lis1 peut diminuer la signalisation de la voie des MAP kinases suite à la diminution du recyclage de récepteurs aux facteurs de croissance (453). Des études d'interactome réalisées par mon équipe d'accueil démontre que Lis1 interagit avec THEMIS1, une protéine essentielle aux évènements de sélection dans le thymus (347)(Annexe1). Mon travail n'a pas permis d'établir les conséquences fonctionnelles de l'interaction entre THEMIS1 et Lis1 mais des données de la littérature suggèrent une hypothèse intéressante. GAREM, une protéine de signalisation contenant un domaine CABIT, interagit avec la protéine 14-3-3 $\epsilon$  (486). Cette dernière est importante dans la relocalisation de GAREM au sein des cellules. Dans les neurones, 14-3-3 $\epsilon$  interagit avec le complexe Kinésine, Lis1 et NudE pour leur relocalisation avec DISC (487). Enfin, 14-3-3 $\epsilon$  est présente dans l'interactome de THEMIS1 suggérant fortement que Lis1 interagit avec THEMIS1 afin de relocaliser ce dernier (Communication personnelle par Dr Renaud LESOURNE). Lis1 pourrait donc être mise à contribution dans la régulation de la localisation de THEMIS1 au sein des cellules au cours de l'activation. Il serait donc intéressant d'analyser, par imagerie confocale, la localisation de THEMIS1 au sein de cellules stimulées déficientes en Lis1. Des expériences réalisées au début de mon doctorat démontrent l'importance du domaine CABIT1 de THEMIS1 dans l'interaction entre ces deux protéines. Lis1 interagit principalement avec ses partenaires par sa région en hélice  $\beta$  probablement par le biais d'interactions ioniques (Annexe 4). Il serait intéressant de déterminer les résidus d'interaction entre THEMIS1 et Lis1 et de produire des souris *knock-in* contenant des mutations invalidantes du ou des résidus responsables de cette interaction.

### **3. Rôle de Lis1 dans la migration des thymocytes**

Bien que la prolifération soit un évènement essentiel dans le développement des LT afin d'amplifier des thymocytes précoces exprimant une chaîne  $\beta$  du TCR fonctionnelle, nous ne pouvons pas exclure que l'effet de Lis1 sur le développement précoce des LT soit aussi la conséquence d'un défaut de migration des cellules. Les thymocytes migrent vers différentes



régions du thymus tout au long de leur développement. Les ETP/DN1 entrent dans le thymus par la jonction cortico-médullaire et migrent vers la zone subcapsulaire dans laquelle se déroule la  $\beta$ -sélection. Après différenciation en DP, les cellules rejoignent le cortex au sein duquel la sélection clonale s'effectue par interaction avec les cTEC. Enfin, les SP issus de la sélection positive, migrent vers la médulla pour subir la sélection négative grâce au mTEC exprimant les peptides antigéniques du soi (195). La délétion de CXCR4, un récepteur des chimiokines CXCL12, entraîne l'augmentation en proportion et en nombre des cellules DN3 et à la diminution de la prolifération de ces cellules. La diminution en CXCR4, conduit à l'absence d'expression de BCL-2A1 après engagement du pre-TCR (485). Cependant, aucune donnée n'existe concernant la capacité de ces cellules à exprimer CD5, le récepteur à l'IL-7 et des facteurs trophiques. Comme pour la prolifération des cellules souches neurales, la migration des neurones est essentielle dans le développement neural. Comme il a été discuté dans l'introduction, Lis1 est essentielle à la migration cellulaire (403, 405, 406, 419, 425, 488). Les lissencéphalies illustrent d'ailleurs les conséquences des défauts de migration et de prolifération des cellules induites par la perte de Lis1 lorsque le gène *pafah1b1* est muté chez des patients (489, 490). Par conséquent, nous pouvons supposer que Lis1 pourrait aussi jouer un rôle sur la migration des LT et affecter le développement précoce et tardif de ces cellules. Nous avons réalisé des expériences de *transwell* pour examiner cette possibilité *in vitro*. Ces expériences préliminaires, réalisées sur des LT CD4<sup>+</sup> périphériques déficients en Lis1, ne démontrent pas de défaut de migration des cellules vers CCL19 (données non montrées). Néanmoins, cette stratégie ne reflète pas la migration réelle des cellules mais plus particulièrement la capacité de celles-ci à être attirées par une chimiokine et à se déformer pour atteindre leur but. Ce type d'expérience suggère plutôt que Lis1 n'est pas nécessaire à la diapédèse, un processus conduisant à l'introduction de cellules circulantes au sein d'un organe. Une analyse par microscopie multi-photonique nous permettrait d'analyser plus finement la migration en temps réel au sein d'un organe. Il serait intéressant de trier des cellules DN ou DP déficientes pour Lis1 et de les déposer sur une coupe épaisse de thymus sain pour analyser la capacité de ces cellules à migrer au sein de l'organe.

#### **4. Fonctions de Lis1 dans les lymphocytes T périphériques**

L'activation des LT dépend de voies de signalisation mobilisées suite à l'engagement du TCR par les pCMH et à la fixation de ligands sur les récepteurs aux cytokines et sur les corécepteurs. Comme il a été mentionné dans la partie précédente, la signalisation des LT

pourrait être affectée par la perte de Lis1 en considérant l'interaction entre THEMIS1 et Lis1. Par ailleurs, la stimulation des LT conduit à la formation d'une structure tridimensionnelle qu'est la synapse immunologique, se caractérisant par le recrutement du centrosome au niveau du contact cellulaire et au recrutement des TCR constamment endocytés pour leur recyclage (491, 492). La formation et la fonction de cette structure dépend fortement des moteurs moléculaires, dynéine et kinésine (160-163, 473). Comme vu au début de cette discussion, la dynéine est importante dans le recrutement du centrosome et des TCR. Lis1 est recrutée à la synapse immunologique et pourrait réguler la dynéine dans ces réarrangements moléculaires. Il pourrait donc être intéressant de quantifier la proportion de CPA et de LT conjugués par cytométrie en image ou microscopie confocale. Néanmoins, la déficience en Lis1 n'affecte pas l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD25 dans les LT stimulés par des anticorps anti-TCR ou par des antigènes (Fig. S5B et données non montrées). De plus, la sécrétion de cytokines n'est pas affectée comme l'ont démontré Ngoi et al (472). Il a été démontré que la sécrétion de cytokines de LT traités au nocodazole n'est pas affectée. En revanche, la polarisation de ces cytokines vers la cellule cible est compromise (158). Il est possible que la déficience en Lis1 ait des effets sur la polarisation à la synapse des cytokines sécrétées par les LT. De la même manière, la déficience en Lis1 pourrait conduire à la mauvaise polarisation des granules lytiques au sein des CD8 et par conséquent, compromettre la mort des cellules cibles infectées ou cancéreuses.

La prolifération des LT CD4<sup>+</sup>, après engagement du TCR, est fortement diminuée en absence de Lis1 (Fig. 4A et Fig. 4B). La stimulation de ces cellules avec de la PMA/ionomycine démontre que le défaut de prolifération est indépendant du TCR (Fig. 4C). Comme au sein du thymus, la forte diminution de cette prolifération après stimulation par des anticorps, est associée à l'augmentation de la phase G2/M du cycle cellulaire et à l'augmentation de l'apoptose des quelques cellules en prolifération (Fig. 4E et Fig. 6B). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ngoi et al. montrant un défaut de prolifération des LT CD4<sup>+</sup> déficients en Lis1 stimulés en présence d'IL-7 (472).

De manière intéressante, et comme l'ont montré Ngoi et al. (472), nous n'observons pas de défaut de prolifération des LT CD8<sup>+</sup> après stimulation par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Fig. S5A). Bien que la stimulation par le TCR ne conduise pas au blocage de la prolifération des LT CD8<sup>+</sup>, la stimulation par PMA/ionomycine révèle un blocage critique de la prolifération (Fig. 4D). Le transfert de CD8 naïfs dans une souris receveuse irradiée, conduit au défaut de prolifération en absence de Lis1. Cependant, l'infection par

*L.monocytogenes* d'une souris OT-I constituée majoritairement de LT CD8<sup>+</sup> entraîne la diminution de LT dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires alors que la proportion de cellules en prolifération semble normale (472). L'ensemble de ces données suggère que la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> déficients en Lis1 est affectée lors de la stimulation par agents solubles comme la PMA/Ionomycine et les cytokines IL-7. Cependant, la stimulation par immobilisation ou par des CPA ne démontre pas de défaut de prolifération mais plutôt de différenciation des LT CD8<sup>+</sup> déficients en Lis1. Les LT CD8<sup>+</sup> peuvent se différencier en sous-populations cellulaires effectrices ou mémoires après stimulation des cellules en présence de cytokines spécifiques sécrétées par les CPA. La différenciation de ces deux sous-populations a lieu dès le premier cycle de division cellulaire qui entraîne une répartition asymétrique, entre le pôle proximal (proche de la CPA) et le pôle distal des cellules stimulées, de facteurs de transcriptions déterminant les fonctions effectrices ou mémoires (184). Ngoi et al, ont démontré que la déficience en Lis1 conduit à l'augmentation du phénotype mémoire, suggérant une augmentation de la division asymétrique dans le modèle CD4<sup>Cre</sup> (472). Bien que JT Chang ait été le premier à décrire la division asymétrique dans les LT, il n'y a pas, dans son travail sur Lis1, d'expérience de microscopie confocale démontrant un rôle direct de Lis1 dans la division asymétrique. Il est donc possible que Lis1 régule la symétrie des divisions cellulaires dans les LT comme elle le fait dans les neurones ou les cellules hématopoïétiques mais ceci reste à démontrer par l'utilisation de marqueurs tels que aPKC et Scribble comme cités précédemment.

## **5. La perte partielle de Lis1 ne conduit pas à un défaut des lymphocytes T à la hauteur des lissencephalies**

Les conséquences de l'hétérozygotie de Lis1 dans le tissu neural sont critiques en comparaison au tissu lymphoïde (358, 360, 493). Les patients atteints de lissencéphalie résultant d'une mutation hétérozygote sur le gène codant Lis1 ne présentent pas de défaut apparent des populations de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le sang (communication personnelle du Pr. Nadia Bahi-Buisson). De plus, chez la souris, la perte hétérozygote de Lis1 ne conduit pas à un phénotype différent des souris sauvages alors que la perte totale a un effet majeur (Fig. S2A et Fig. S2B). Asunder est un deuxième régulateur de la dynéine, moins connu mais ayant une fonction importante dans la régulation de la dynéine. Asunder a principalement été étudiée chez la drosophile. Des expériences d'interférence à ARNm montrent que Asunder est importante dans la localisation périnucléaire de la dynéine pour entraîner la mitose. Bien que Asunder et Lis1 puissent interagir, la localisation et la fonction de Asunder ne semble

pas dépendre de Lis1 (468, 494). De manière intéressante, des résultats d'expression génique obtenus dans les bases de données « Expression Atlas » (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) suggèrent que le gène codant cette protéine s'exprime dans de nombreux tissus et particulièrement dans le tissu lymphoïde. Ces mêmes bases de données suggèrent que Asunder est exprimée plus fortement dans les LT stimulés ou différenciés en sous populations effectrices de LT. L'expression de cette protéine semble moins importante dans système nerveux que dans le tissu lymphoïde. L'absence de phénotype clair dans les souris Lis1 hétérozygotes pourrait donc provenir d'une compensation de la perte partielle de Lis1 par Asunder. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de Asunder en absence de Lis1 et de créer une lignée de souris déficientes pour Asunder et d'analyser la perte hétérozygote dans ce modèle.

## **II) Mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels Lis1 régule la mitose dans les lymphocytes T**

### **1. Lis1 dans la réorganisation des chromosomes en mitose**

La prolifération des thymocytes post  $\beta$ -sélection et des LT CD4<sup>+</sup> est fortement altérée en absence de Lis1 (Fig. 3A et Fig. 4A). Nous avons démontré, après marquage de l'ADN, que cette prolifération est associée à l'augmentation de la proportion des cellules en G2/M du cycle cellulaire (Fig. 3D et Fig. 4E). L'utilisation de la cytométrie en image, nous a permis de distinguer les cellules en G2 et les cellules en mitose pour montrer que la déficience en Lis1 conduit essentiellement à une accumulation de cellules en mitose (Fig. 5A). En utilisant cette technique, nous montrons aussi que la proportion de cellules en cours de métaphase est fortement diminuée en absence de Lis1 suggérant un rôle important de Lis1 dans le positionnement des chromosomes sur le plan équatorial des LT CD4<sup>+</sup> (Fig. 5B). En accord avec cette observation, la quantification par vidéo-microscopie nous a permis de conclure d'une part à un ralentissement important de la transition entre la prophase et la métaphase et d'autre part à des anaphases imparfaites conduisant à une répartition anormale du matériel génétique ou à une interruption des mitoses (Fig. 5C). Les cellules issues de ces divisions présentent souvent un noyau multilobé pouvant résulter probablement du déséquilibre génétique et d'un défaut de reformation de l'enveloppe nucléaire après la mitose. L'ancrage des chromosomes sur les microtubules se fait par l'intermédiaire des kinétochores au niveau des centromères des chromosomes. La dynéine s'associe à Spindly

et à la dynactine pour favoriser l'ancrage des kinétochores aux microtubules (382). Au cours de la prométaphase, le complexe RZZ situé dans la couronne fibreuse du kinétochore recrute Spindly, la dynactine et la dynéine. L'ancrage des chromosomes aux microtubules libérerait la dynéine qui éloignerait des protéines responsables du point de contrôle métaphasique afin de favoriser l'anaphase (438).

L'entrée en anaphase est hautement régulée. Le bon ancrage des chromosomes sur les microtubules polaires permet l'activation de APC/C qui entraîne l'ubiquitination et la dégradation de la sécurine. Cette dernière libère donc l'activité de la séparase qui dégrade la cohésine pour entraîner la séparation des chromatides sœurs (495, 496). Ce déroulement de l'anaphase peut être la conséquence du mauvais ancrage des kinétochores aux microtubules mais aussi du déséquilibre de l'activité dynéine et kinésine au niveau des microtubules polaires ne permettant pas une orientation correcte (439-442). Des analyses de microscopie à haute résolution pourraient nous permettre de déterminer d'un part la position des dynéines par rapport aux microtubules polaires et d'autre part la position des kinétochores par rapport aux extrémités positives des microtubules.

Les expériences de cytométrie en image nécessitent un grand nombre de cellules afin d'acquérir plus de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire. Par conséquent, il est difficile de réaliser cette expérimentation sur des cellules DN après culture sur des cellules OP9. De plus, la vidéo-microscopie nécessite de stimuler les cellules en chambres spécifiques pour l'imagerie en présence d'OP9 dans le cas de DN. La présence d'un autre type cellulaire, pourrait générer un bruit supplémentaire à l'analyse de la mitose, de plus que les OP9 peuvent aussi proliférer. Les défauts que nous venons de décrire dans les LT CD4<sup>+</sup> périphériques pourrait donc survenir de façon similaire dans les thymocytes DN en cours de division après la  $\beta$ -sélection et provoquer la mort des cellules en cours de développement via la protéine p53.

## **2. Séparation des centrosomes au cours de la phase G2**

La réorganisation des chromosomes nécessite la réorientation des centrosomes (422). L'analyse des centrosomes dans les thymocytes et des LT CD4<sup>+</sup> déficients en Lis1 en prolifération démontrent l'augmentation du nombre de centrosomes (Fig. 5D et Fig. 5E). Des résultats préliminaires permettent aussi de voir une multipolarité des microtubules. Les centrosomes sont constitués d'une paire de centrioles et du matériel péricentriolaire au sein

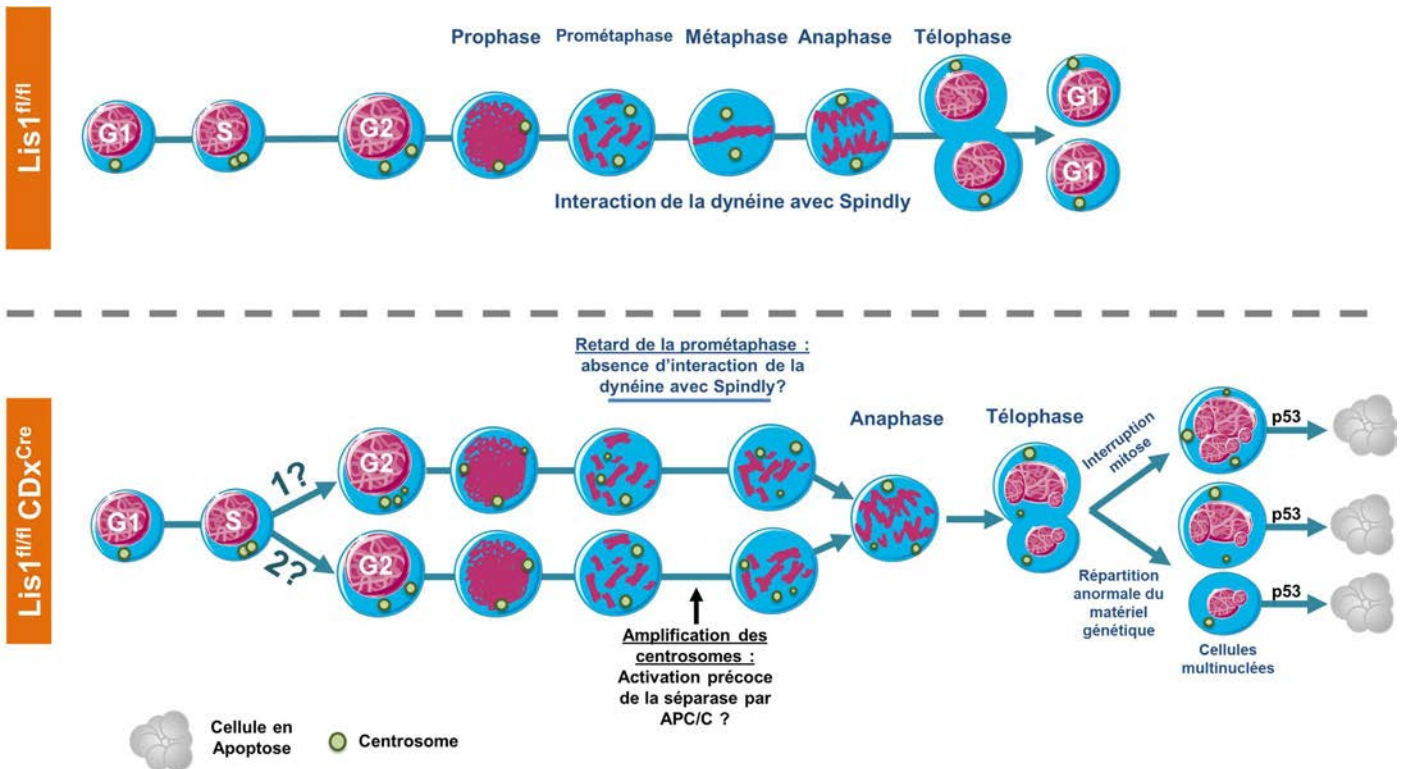
duquel se concentrent de nombreuses protéines de régulation et des complexes  $\gamma$ TURC qui sont à l'origine de la nucléation des fibres de microtubules. Ces derniers se dupliquent au cours de la phase S du cycle cellulaire et se séparent au cours de la phase G2 pour migrer, par le biais de protéines motrices, vers les pôles opposés de la cellule (422). La duplication des centrosomes est un processus complexe déclenché par la kinase PLK4 en phase S phosphorylant STIL et SAS-6 constituant l'amorce d'un nouveau centriole (481). Alors que la déficience en PLK4, STIL ou SAS-6 conduisent à l'absence de centriole, leur surexpression favorise l'amplification des centrosomes et l'altération de l'organisation des chromosomes (497) (479, 498). La surexpression de PLK4 conduit à l'augmentation des centrosomes dans le thymus et les splénocytes, entraînant l'augmentation des cellules en cours de prolifération suite au ralentissement de la phase G2/M (479). Une élongation trop importante des centrosomes au cours de la phase S peut conduire à l'amplification des centrosomes et à des mitoses multipolaires (499). La dynéine est capable de véhiculer des protéines vers les centrosomes en formation, d'une part pour apporter les molécules nécessaires à la synthèse mais aussi des molécules de régulation. En faveur de cette hypothèse, la dynéine est capable de transporter BRCA2 vers les centrosomes. La perte de BRCA2 compromet la cohésion entre les centrosomes au cours de la phase S (500). La perte d'activité de BRCA2 dans des cellules MEF conduit à l'amplification des centrosomes(501). Des protocoles existent pour l'isolation des centrosomes (502). Par cela, il pourrait être intéressant d'analyser le protéome du centrosome dans des cellules déficientes en Lis1 afin de déterminer si les centrosomes présentent le matériel nécessaire à leur duplication et à la régulation de leur amplification.

Une autre hypothèse concerne le rapport du retard mitotique avec l'amplification des centrosomes. Il a été déjà démontré que le retard de la mitose suite à un traitement des cellules synchronisées en G2, entraîne l'amplification des centrosomes. Plus la mitose est longue, plus le nombre de centrosomes augmente. Ce phénomène serait dû à la séparase, normalement essentielle au cours de la mitose pour conduire à la séparation des chromatides sœurs par dégradation de la cohésine mais aussi après la mitose pour séparer les centrosomes. La déficience en séparase suite à interférence à ARNm conduit à la diminution de l'amplification des centrosomes des cellules en retard de mitose. La séparase est activée suite à l'activité de l'APC/C qui dégrade la sécurine. L'utilisation d'un inhibiteur d'APC/C entraîne la réduction de l'amplification des centrosomes au cours du retard mitotique. Il serait donc intéressant de traiter les LT CD4<sup>+</sup> déficients en Lis1 stimulés avec un inhibiteur de APC/C et d'analyser l'intégrité des centrosomes par microscopie confocale (432).

L'ensemble de ces deux hypothèses dégage deux explications possibles de cette amplification des centrosomes. L'amplification des centrosomes pourrait entraîner le retard mitotique suite à la mauvaise organisation des chromosomes dans les cellules en mitose et à l'inverse cette amplification peut être la conséquence du retard mitotique.

### **3. Conséquence de la déficience en Lis1 sur la survie cellulaire**

Les cellules sont dotées d'un système de surveillance de leur contenu afin de réduire les risques de transformations tumorales suite à la perte d'un gène de régulation essentiel. *TP53* est un gène suppresseur de tumeur codant pour la protéine p53 qui est induit lors de la duplication de l'ADN et à la fin de la mitose (482). Le bon déroulement du cycle cellulaire conduit à la dégradation de p53. En revanche, une erreur ou une cassure au sein de l'ADN en phase S peut retarder l'entrée en mitose (503). La présence d'une quantité anormale de matériel génétique peut conduire à l'expression de gènes pro-apoptotiques en fin de mitose. Nous observons par vidéo-microscopie une répartition fortement altérée du matériel génétique vers les cellules filles. Certaines sont capables de former trois cellules filles alors que d'autres sont incapables de réaliser l'anaphase correctement et reforment une cellule dotée de deux fois trop de matériel génétique. L'analyse de p53, démontre une augmentation forte de l'expression de ce marqueur lorsque les cellules sont en cours de prolifération suggérant que l'apoptose des cellules survient suite à l'expression de p53 dû à la mauvaise distribution du matériel génétique. Les phénotypes thymiques et périphériques observés dans les souris déficientes en Lis1 proviendraient donc de l'expression de p53 dû à la mauvaise répartition du matériel génétique. Il serait intéressant de renforcer cette conclusion en déterminant si la diminution de p53 restaure le développement des LT et la prolifération de LT périphériques en absence de Lis1.



**Figure 29 :** Fonctions de Lis1 au cours de la prolifération des thymocytes et des LT

Représentation du cycle cellulaire des thymocytes et des LT. En absence de Lis1, nous remarquons un ralentissement de la mitose important avec une désorganisation des chromosomes. L'analyse des centrosomes révèle une amplification des centrosomes qui peut être les conséquences de deux processus. 1 : l'amplification des centrosomes à lieu au cours de la phase G2 et contribue à la désorganisation des chromosomes. 2 : l'amplification des centrosomes est le résultat du retard de la mitose avec l'activation précoce de la séparase par APC/C. Les cellules sont capables de faire l'anaphase mais les chromosomes ne sont pas ordonnés dans leur ségrégation, conduisant à des pôles cellulaires ayant une quantité de matériel génétique différente. Cela favorise dans certains cas à l'interruption de la mitose et la formation d'une cellule fille multinuclée, ou alors à la formation de cellules filles constituées d'une quantité de matériel génétique différente. Dans ces deux cas, les cellules exprimeraient p53 favorisant l'apoptose.

#### 4. Régulation moléculaire de la mitose par Lis1

La dynéine participe à la redistribution des centrosomes et des chromosomes au cours de la mitose. Pour cela, elle recrute la dynactine qui peut s'associer à Spindly et à Ninéine pour s'associer aux kinétochores et aux centrosomes respectivement (381, 382). Nous observons la perte d'interaction de la dynéine avec la dynactine en absence de Lis1. Pour approfondir ces résultats, il pourrait être intéressant de déterminer si la déficience en Lis1 affecte



l'interaction de la dynéine avec les adaptateurs Spindly et Ninéine. Nous avons réalisé des expériences par spectrométrie de masse pour déterminer si l'absence de Lis1 affecte l'interactome de la dynéine dans les cellules en mitose. Néanmoins, nous n'avons pas détecté d'adaptateur dans le matériel protéique co-immunoprécipité avec la dynéine. Les microtubules sont des structures sensibles aux variations de température, de pH et aux modifications du milieu intracellulaire. Ainsi, ils dépolymérisent rapidement dans les conditions de lyse à 4°C que nous utilisons dans nos expériences d'immunoprécipitation. Or, l'interaction de la dynéine avec les protéines de tubuline et les cargos nécessite que les microtubules soient polymérisés. Par conséquent, il est probable que dans nos conditions expérimentales, l'interaction de la dynéine avec les structures cellulaires soit perdue. Redwine et al. ont utilisé une stratégie astucieuse leur permettant d'éviter les inconvénients des protocoles de lyse cellulaire. Ces derniers ont exprimé dans les cellules un gène codant pour une sous unité de la dynéine, couplée à la biotine ligase. La culture de ces cellules en présence de biotine entraîne la biotinylation de tous les partenaires que la dynéine a rencontré au cours de la culture. L'incubation du lysat avec des billes de streptavidine permet de précipiter les partenaires de la dynéine même si celle-ci n'y est plus associée (381). Cette approche, réalisée au sein de lignées cellulaires, pourrait être reproduite dans une lignée de LT après extinction du gène Lis1 en utilisant des shRNA. Il nous serait possible par cette stratégie, d'analyser aisément l'interactome de la dynéine sous différentes conditions de stimulation.

Comme nous l'avons vu précédemment, Lis1 interagit fortement avec la protéine THEMIS1. Cependant, le rôle de cette interaction reste à explorer. J'ai proposé que Lis1 puisse réguler la localisation de THEMIS1 au sein des LT par le biais de la protéine 14-3-3 $\epsilon$ . L'analyse globale de l'expression des gènes dans les thymocytes déficients en THEMIS1 en cours de sélection suggère que THEMIS1 régule des gènes impliqués dans le déroulement du cycle cellulaire. Cependant, le marquage de l'ADN ne démontre pas d'effet de la déficience en THEMIS1 sur les différentes étapes du cycle cellulaire des thymocytes précoces (337). Notre équipe a récemment produit des souris qui sont sélectivement déficientes pour THEMIS1 dans les LT matures. Ces souris présentent une diminution du nombre et des proportions des LT CD8<sup>+</sup> dans les organes lymphoïdes secondaires. Des analyses *in vitro* montrent que les LT CD8<sup>+</sup> déficients en THEMIS1 présentent un défaut de prolifération lorsqu'ils sont stimulés par des fortes doses d'IL-7. L'effet de l'IL-7 sur la survie des cellules n'est en revanche pas altérée par la déficience en THEMIS1 lorsque les cellules sont stimulées par des faibles doses d'IL-7, qui n'induisent pas la prolifération cellulaire. Ces résultats suggèrent

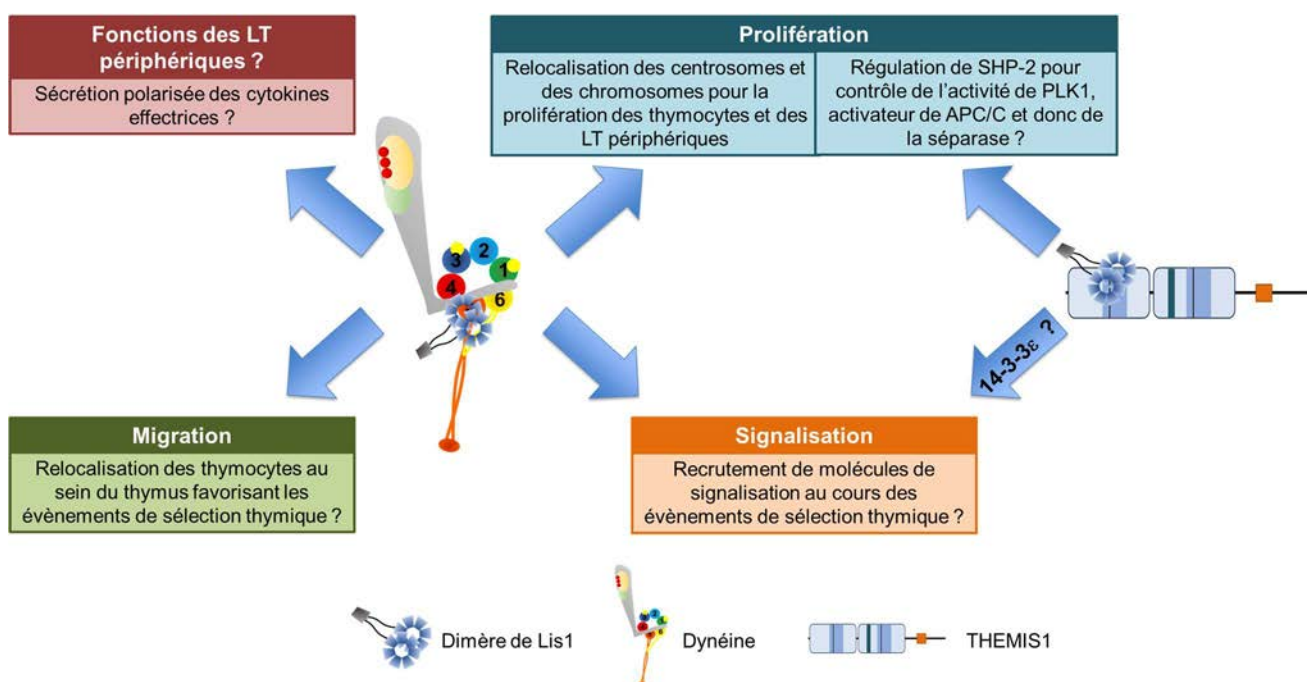
que THEMIS1 pourrait exercer un effet sélectif sur la prolifération indépendamment de la signalisation par le récepteur à l'IL-7. Ces observations sont semblables à celles obtenues dans les LT CD8<sup>+</sup> déficients en Lis1 dont la prolifération *in vitro* est fortement diminuée en réponse à l'IL-7. Il est donc possible que THEMIS1 et Lis1 coopèrent pour réguler le cycle cellulaire des LT CD8<sup>+</sup>.

Un travail récent auquel j'ai collaboré montre que THEMIS1 agit sur la signalisation des TCR en inhibant directement l'activité tyrosine phosphatase des protéines SHP-1 et SHP-2 (349)(Annexe2). Or, il a été montré qu'une mutation entraînant un gain de fonction de SHP-2 entraîne un défaut de cycle cellulaire et l'amplification des centrosomes dans des lignées cellulaires MEF (504). Nous pouvons penser que Lis1 favorise la localisation de THEMIS1 au centrosome pour réguler la protéine kinase SHP-2. De manière intéressante, SHP-2 favorise l'activité de PLK-1 (504). Cette kinase active APC/C qui déclenche l'activité de la séparase et entraîne la séparation des chromatides sœurs en mitose et des centrioles au début de la phase G1 (435). Lis1 pourrait réguler la localisation de THEMIS1 au centrosome pour réguler l'activité de SHP-2 et par conséquent de PLK1 et de la séparase.

### **III) La perte de fonction de Lis1 pourrait favoriser le développement tumoral**

L'aneuploïdie et l'amplification des centrosomes peuvent conduire à la transformation tumorale des cellules. La perte d'hétérozygotie du locus 17p13.3 contenant le gène codant pour Lis1 est récurrente dans de nombreux cancers (362-364, 366). Cette perte ne conduit pas systématiquement à la perte d'expression de Lis1 (365). Dans les cas de carcinomes hépatiques, la perte d'hétérozygotie entraîne la diminution d'expression de Lis1 (366). La délétion de Lis1 par interférence à ARNm sur une lignée cellulaire conduit à la formation de colonies démontrant que le développement tumoral peut être la conséquence de la perte de Lis1. De plus, la perte d'hétérozygotie au niveau du locus 17p13.3 a été détectée dans des cas de leucémie (505). Par ailleurs, des SNP sur le gène *pafah1b1* existent et favorisent le développement de leucémies myéloïdes mais aucune information n'existe concernant les conséquences de ces SNP sur l'intégrité de Lis1 (367). L'ancrage des chromosomes aux microtubules est essentiel pour le bon alignement des chromosomes et la répartition homogène du matériel génétique. Il est donc possible que des déficiences partielles en Lis1 puissent augmenter la susceptibilité au développement tumoral. Nous avons remarqué que p53 s'exprime particulièrement au cours de la prolifération de thymocytes et des LT. Cette

expression entraîne l'apoptose de ces cellules, probablement suite à la mauvaise distribution du matériel génétique. Le gène suppresseur de tumeur *TP53* se situe sur le locus 17p13.1 du chromosome 17, proche de la localisation de Lis1 (506). Il existe des cas de tumeurs au sein desquels la perte d'hétérozygotie s'effectue du locus 17p13.1 à 17p13.3. De plus, la mutation ou l'absence de p53 est retrouvée dans plus de 50% des cancers (507). Afin d'analyser si Lis1 peut être responsable du développement tumoral *in vivo*, nous avons croisé des souris déficientes ou hétérozygotes pour Lis1 dans le modèle CD2<sup>Cre</sup> avec des animaux hétérozygotes pour p53. L'émergence de leucémies dans ce modèle pourrait résulter à la fois des anomalies de prolifération des lymphocytes lors des mitoses et d'une capacité réduite des LT à développer des réponses antitumorales efficaces en absence de Lis1.



**Figure 30 :** Fonctions hypothétiques des interactions dynéine/Lis1 et THEMIS1/Lis1 dans les thymocytes et LT

Nous avons démontré au cours de cette thèse que Lis1 est importante dans la prolifération des thymocytes et des LT. Il est probable que ce phénomène soit dépendant de l'interaction de Lis1 avec la dynéine. Cependant cette interaction peut aussi avoir un rôle dans la migration des thymocytes au cours des événements de sélection et par conséquent jouer un rôle sur la sélection des thymocytes. En périphérie, Lis1 pourrait réguler la dynéine dans la sécrétion polarisée des cytokines et favoriser les fonctions des LT. Enfin Lis1 peut réguler la dynéine pour la relocalisation des protéines de signalisation et par conséquent entrer en jeu dans la sélection des thymocytes. L'interaction de Lis1 avec THEMIS1 pourrait jouer un rôle dans la signalisation en favorisant la relocalisation des protéines THEMIS1 de façon dépendant de 14-3-3ε. Enfin, parce que Lis1 pourrait favoriser la relocalisation de THEMIS1, cette interaction pourrait réguler la fonction de SHP-2 au sein des centrosomes afin de réguler leur amplification et donc favoriser le bon déroulement de la mitose.

# CONCLUSION

Au cours de cette thèse, j'ai pu déterminer les fonctions du régulateur de la dynéine, Lis1 dans les LT. Cette protéine n'a fait l'objet que d'une seule publication démontrant que Lis1 est importante dans la prolifération homéostatique des LT périphériques. Cependant, bien que les auteurs aient bien caractérisé ces défauts de prolifération, ils n'en avaient pas analysé les causes et concluaient que Lis1 n'avait pas de fonction dans les thymocytes. Nous avons pu montrer dans ce travail que Lis1 entre en jeu dans la prolifération des thymocytes précoces ayant passé la  $\beta$ -sélection. Nos analyses moléculaires suggèrent fortement que Lis1 régule l'activité de la dynéine dans les LT en favorisant son association avec la dynactine et aux structures cellulaires à transporter. Lis1 régule l'amplification des centrosomes et conduit à la répartition ordonnée du matériel génétique entre les cellules filles. En absence de Lis1, les cellules s'accumulent au stade DN3 suite à l'allongement important du temps de la mitose. Les cellules qui ne parviennent pas à réaliser une anaphase correcte, exprime p53 conduisant à la mort des cellules au stade DN3b. **Des expériences de restauration, en cours, nous permettront de confirmer que l'apoptose induite par la prolifération est responsable de l'absence de cellule après le stade DN3 du développement précoce des LT.**

Compte tenu de l'implication de Lis1 dans la régulation de la prolifération des LT et des publications associées à la perte ou la mutation de Lis1 dans le développement tumoral, nous émettons l'hypothèse que Lis1 puisse être mise en cause dans le développement tumoral au sein du tissu lymphoïde. **Nous espérons que nos analyses en cours de souris déficientes en Lis1 et hétérozygotes pour p53 nous permettront de conclure quant à l'implication de Lis1 dans la carcinogénèse du tissu lymphoïde.**

Bien que Lis1 entre en jeu particulièrement dans la plus petite population de thymocytes, ce travail illustre l'importance de cette protéine dans l'établissement de la lignée des LT. Nous avons aussi démontré, par des expériences préliminaires, que Lis1 est aussi essentielle au développement des LB et donc essentielle à l'établissement du système immunitaire adaptatif. Enfin, selon les données de la publication, Lis1 joue un rôle critique dans la naissance des CSH par régulation de la division asymétrique. Lis1 est donc importante dans la naissance du système immunitaire dans sa généralité en régulant la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices du système immunitaire. Cependant la fonction de

l'interaction entre THEMIS1, spécifique des LT, et Lis1 est intrigante. Outre le fait que Lis1 régule la prolifération, peut-elle jouer des fonctions spécifiques au sein des LT ? **Afin d'analyser si Lis1 peut interagir avec des partenaires spécifiques des LT nous souhaitons terminer cette thèse par l'analyse de l'interactome de Lis1 par spectrométrie de masse.** Ces données pourraient nous permettre d'une part de déterminer si Lis1 interagit avec des partenaires associés à la prolifération des LT mais aussi d'ouvrir de nouvelles pistes d'études concernant d'autres fonctions de Lis1 spécifiques de ces cellules.

# ANNEXES

**Annexe 1 : Zvezdova E, Mikolajczak J, Garreau A, Marcellin M, Rigal L, Lee J, Choi S, Blaize G, Argenty J, Familiades J, Li L, Gonzalez de Peredo A, Burlet-Schiltz O, Love PE, Lesourne R. 2016. Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. Sci Signal 9:ra51**

Pour cette annexe, j'ai contribué à la révision de l'article. Brièvement, il avait été souligné par les rapporteurs que la stimulation par anticorps n'est pas physiologique. J'ai donc stimulé *in vitro* de thymocytes issus de souris THEMIS1<sup>-/-</sup> CMH-II<sup>-/-</sup> OTII par des tétramères spécifiques d'OVA pour la stimulation ou de CLIP pour la condition contrôle. Les résultats n'ont pas été présentés dans l'article.



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

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

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

## INTRODUCTION

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

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

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

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

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

\*These authors contributed equally to this work.

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



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

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

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

## RESULTS

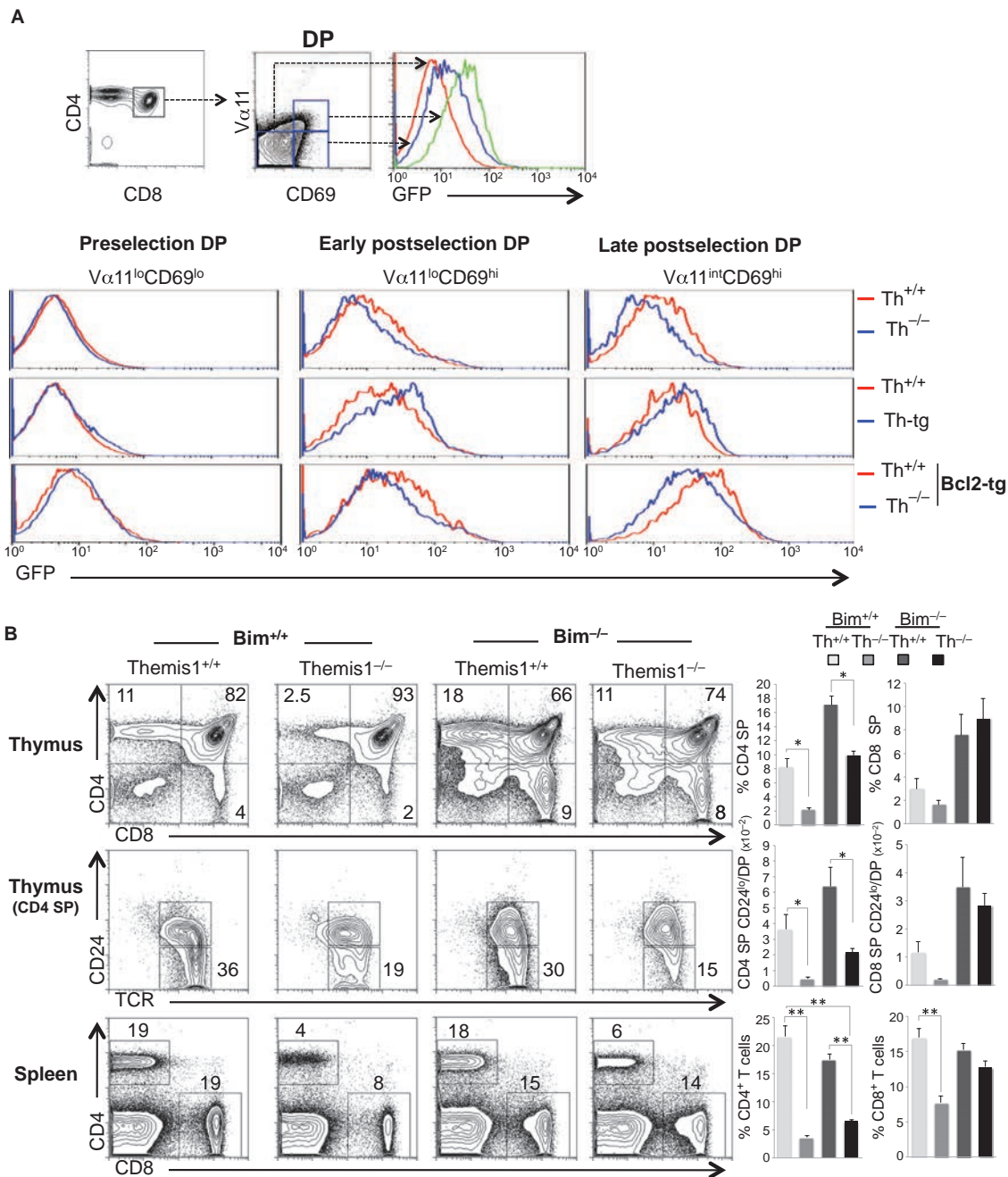
### Signaling reporter mice identify a positive role for Themis1 in TCR signaling in vivo

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

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

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

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



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

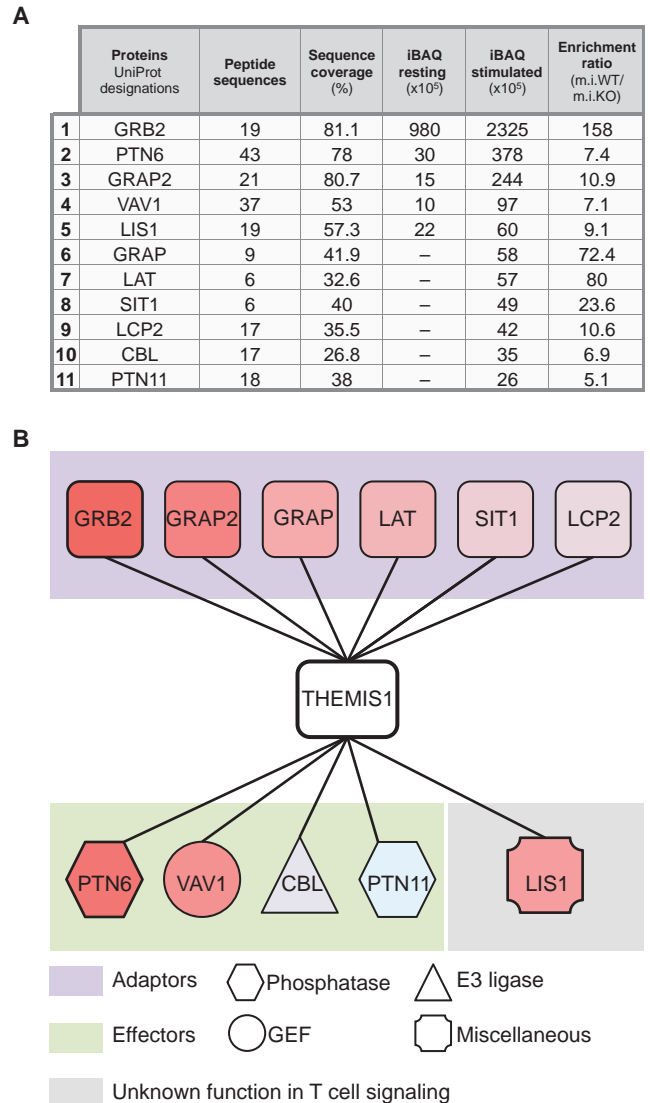
ysis of T cell development in *Themis1*<sup>+/+</sup> and *Themis1*<sup>-/-</sup> mice that are either sufficient (*Bim*<sup>+/+</sup>) or deficient (*Bim*<sup>-/-</sup>) in the proapoptotic factor Bim. Contour plots represent either CD4 versus CD8 staining profiles of thymocytes (top) and splenocytes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

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

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

Previous studies reported that Themis1 interacts with several positive (PLC-γ1, Grb2, SHP-2, and Vav1) and negative (SHP-1) regulators of TCR signaling, but the relative importance of these interactions remains unclear because some of these binding partners were identified in independent studies or within distinct cellular models through approaches that do not always enable global comparisons of protein-protein interactions. To determine which of these signaling proteins preferentially interacted with Themis1 during T cell development, and to investigate the mechanism by which Themis1 positively regulated TCR signaling, we performed an MS-based analysis of Themis1-containing signaling complexes in thymocytes. Themis1 was immunoprecipitated from wild-type or *Themis1*<sup>-/-</sup> thymocytes that were untreated or treated with pervanadate. Protein complexes were eluted with antigenic peptides, and the components of the different purified complexes were characterized by nanoflow liquid chromatography combined with tandem MS. To estimate the relative abundances of the different interacting partners in the immunoprecipitated samples, we used the intensity-based absolute quantification (iBAQ) metric, which corresponds to the sum of all of the peptide intensities divided by the number of theoretically observable tryptic peptides of a protein (for further details, see Materials and Methods).

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



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

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

Downloaded from <http://stke.sciencemag.org> on July 15, 2018

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

### Themis1 enhances Vav1 activity in thymocytes

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

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

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

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

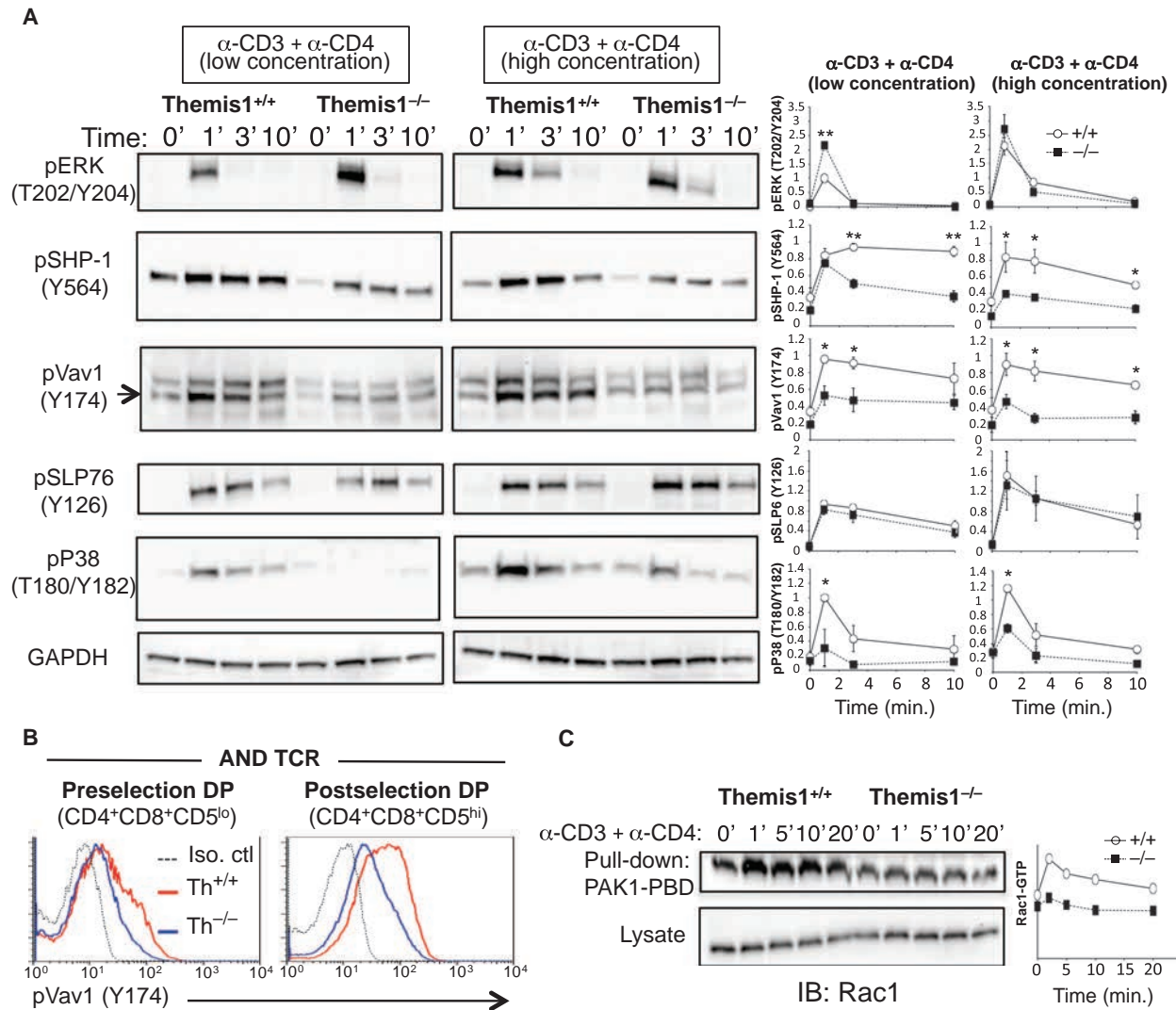
thymocytes had increased amounts of phosphorylated Vav1 compared to those of preselection wild-type DP thymocytes (Fig. 3B). Confirming the data obtained from experiments with TCR cross-linking antibodies, we found that Vav1 was less phosphorylated in *Themis1*<sup>-/-</sup> postselection DP thymocytes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

The phosphorylation of Tyr<sup>174</sup> and Tyr<sup>160</sup> of Vav1 relieves its catalytic Dbl homology domain from its autoinhibitory conformation and causes Vav1 to promote GDP to GTP exchange on the small GTPase Rac1 (22). The GTP-bound form of Rac1 then stimulates signaling that leads to the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 (23, 24). To investigate the effect of Themis1 on signaling events downstream of Vav1, we analyzed the extent of phosphorylation of p38 and the abundance of Rac1-GTP generated after TCR cross-linking. The amount of phosphorylated p38 was reduced in *Themis1*<sup>-/-</sup> thymocytes compared to that in *Themis1*<sup>+/+</sup> thymocytes when either low or high concentrations of antibody complexes were used (Fig. 3A). The amount of Rac1-GTP generated was also reduced in *Themis1*<sup>-/-</sup> thymocytes compared to that in *Themis1*<sup>+/+</sup> control thymocytes when cells were stimulated with a high concentration of antibody complexes (Fig. 3C). Together, these data suggest that Themis1 enhances Vav1 activity in thymocytes.

### The abundance of Grb2 protein is reduced in *Themis1*<sup>-/-</sup> thymocytes

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

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

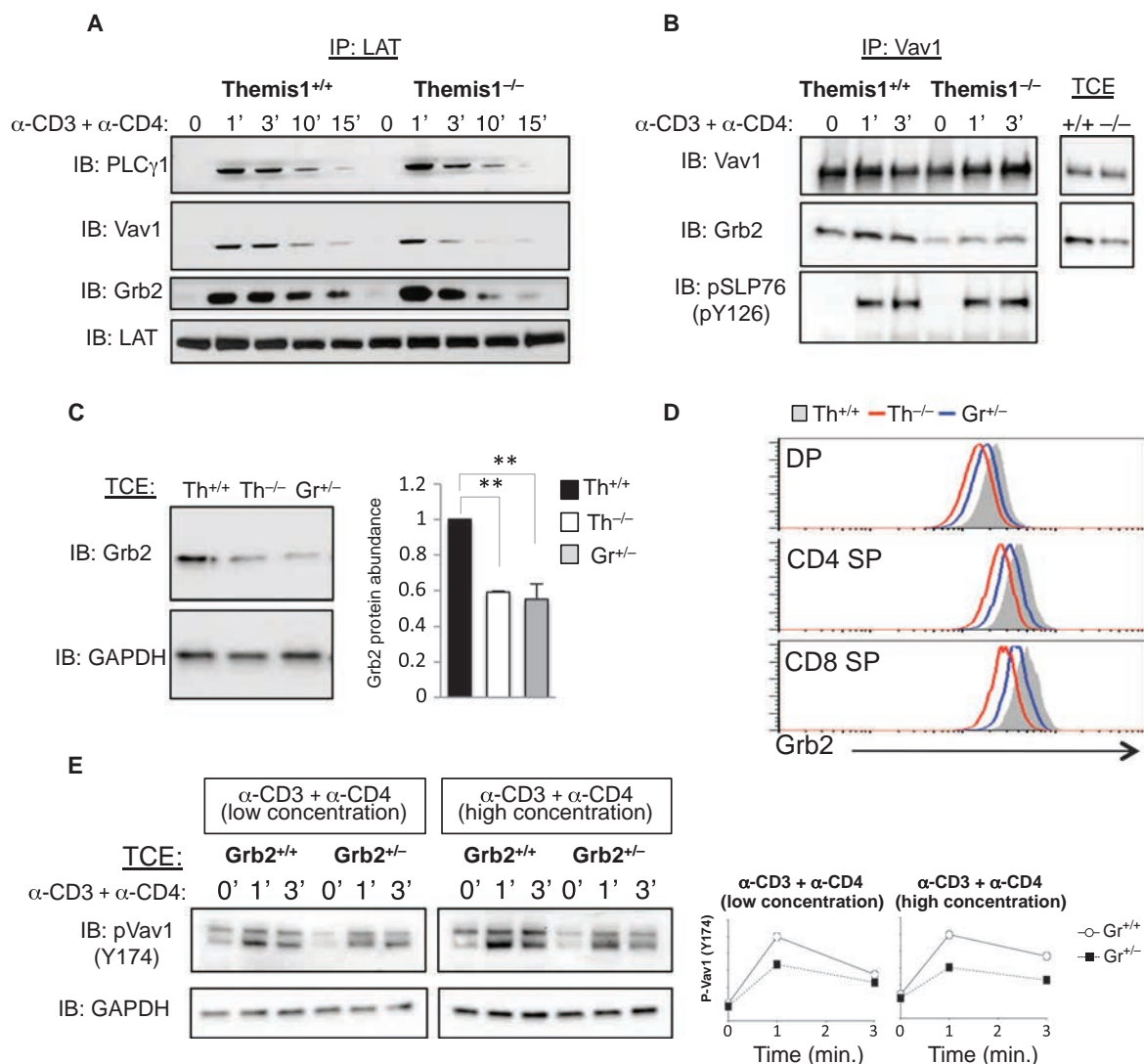


**Fig. 3. Themis1 enhances Vav1 activity in thymocytes.** (A) Left: Thymocytes from *Themis1*<sup>+/+</sup> and *Themis1*<sup>-/-</sup> mice were stimulated with low (3  $\mu$ g/ml) or high (30  $\mu$ g/ml) concentrations of preformed anti-CD3 and anti-CD4 antibody complexes for the indicated times.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

phosphorylation by intracytoplasmic staining of thymocytes from AND-TCR transgenic mice that were either sufficient (Th<sup>+/+</sup>) or deficient (Th<sup>-/-</sup>) in Themis1. Histograms represent Vav1 phosphorylation on Tyr<sup>174</sup> (Y174) in gated preselection (CD5<sup>lo</sup>) and postselection (CD5<sup>hi</sup>) DP thymocytes. Data are representative of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. (C) Left: Thymocytes from *Themis1*<sup>+/+</sup> and *Themis1*<sup>-/-</sup> mice were stimulated with high-dose anti-CD3 ( $\alpha$ -CD3) and anti-CD4 ( $\alpha$ -CD4) antibodies (30  $\mu$ g/ml) for the indicated times. Cells were then lysed and subjected to Rac1-GTP pull-downs with a GST-PAK1-RBD fusion protein. Pull-downs and total cytoplasmic lysates were then analyzed by Western blotting (IB) with an anti-Rac1 antibody. Western blots are representative of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. Right: Graphs show the ratios of Rac1-GTP to total Rac1. Data are representative of three independent experiments.

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

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



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

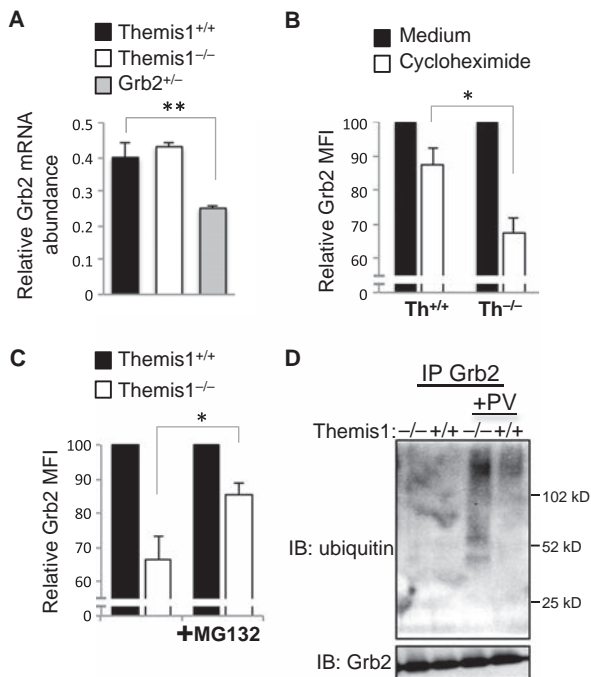
which was set at 1. Data are means  $\pm$  SD of four independent experiments each including one mouse of the indicated genotype.  $**P < 0.01$  by two-tailed, unpaired *t* test. (D) Flow cytometric analysis of Grb2 abundance in DP, CD4 SP, and CD8 SP thymocyte subsets from *Themis1<sup>+/+</sup>* (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

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

***Themis1<sup>-/-</sup>* thymocytes exhibit increased turnover of Grb2 protein**

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

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



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

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

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

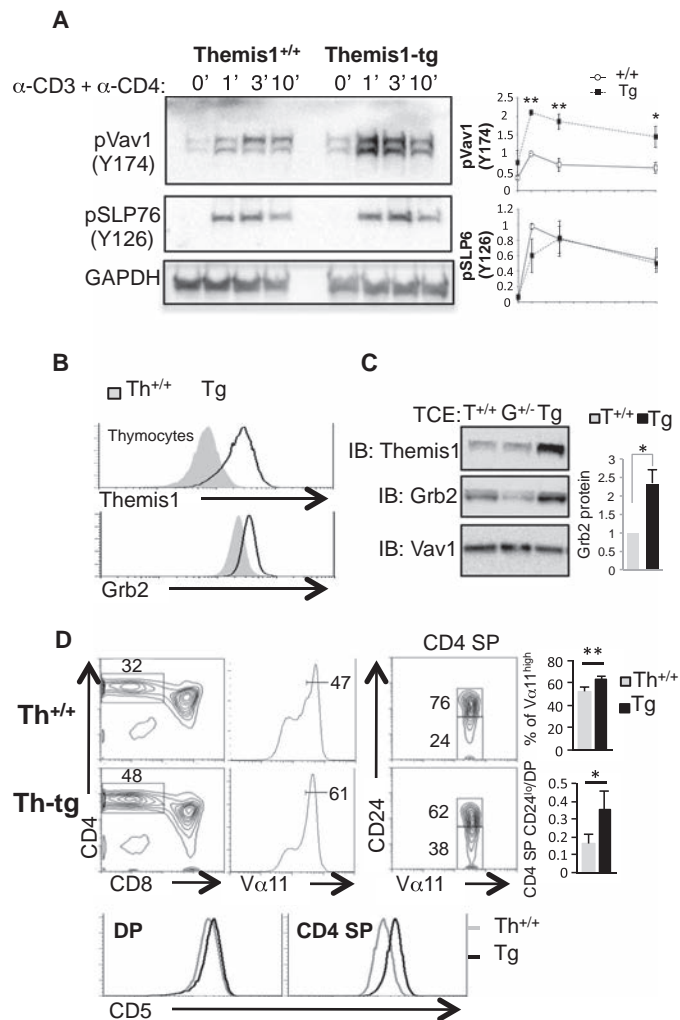
The strength of TCR signaling was increased in vivo when Themis1 was overexpressed (*Themis1*-tg) in AND TCR transgenic thymocytes (Fig. 1A). We therefore examined the consequences of Themis1 overexpression on Vav1 phosphorylation and Grb2 protein abundance. The extent of Vav1 phosphorylation induced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

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

### Overexpression of Themis1 enhances TCR signaling and rescues positive selection in *Grb2<sup>+/-</sup>* mice

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

**Fig. 6. Transgenic expression of Themis1 in thymocytes increases Grb2 protein abundance and improves positive selection.** (A) Left: Thymocytes from Themis1 WT (Themis1<sup>+/+</sup>) and Themis1 transgenic (Themis1-tg) mice were stimulated with preformed anti-CD3 and anti-CD4 antibody complexes (3 μg/ml) for the indicated times. Total cytoplasmic extracts were then analyzed by Western blotting with antibodies against pVav1 and pSLP76. GAPDH was used as a loading control. Right: Graphs show the relative abundances of the phosphorylated proteins as determined from a ratio of the intensity of the bands of phosphorylated proteins to those of GAPDH. The y axes represent means ± SD of the relative values calculated after normalization to the highest value in Themis1<sup>+/+</sup> thymocytes. Data are from three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 by two-tailed, unpaired *t* test. Western blots are from one experiment and are representative of three independent experiments. (B) Flow cytometric analysis of Grb2 and Themis1 in total thymocytes from Themis1 transgenic mice (Tg) or littermate controls (WT). Data are representative of three independent experiments each including one mouse of the indicated genotype. (C) Left: Western blotting analysis of the relative amounts of Themis1, Grb2, and Vav1 in total thymocytes from Themis1 transgenic mice (Tg), WT littermate controls (T<sup>+/+</sup>), and Grb2<sup>+/-</sup> (Gr<sup>+/-</sup>) mice. Right: Bar graphs show the mean ratio ± SD of Grb2 band intensity values to Vav1 band intensity values, normalized to the ratio in T<sup>+/+</sup> control thymocytes, which was set at 1. Data are means ± SD of three mice of each genotype. ‡*P* < 0.05 by two-tailed, unpaired *t* test. (D) Flow cytometric analysis of positive selection in AND Themis1 transgenic mice (Th-tg). Left: Contour plots represent the CD4 versus CD8 staining profiles of thymocytes from Themis1-tg mice and WT littermate controls (Th<sup>+/+</sup>) expressing the AND TCR. Histograms represent AND TCR surface staining with anti-Vα11 antibodies. Right: CD24 versus Vα11 staining profiles of CD4 SP thymocytes from Themis1-tg and littermate control mice expressing the AND TCR. Numbers indicate the percentage of cells in the gated population. Right: Bar graphs show the mean percentages of Vα11<sup>hi</sup> cells (top) and the mean ratio of mature CD4 SP (CD24<sup>lo</sup>) thymocytes to total DP thymocytes (bottom) in Themis1-tg and littermate control (WT) mice. Data are means ± SD of nine mice of each genotype. Five independent experiments were performed. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 by two-tailed, unpaired *t* test. Bottom: Cell surface staining of CD5 on gated DP and CD4 SP thymocyte subsets from Themis1-tg (Tg) and littermate control (Th<sup>+/+</sup>) mice. Data are representative of three independent experiments.



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

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

that positive selection is not affected (33). In that study, the authors used the MHC class I-restricted H-Y TCR transgenic and the MHC class II-restricted DO.11 TCR transgenic mice to evaluate positive selection. In contrast to these observations, we found that the proportions of CD4 SP thymocytes and Vα11<sup>high</sup> thymocytes were reduced by 40 to 50% in AND-Grb2<sup>+/-</sup> mice compared to that in AND-Grb2<sup>+/+</sup> mice (Fig. 7C and fig. S8A). Positive selection was also impaired, although to a lesser extent, in OT-2-Grb2<sup>+/-</sup> mice (fig. S8B). Note that Themis1 overexpression corrected the defect in positive selection caused by Grb2 haploinsufficiency as demonstrated by the restoration of normal proportions of CD4 SP and either Vα11<sup>high</sup> (for AND) or Vα2<sup>high</sup> (for OT-2) T cells in the thymus (Fig. 7C and fig. S8, A and B).

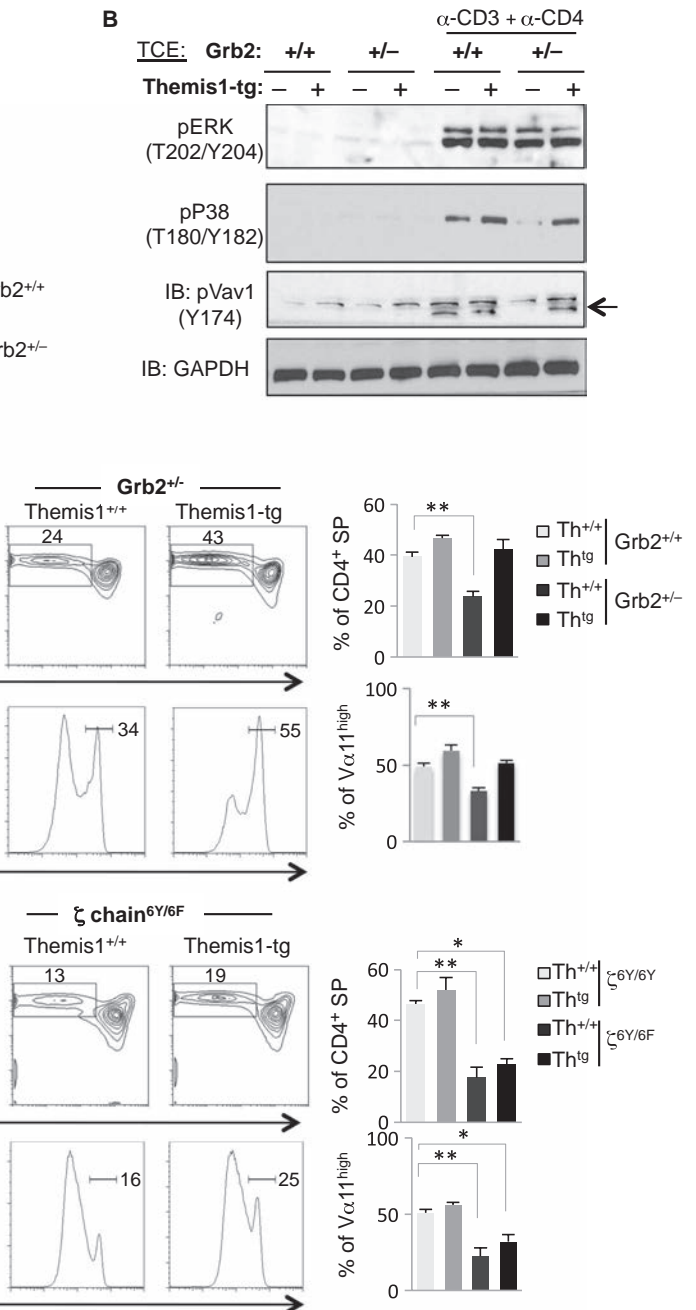
To determine whether Themis1 overexpression restored T cell development in mice that exhibit a TCR signaling defect that is not linked to Grb2 signaling complexes, we crossed AND-Themis1-tg mice with knock-in mice that express a mutant CD3ζ chain protein that lacks signaling capability (ζ<sup>6E/6F</sup>). We previously reported that TCR signaling is attenuated in homozygous ζ<sup>6E/6F</sup> mice, which exhibit a block in positive selection at the DP stage. AND-ζ<sup>6Y/6F</sup> mice, which have one copy of wild-type ζ<sup>6Y</sup> and one copy



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

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

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



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

mice compared to those in AND- $\zeta$ <sup>6Y/6Y</sup> control mice (Fig. 7D). Consistent with a positive effect on TCR signaling, Themis1 overexpression in AND-Themis1 transgenic  $\zeta$ <sup>6F/6Y</sup> mice increased the percentages of CD4 SP thymocytes and

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

### *Themis1* hemideficiency exacerbates the defects in positive selection and TCR signaling in *Grb2*<sup>+/-</sup> mice

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

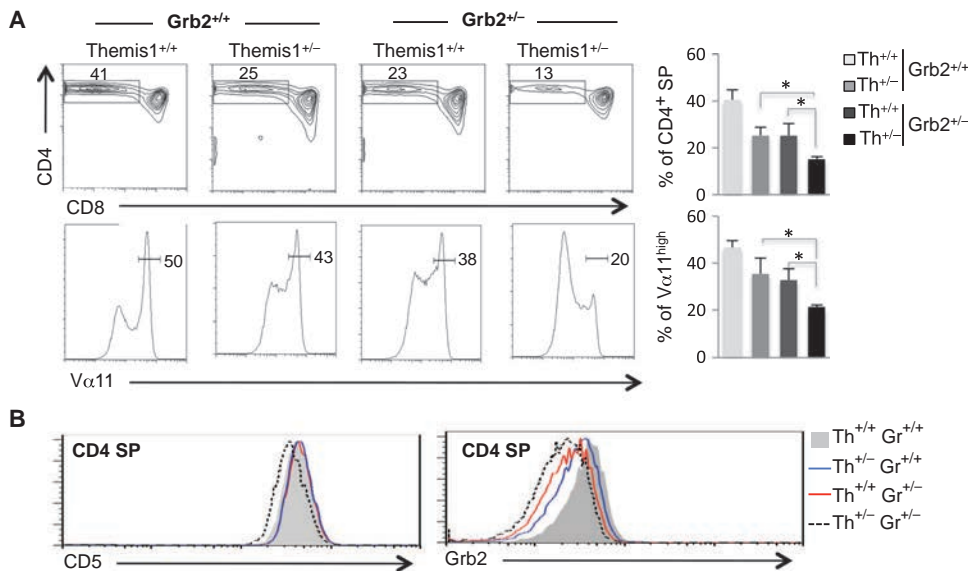
in *Grb2* cell surface abundance in thymocytes compared to that in thymocytes hemideficient in *Grb2* or *Themis1* alone (Fig. 8B).

### DISCUSSION

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

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

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



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

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

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

Our results demonstrated that the abundance of Grb2 was reduced in *Themis1*<sup>-/-</sup> thymocytes to an extent comparable to that in *Grb2*<sup>+/-</sup> thymocytes. Vav1 phosphorylation was also decreased in *Grb2*<sup>+/-</sup> thymocytes, which suggests that the reduced abundance of Grb2 in *Themis1*<sup>-/-</sup> thymocytes could account, at least in part, for the impaired phosphorylation of Vav1 in these cells in response to TCR engagement. Grb2 binds through its SH2 domain to phosphorylated tyrosine residues on LAT (28) and through its C-terminal SH3 domain to a PRR within Vav1 (26). *Themis1* may therefore facilitate the recruitment of Vav1 to LAT and its subsequent phosphorylation by the tyrosine kinase ZAP-70. Accordingly, we showed that the recruitment of Vav1 to LAT was impaired in *Themis1*<sup>-/-</sup> thymocytes. A previous study of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells showed that the recruitment of Vav1 to TCR signaling complexes was mostly mediated by the binding of SLP-76 to the Vav1 SH2 domain through Tyr<sup>112</sup> and Tyr<sup>126</sup> of SLP-76 (39). In that study, deletion of the Vav1 SH2 domain prevented

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

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

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

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

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

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

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

### Antibodies and flow cytometry

Sources for antibodies and reagents used in this study include the following: anti-Grb2 (C-23), anti-PLC- $\gamma$ 1 (1249), anti-Vav1 (C-14), anti-ubiquitin (P4D1), and anti-c-Cbl (A9), which were from Santa Cruz Biotechnology; anti-LAT (11B.12), anti-Sos1, and anti-Rac1, which were from Millipore; anti-pVav1 (Y174), which was obtained from Abcam; and anti-pERK (T202/Y204), anti-pp38 (T180/Y182), and anti-pSHP-1 (Y564), which were obtained from Cell Signaling Technology. Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin was purchased from Life Technologies. Anti-*Themis1* rabbit antibodies were previously described (5). Thymocytes were incubated for 16 hours with cycloheximide (20  $\mu$ g/ml, Sigma) or 1  $\mu$ M MG132 (EMD Biosciences). Biotin- and fluorochrome-conjugated antibodies against CD3 $\epsilon$ , CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD24, CD25, CD44, and V $\alpha$ 11 were purchased from BD Biosciences. Single-cell suspensions from the thymus, spleen, or lymph nodes were incubated in phosphate-buffered saline, 0.5% bovine serum albumin, and 0.01% NaN<sub>3</sub> containing the appropriate antibodies. Cell detection was performed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences), and data analysis was performed with FlowJo software (Tree Star Inc.).

### Thymocyte stimulation and immunoprecipitation

For MS analysis,  $2 \times 10^8$  thymocytes from *Themis1*<sup>+/+</sup> or *Themis1*<sup>-/-</sup> mice were left untreated or were treated with 100 nM pervanadate for 5 min at 37°C. The treatment was stopped on ice, and cells were immediately centrifuged and resuspended in 2 ml of ice-cold lysis buffer [10 mM tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM NaF, 1 mM EDTA, and protease inhibitor cocktail tablet (Roche)] and incubated for 20 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 18,000g for 15 min at 4°C, and *Themis1* was subjected to immunoprecipitation from cleared lysates for 2 hours at 4°C with 30  $\mu$ l of protein A-Sepharose

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

### Analysis of MS data

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

### Rac1 activation assay

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

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

### Western blotting analysis and band quantification

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

### RT-PCR analysis

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

### Statistical analysis

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

### SUPPLEMENTARY MATERIALS

[www.sciencesignaling.org/cgi/content/full/9/428/ra51/DC1](http://www.sciencesignaling.org/cgi/content/full/9/428/ra51/DC1)

Materials and Methods

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

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

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

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

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

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

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

Fig. S8. Transgenic expression of Themis1 in *Grb2*<sup>+/+</sup> mice restores positive selection in TCR transgenic mice.

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

### REFERENCES AND NOTES

- J. N. Mandl, J. P. Monteiro, N. Vriskoop, R. N. Germain, T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity* **38**, 263–274 (2013).
- G. Fu, S. Vallée, V. Rybakina, M. V. McGuire, J. Ampudia, C. Brockmeyer, M. Salek, P. R. Fallen, J. A. H. Hoerter, A. Munshi, Y. H. Huang, J. Hu, H. S. Fox, K. Sauer, O. Acuto, N. R. J. Gascoigne, Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat. Immunol.* **10**, 848–856 (2009).

- A. L. Johnson, L. Aravind, N. Shulzhenko, A. Morgun, S.-Y. Choi, T. L. Crockford, T. Lambe, H. Domaschek, E. M. Kucharska, L. Zheng, C. G. Vinuesa, M. J. Lenardo, C. C. Goodnow, R. J. Comall, R. H. Schwartz, *Themis* is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat. Immunol.* **10**, 831–839 (2009).
- K. Kakugawa, T. Yasuda, I. Miura, A. Kobayashi, H. Fukiage, R. Satoh, M. Matsuda, H. Koseki, S. Wakana, H. Kawamoto, H. Yoshida, A novel gene essential for the development of single positive thymocytes. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5128–5135 (2009).
- R. Lesoume, S. Uehara, J. Lee, K.-D. Song, L. Li, J. Pinkhasov, Y. Zhang, N.-P. Weng, K. F. Wildt, L. Wang, R. Bosselut, P. E. Love, Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat. Immunol.* **10**, 840–847 (2009).
- M. S. Patrick, H. Oda, K. Hayakawa, Y. Sato, K. Eshima, T. Kirikae, S.-i. Iemura, M. Shirai, T. Abe, T. Natsume, T. Sasazuki, H. Suzuki, Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 16345–16350 (2009).
- W. Paster, C. Brockmeyer, G. Fu, P. C. Simister, B. de Wet, A. Martinez-Riaño, J. A. H. Hoerter, S. M. Feller, C. Wülfing, N. R. J. Gascoigne, O. Acuto, GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J. Immunol.* **190**, 3749–3756 (2013).
- C. Brockmeyer, W. Paster, D. Pepper, C. P. Tan, D. C. Trudgian, S. McGowan, G. Fu, N. R. J. Gascoigne, O. Acuto, M. Salek, T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *J. Biol. Chem.* **286**, 7535–7547 (2011).
- R. Lesoume, E. Zvezdova, K.-D. Song, D. El-Khoury, S. Uehara, V. A. Barr, L. E. Samelson, P. E. Love, Interchangeability of Themis1 and Themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J. Immunol.* **189**, 1154–1161 (2012).
- G. Fu, J. Casas, S. Rigaud, V. Rybakina, F. Lambalez, J. Brzostek, J. A. H. Hoerter, W. Paster, O. Acuto, H. Cheroutre, K. Sauer, N. R. J. Gascoigne, Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* **504**, 441–445 (2013).
- W. Paster, A. M. Bruger, K. Katsch, C. Grégoire, R. Roncagalli, G. Fu, N. R. J. Gascoigne, K. Nika, A. Cohnen, S. M. Feller, P. C. Simister, K. C. Molder, S.-P. Cordoba, O. Dushek, B. Malissen, O. Acuto, A THEMIS:SHP1 complex promotes T-cell survival. *EMBO J.* **34**, 393–409 (2015).
- K. G. Johnson, F. G. LeRoy, L. K. Borysiewicz, R. J. Matthews, TCR signaling thresholds regulating T cell development and activation are dependent upon SHP-1. *J. Immunol.* **162**, 3802–3813 (1999).
- D. R. Plas, C. B. Williams, G. J. Kersh, L. S. White, J. M. White, S. Paust, T. Ulyanova, P. M. Allen, M. L. Thomas, Cutting edge: The tyrosine phosphatase SHP-1 regulates thymocyte positive selection. *J. Immunol.* **162**, 5680–5684 (1999).
- J. Zhang, A.-K. Somani, D. Yuen, Y. Yang, P. E. Love, K. A. Siminovich, Involvement of the SHP-1 tyrosine phosphatase in regulation of T cell selection. *J. Immunol.* **163**, 3012–3021 (1999).
- C. C. Fowler, L. I. Pao, J. N. Blattman, P. D. Greenberg, SHP-1 in T cells limits the production of CD8 effector cells without impacting the formation of long-lived central memory cells. *J. Immunol.* **185**, 3256–3267 (2010).
- A. E. Moran, K. L. Holzappel, Y. Xing, N. R. Cunningham, J. S. Maltzman, J. Punt, K. A. Hogquist, T cell receptor signal strength in T<sub>reg</sub> and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **208**, 1279–1289 (2011).
- R. M. Siegel, M. Katsumata, T. Miyashita, D. C. Louie, M. I. Greene, J. C. Reed, Inhibition of thymocyte apoptosis and negative antigenic selection in *bcl-2* transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7003–7007 (1992).
- O. Williams, T. Norton, M. Halligey, D. Kioussis, H. J. M. Brady, The action of Bax and bcl-2 on T cell selection. *J. Exp. Med.* **188**, 1125–1133 (1998).
- L. F. Reynolds, L. A. Smyth, T. Norton, N. Freshney, J. Downward, D. Kioussis, V. L. J. Tybulewicz, Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C- $\gamma$ 1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J. Exp. Med.* **195**, 1103–1114 (2002).
- A. Saveliev, L. Vanes, O. Ksionda, J. Rapley, S. J. Smerdon, K. Rittinger, V. L. J. Tybulewicz, Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in T cell development and activation. *Sci. Signal.* **2**, ra83 (2009).
- J. Wu, D. G. Motto, G. A. Koretzky, A. Weiss, Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* **4**, 593–602 (1996).
- B. Aghazadeh, W. E. Lowry, X.-Y. Huang, M. K. Rosen, Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* **102**, 625–633 (2000).
- S. P. Hehner, T. G. Hofmann, O. Dienz, W. Dröge, M. L. Schmitz, Tyrosine-phosphorylated Vav1 as a point of integration for T-cell receptor- and CD28-mediated activation of JNK, p38, and interleukin-2 transcription. *J. Biol. Chem.* **275**, 18160–18171 (2000).
- K. V. Salojin, J. Zhang, T. L. Delovitch, TCR and CD28 are coupled via ZAP-70 to the activation of the Vav/Rac1-/PAK-1/p38 MAPK signaling pathway. *J. Immunol.* **163**, 844–853 (1999).

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

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

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

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



**Annexe 2 : Choi S, Warzecha C, Zvezdova E, Lee J, Argenty J, Lesourne R, Aravind L, Love PE. 2017. THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1. Nat Immunol**

Pour cette annexe, j'ai contribué à la révision de l'article. Brièvement, afin de vérifier que la signalisation est diminuée suite à la stimulation des cellules en condition physiologique, j'ai stimulé des thymocytes issus de souris THEMIS<sup>1-/-</sup> CMH<sup>-/-</sup> OTII avec des LB chargés ou non du peptide OVA. Par westernblot, j'ai analysé la phosphorylation de SHP-1 et ZAP-70 ainsi que des phosphotyrosines totales. Ces résultats sont présentés Figure supplémentaire 4b.





# THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1

Seeyoung Choi<sup>1</sup>, Claude Warzecha<sup>1</sup>, Ekaterina Zvezdova<sup>1</sup>, Jan Lee<sup>1</sup>, Jérémy Argenty<sup>2,3</sup>, Renaud Lesourne<sup>2,3</sup>, L Aravind<sup>4</sup> & Paul E Love<sup>1</sup>

**THEMIS, a T cell-specific protein with high expression in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes, has a crucial role in positive selection and T cell development. THEMIS lacks defined catalytic domains but contains two tandem repeats of a distinctive module of unknown function (CABIT). Here we found that THEMIS directly regulated the catalytic activity of the tyrosine phosphatase SHP-1. This action was mediated by the CABIT modules, which bound to the phosphatase domain of SHP-1 and promoted or stabilized oxidation of SHP-1's catalytic cysteine residue, which inhibited the tyrosine-phosphatase activity of SHP-1. Deletion of SHP-1 alleviated the developmental block in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes. Thus, THEMIS facilitates thymocyte positive selection by enhancing the T cell antigen receptor signaling response to low-affinity ligands.**

T cell development is a continuous process that begins when progenitor cells that originate in the fetal liver or adult bone marrow enter the thymus and are induced to commit to the T cell lineage. Thymocytes progress through multiple well-defined maturational steps that for simplicity are grouped into three main stages defined by expression of the co-receptors CD4 and CD8: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (double negative (DN)), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (double positive (DP)), and CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> (single positive: CD4SP or CD8SP, respectively). The transition of thymocytes through these stages of maturation is dependent upon signals transmitted by various cell-surface molecules, including Notch, cytokine receptors and precursor or mature forms of the T cell antigen receptor (TCR)<sup>1,2</sup>.

All thymocytes are subjected to a selection process at the DP stage that is based on the affinity of their expressed TCR for self-peptide ligands bound to major histocompatibility complex (self-pMHC) that tests TCR functionality and enforces self-tolerance<sup>3</sup>. Thymocytes that express TCRs that fail to bind to self-pMHC or that bind with high affinity to self-pMHC are 'non-selected' or 'negatively selected', respectively, and are triggered to undergo apoptotic death, whereas thymocytes that express TCRs that bind with low affinity to self-pMHC are 'positively selected' and progress to the CD4SP or CD8SP stage<sup>3</sup>. The affinity of the TCR for self-pMHC controls the intensity and duration of the TCR signaling response, which in turn leads to the differential activation of downstream signal-transduction pathways and transcriptional responses that dictate cell fate<sup>4</sup>.

Thymocyte selection is dependent upon the expression and function of several lineage-restricted effector molecules, including the

protein tyrosine kinases (PTKs) LCK and ZAP-70, the protein tyrosine phosphatase (PTP) SHP-1 (encoded by *Ptpn6*), and specialized adaptors such as LAT and SLP-76 (refs. 5,6). THEMIS, a T cell-specific protein, has an important role in thymocyte selection. In the absence of THEMIS, thymocyte development is partially blocked at the DP-to-SP transition stage, which results in a substantial reduction in mature CD4SP thymocytes and, to lesser extent, CD8SP thymocytes and peripheral T cells<sup>7-11</sup>.

THEMIS is the 'founding member' of a group of structurally related proteins that are defined by the presence of one or more copies of a CABIT ('cysteine-containing all beta in THEMIS') globular module with a median length of 261 amino acids that contains a conserved core motif ( $\phi$ XCX<sub>7-26</sub> $\phi$ XLP $\phi$ X<sub>3</sub>GXF, where ' $\phi$ ' is any hydrophobic residue, 'X' is any amino acid, and the subscripted number indicates the number of residues)<sup>9</sup>. All members of the mammalian THEMIS family, including THEMIS, THEMIS2 (which is restricted to B cells and myeloid cells) and the more distantly related THEMIS3 (which is expressed in the large and small intestine<sup>7</sup>) contain two tandem CABIT modules and a C-terminal proline-rich sequence but lack a known catalytic domain<sup>9</sup>. THEMIS binds directly to the cytosolic adaptor GRB2, and this interaction requires the proline-rich sequence of THEMIS<sup>12,13</sup>. Mass-spectrometry screens of proteins co-immunoprecipitated with THEMIS have identified SHP-1 as a putative THEMIS-interacting protein<sup>14,15</sup>, and it has been suggested that THEMIS functions by regulating the activity of SHP-1 or its recruitment to LAT<sup>16,17</sup>. Nevertheless, a specific role for THEMIS in T cell development has not been clearly defined, and it remains unclear if

<sup>1</sup>Section on Hematopoiesis and Lymphocyte Biology, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <sup>2</sup>Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France. <sup>3</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1043, Centre National de la Recherche Scientifique, U5282, and Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France. <sup>4</sup>National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Correspondence should be addressed to P.E.L. (lovep@mail.nih.gov).

Received 6 November 2016; accepted 25 January 2017; published online 27 February 2017; corrected online 7 March 2017 (details online); doi:10.1038/ni.3692

its effect on TCR signaling is mainly activating or inhibitory<sup>14–16</sup>. A particular challenge has been to identify a function for the CABIT modules that constitute most of the THEMIS protein. The presence of highly conserved core sequences and their requirement for THEMIS activity *in vivo*<sup>18</sup> suggests that CABIT modules have an important biological role; however, their distinctiveness from all previously described protein domains indicates that they may perform a unique cellular function<sup>9</sup>.

In this study, we identify a biological function for the CABIT modules that clarifies the role of THEMIS in T cell development. We found that the THEMIS CABIT modules bound directly to the PTP domain of SHP-1 and inhibited the PTP activity of SHP-1 by promoting or stabilizing oxidation of the catalytic cysteine residue. That activity, coupled with the stage-specific regulation of THEMIS during T cell development<sup>7–9,11</sup>, provides an explanation for the unusual sensitivity of DP thymocytes to TCR stimulation<sup>19</sup>, a property that is essential for positive selection.

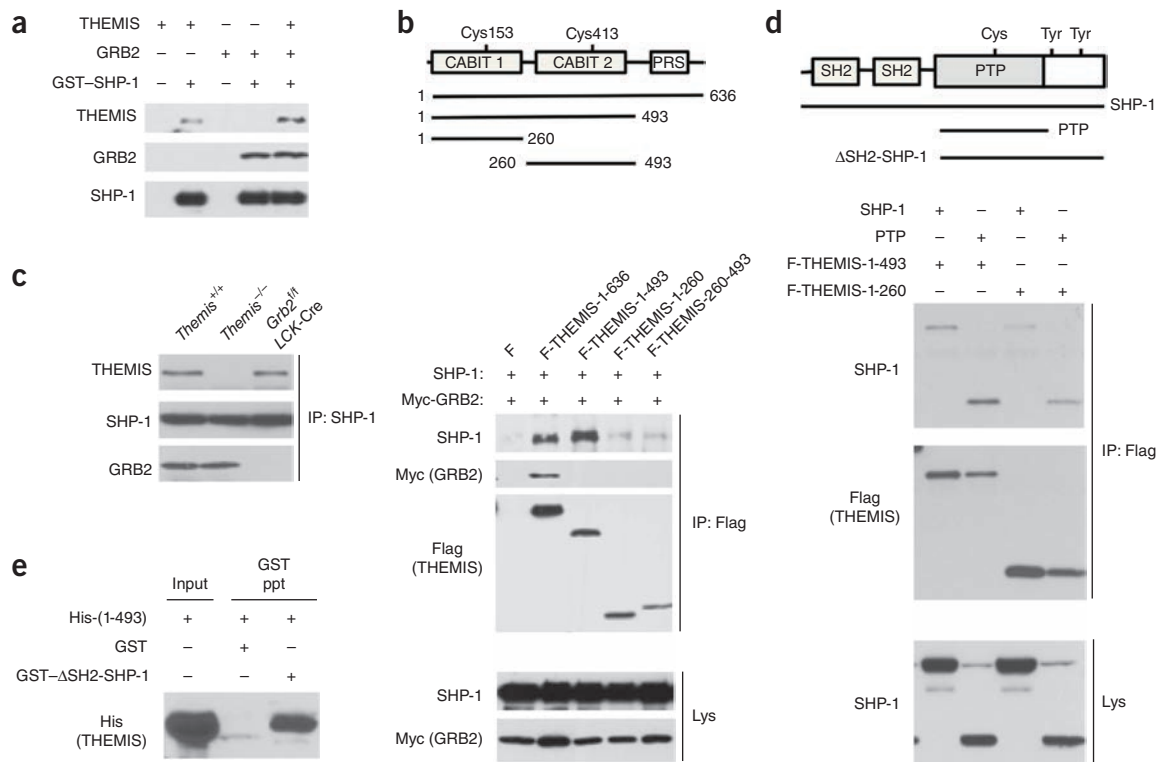
## RESULTS

### Binding of THEMIS to the PTP domain of SHP-1

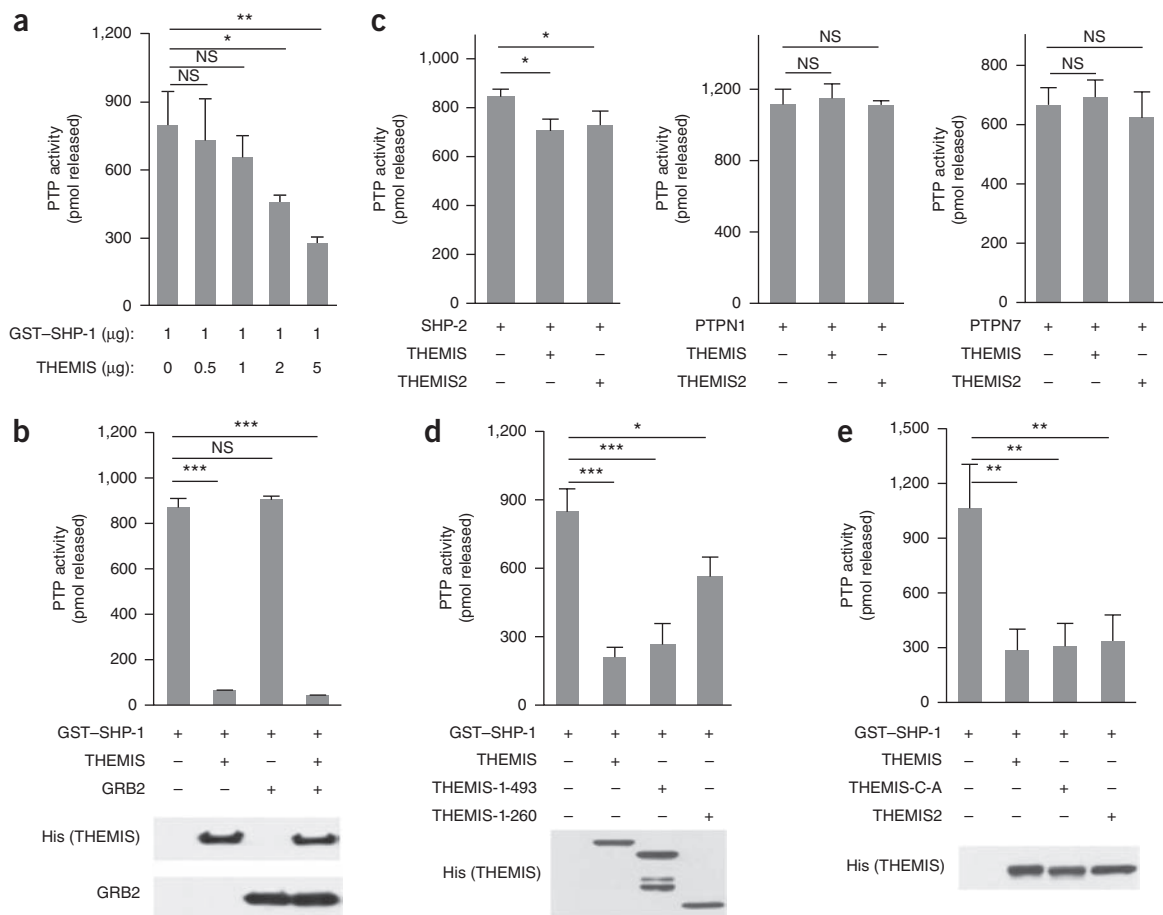
To determine if THEMIS binds directly to SHP-1, we first performed cell-free *in vitro* protein-binding assays. THEMIS bound to a glutathione S-transferase (GST)–SHP-1 fusion protein in the absence of GRB2, although the THEMIS–SHP-1 interaction was enhanced by

GRB2 (Fig. 1a). In lysates of HEK-293 human embryonic kidney cells co-transfected with plasmids encoding SHP-1 and THEMIS lacking the GRB2-binding proline-rich sequence (THEMIS-1-493), SHP-1 immunoprecipitated together with THEMIS-1-493 (Fig. 1b). GRB2-independent association of THEMIS and SHP-1 was also detected by co-immunoprecipitation of THEMIS with SHP-1 from lysates of GRB2-deficient total thymocytes (Fig. 1c).

SHP-2 (another dual Src-homology-2 (SH2) PTP that is closely related to SHP-1) bound to THEMIS when co-expressed in HEK-293 cells, but two other class I PTPs (PTPN1 and PTPN7) that are expressed in thymocytes did not bind to THEMIS (Supplementary Fig. 1a,b). To locate the sequences within THEMIS that mediated its binding to SHP-1, we next performed co-immunoprecipitation experiments in HEK-293 cells transfected with plasmids encoding SHP-1 and various truncations of THEMIS. SHP-1 immunoprecipitated together with a THEMIS protein that contained only the CABIT1 and CABIT2 modules (THEMIS-1-493) and, to a lesser extent, with truncated THEMIS proteins containing only the CABIT1 module (THEMIS-1-260) or CABIT2 module (THEMIS-260-493) (Fig. 1b). In similar co-transfection experiments, a protein containing only the PTP domain of SHP-1 immunoprecipitated together with THEMIS-1-493 and with THEMIS-1-260 (Fig. 1d). Also, purified SHP-1 lacking both SH2 domains but containing the PTP domain (GST- $\Delta$ SH2-SHP-1) bound to THEMIS-1-493 *in vitro* (Fig. 1e and Supplementary Fig. 1c,d).



**Figure 1** THEMIS binds directly to SHP-1. **(a)** *In vitro* GST-precipitation assay of GST-SHP-1, assessing the binding of THEMIS to SHP-1 in the presence (+) or absence (-) of GRB2. **(b)** Co-immunoprecipitation analysis (below) of the binding of THEMIS CABIT modules to SHP-1 in HEK-293 cells co-transfected with Flag (F) parent plasmid or plasmid encoding various Flag-tagged (F-) THEMIS constructs (top) plus plasmids encoding SHP-1 and Myc-tagged GRB2 (above lanes), assessed by immunoblot analysis of cell lysates (bottom two blots) or proteins immunoprecipitated with anti-Flag (IP: Flag; top three blots). PRS, proline-rich sequence. **(c)** Co-immunoprecipitation analysis of THEMIS and SHP-1 in lysates of total thymocytes from *Themis*<sup>+/+</sup>, *Themis*<sup>-/-</sup> and GRB2-deficient (*Grb2*<sup>fl/fl</sup> LCK-Cre) mice (above lanes). **(d)** Co-immunoprecipitation analysis (below) of the binding of THEMIS CABIT modules to the PTP domain of SHP-1 in HEK-293 cells co-transfected to express various Flag-tagged THEMIS constructs (as in **b**) plus plasmid encoding SHP-1 or its PTP domain (top) (above lanes), assessed by immunoblot analysis of lysates or immunoprecipitated proteins as in **b**. **(e)** *In vitro* GST-precipitation (ppt) assay of GST-SHP-1, assessing the binding of histidine tagged THEMIS CABIT modules (His-1-493) to the PTP domain of SHP-1 ( $\Delta$ SH2-SHP-1 construct, **d**). Data are representative of three experiments.



**Figure 2** THEMIS directly inhibits the tyrosine-phosphatase activity of SHP-1. **(a)** *In vitro* PTP assay of GST-SHP-1 in the presence of increasing amounts (below plot) of THEMIS; results are presented (throughout) as picomoles of phosphate released. **(b)** *In vitro* PTP assay (top) of GST-SHP-1 in the presence (+) or absence (-) of THEMIS or GRB2 or both (below plot), with non-PTP proteins added at a molar ratio 5:1, relative to the PTP (in **b-e**); below, immunoblot analysis of input histidine-tagged THEMIS or GRB2. **(c)** *In vitro* PTP assay of SHP-2 (left), PTPN1 (middle) or PTPN7 (right) in the presence or absence of THEMIS or THEMIS2 (below plots). **(d,e)** *In vitro* PTP assay of GST-SHP-1 in the presence or absence of THEMIS, THEMIS-1-493 or THEMIS-1-260 **(d)** or THEMIS, THEMIS-C-A or THEMIS2 **(e)**. NS, not significant ( $P > 0.05$ ); \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.005$  (*t*-test). Data are representative of three experiments (**a-c**, **d,e** (GST-SHP-1, PTPN1 or PTPN7 with THEMIS variants or THEMIS2); mean + s.d.) or five experiments (**a,b,d,e** (GST-SHP-1 alone or with THEMIS); mean + s.d.).

Together these results demonstrated that the CABIT modules of THEMIS interacted directly with the PTP domain of SHP-1.

### Inhibition of SHP-1's PTP activity by the THEMIS CABIT modules

To determine if THEMIS directly regulates the PTP activity of SHP-1, we used an *in vitro* assay to detect the release of phosphate from a tyrosine-phosphorylated peptide. The PTP activity of SHP-1 was diminished in the presence of THEMIS, and this correlated with the concentration of THEMIS (**Fig. 2a**). The PTP activity of SHP-1 was not inhibited by GRB2, which also binds to SHP-1, which demonstrated that the inhibitory effect was specific to THEMIS; however, the inhibition of SHP-1 was slightly greater when THEMIS and GRB2 were added together (**Fig. 2b**). In a similar assay, the PTP activity of SHP-2 was diminished slightly by THEMIS, whereas THEMIS did not inhibit the PTP activity of PTPN1 or PTPN7 (**Fig. 2c**). THEMIS-1-493 was nearly as effective as full-length THEMIS at inhibiting the PTP activity of SHP-1 (**Fig. 2d**), which indicated that the CABIT modules were responsible for this inhibitory function of THEMIS. THEMIS-1-260 also inhibited the PTP activity of SHP-1, although not as effectively as THEMIS-1-493, which contains both CABIT modules (**Fig. 2d**); this indicated that a single CABIT module contained the

sequences necessary for regulating the PTP activity of SHP-1 but that both CABIT modules were required for full inhibition. THEMIS2, which 'rescues' the developmental block in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes when transgenically expressed in thymocytes, and therefore could substitute for THEMIS *in vivo*<sup>13</sup>, inhibited the PTP activity of SHP-1 (**Fig. 2e**) and, to a lesser extent, that of SHP-2, but not that of PTPN1 or PTPN7, in *in vitro* tyrosine-phosphatase assays (**Fig. 2c**).

All mammalian CABIT modules contain a conserved cysteine residue (underlined below) within the core motif of  $\phi$ XCX<sub>7</sub><sub>26</sub> $\phi$ XLP $\phi$ X<sub>3</sub>GXF<sup>9</sup>. To determine the role of the cysteine residue in the regulatory activity of THEMIS, we introduced cysteine-to-alanine point substitutions in both the CABIT1 module (Cys153) and CABIT2 module (Cys413) of THEMIS (THEMIS-C-A). THEMIS-C-A immunoprecipitated together with SHP-1 in lysates of HEK-293 cells transfected to express THEMIS-C-A and SHP-1 (**Supplementary Fig. 1e**) and inhibited the PTP activity of SHP-1 in an *in vitro* tyrosine-phosphatase assay (**Fig. 2e**), which indicated that the cysteine residues in the CABIT domains were not essential for regulating the PTP activity of SHP-1. This was consistent with published observations that retrovirally encoded THEMIS-C-A is able to 'rescue' the DP-to-SP developmental block in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes<sup>20</sup>. These

results demonstrated that the THEMIS CABIT modules directly inhibited the PTP activity of SHP-1 and that the conserved core cysteine was not required for this function.

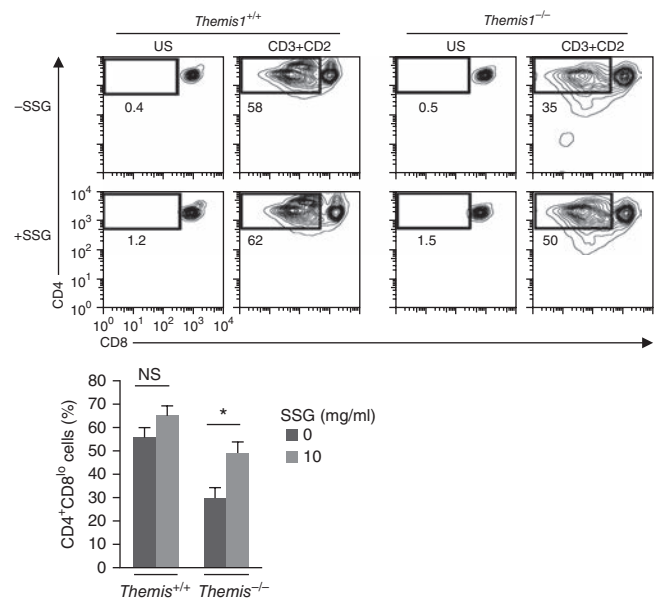
### Deletion of *Ptpn6* restores T cell development in *Themis*<sup>-/-</sup> mice

We next determined if inhibition of the PTP activity of SHP-1 would reverse the developmental block in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes in an *in vitro* differentiation assay<sup>21</sup>. Overnight culture of immature (TCR<sup>lo</sup>) DP thymocytes with plate-bound antibody to the TCR invariant chain CD3ε (anti-CD3ε) plus antibody to the adhesion molecule CD2 (anti-CD2), followed by 24 h of rest without stimulation, induces their progression to the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup> stage<sup>21</sup>, which replicates the initial stages of positive selection *in vivo*. In contrast to wild-type DP thymocytes, *Themis*<sup>-/-</sup> DP thymocytes exhibited an impaired ability to transition to the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup> stage<sup>7</sup> (Fig. 3). The block in the progression of *Themis*<sup>-/-</sup> DP thymocytes to the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup> stage was significantly alleviated when the *in vitro* assay was performed in the presence of sodium stibogluconate, a selective inhibitor of SHP-1 (ref. 22) (Fig. 3); this indicated that the enhanced PTP activity of SHP-1 in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes contributed to the developmental defect.

To determine if the developmental block in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes could be 'rescued' by a reduction in the expression of SHP-1, we generated *Themis*<sup>-/-</sup> *Ptpn6*<sup>fl/fl</sup>*Cd4*-Cre mice, in which T cell-lineage-specific deletion of *loxP*-flanked alleles encoding SHP-1 (*Ptpn6*<sup>fl/fl</sup>), via Cre recombinase expressed via the T cell-specific *Cd4* promoter, occurs mainly in DP thymocytes<sup>23</sup>. Thymocytes from *Themis*<sup>-/-</sup> *Ptpn6*<sup>+/+</sup>*Cd4*-Cre control mice exhibited normal maturation up to the DP stage but a marked reduction in the number of CD4SP thymocytes and, to lesser extent, CD8SP thymocytes and peripheral T cells (Fig. 4a,b), similar to the developmental phenotype of *Themis*<sup>-/-</sup> mice<sup>7</sup>. The expression of SHP-1 in total thymocytes from *Themis*<sup>-/-</sup> *Ptpn6*<sup>fl/fl</sup>*Cd4*-Cre mice was reduced to approximately 25% that observed in total thymocytes from *Themis*<sup>-/-</sup> *Ptpn6*<sup>+/+</sup>*Cd4*-Cre mice, as assessed by densitometry (Fig. 4c). This reduction in the expression of SHP-1 alleviated the developmental block, as evinced by the significantly greater frequency and number of mature TCR<sup>hi</sup> CD4SP and CD8SP thymocytes and peripheral T cells in *Themis*<sup>-/-</sup> *Ptpn6*<sup>fl/fl</sup>*Cd4*-Cre mice than in *Themis*<sup>-/-</sup> *Ptpn6*<sup>+/+</sup>*Cd4*-Cre mice (Fig. 4a,b). In contrast to *Themis*<sup>-/-</sup> *Ptpn6*<sup>+/+</sup>*Cd4*-Cre mice, which had a large frequency of peripheral T cells with a CD62L<sup>lo-neg</sup>CD44<sup>hi</sup> memory T cell phenotype as a result of lymphopenia-induced expansion<sup>7</sup>, the frequency of CD62L<sup>lo-neg</sup>CD44<sup>hi</sup> T cells in *Themis*<sup>-/-</sup> *Ptpn6*<sup>fl/fl</sup>*Cd4*-Cre mice was similar to that in *Themis*<sup>+/+</sup> *Ptpn6*<sup>+/+</sup>*Cd4*-Cre mice (Fig. 4a). Deletion of *Ptpn6* at an earlier stage of development (predominantly at the DN stage) through the use of an *LCK*-Cre transgene<sup>23</sup> resulted in a nearly complete absence of SHP-1 protein in total thymocytes and also substantially alleviated the developmental block caused by the deletion of *Themis* (Supplementary Fig. 2). Together these results indicated that the developmental defect in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes was due to the enhanced PTP activity of SHP-1.

### Regulation of active-site oxidation of SHP-1 by THEMIS

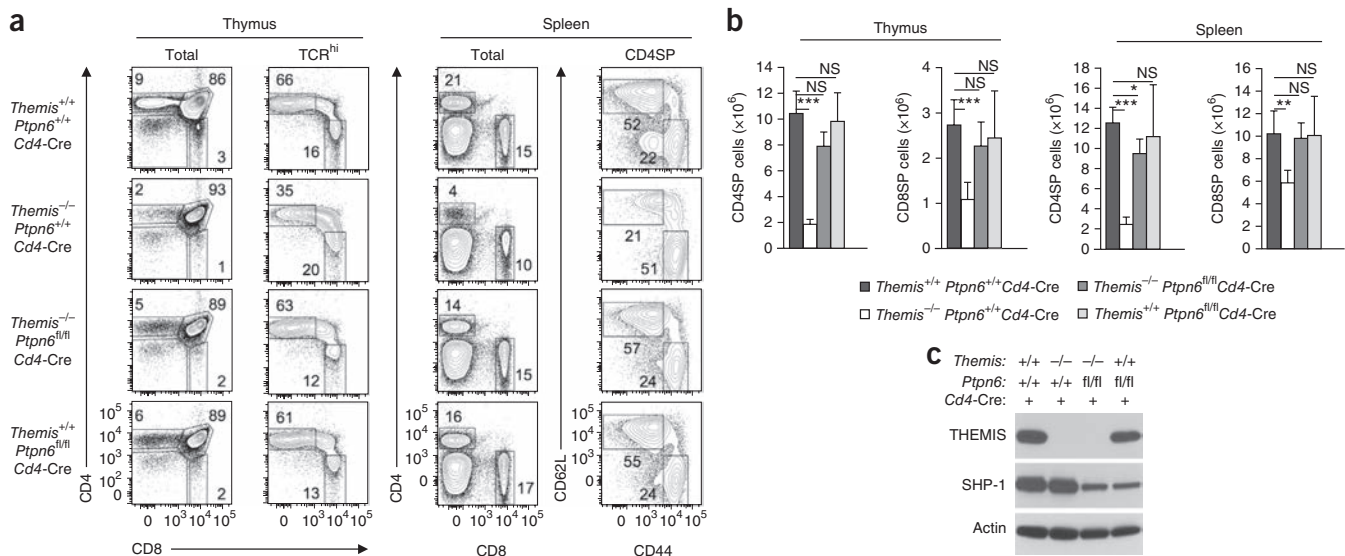
All classical PTPs, including SHP-1 and SHP-2, contain a conserved active-site cysteine residue (with an unusually low acidic dissociation constant) that catalyzes the removal of phosphate from phosphorylated tyrosines<sup>6</sup>. However, the catalytically active deprotonated (S<sup>-</sup>) thiolate state of the active-site cysteine is highly susceptible to oxidation by intracellular reactive oxygen species (ROS), which inactivate the PTP<sup>6</sup>. To determine if the binding of THEMIS to SHP-1 directly regulates the redox state of the active-site cysteine, we added pervanadate, a pan-tyrosine-phosphatase inhibitor that irreversibly oxidizes



**Figure 3** Inhibition of the PTP activity of SHP-1 restores the *in vitro* maturation of *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes. Flow cytometry (top) of *Themis*<sup>-/-</sup> or *Themis*<sup>+/+</sup> DP thymocytes left unstimulated (US) or treated by a two-step (stimulation-rest) process *in vitro* with anti-CD3 plus anti-CD2 (CD3+CD2), in the presence (+SSG) or absence (-SSG) of the SHP-1 inhibitor sodium stibogluconate (left margin); cell recovery and frequency of apoptotic cells (positive for the apoptosis marker annexin V) were similar for *Themis*<sup>-/-</sup> and *Themis*<sup>+/+</sup> samples treated identically (data not shown). Numbers under outlined areas (top) indicate percent CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup> cells. Below, summary of results above. \**P* < 0.05 (*t*-test two-tailed equal variance). Data are representative of (top) or from (bottom) four experiments with *n* = 1 mouse per genotype in each (error bars, s.d.).

PTP active-site cysteine residues to the sulfonic acid (S-O<sub>3</sub>H) form<sup>24</sup>, to cell-free suspensions of GST-SHP-1 in the presence or absence of THEMIS. Oxidized SHP-1 was detected by immunoblot analysis with a monoclonal antibody specific for sulfonated PTP active-site cysteines<sup>25</sup>. Oxidation of SHP-1 by pervanadate was enhanced in the presence of THEMIS, and this effect was most evident at concentrations of pervanadate that resulted in sub-maximal oxidation of SHP-1 (Fig. 5a and Supplementary Fig. 3a). THEMIS also increased the susceptibility of SHP-1 to oxidation by pervanadate in HEK-293 cells co-transfected to express THEMIS and SHP-1 (Fig. 5b and Supplementary Fig. 3b).

To evaluate the redox status of SHP-1 in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes, we labeled catalytically active SHP-1 at the time of cell lysis by the addition of iodoacetyl-polyethylene glycol-biotin, which immediately and irreversibly binds to reduced, de-protonated (-S<sup>-</sup>) cysteine thiols<sup>25</sup>. The abundance of catalytically active SHP-1 was slightly but consistently greater in *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes and was lower in total thymocytes with transgenic expression of THEMIS<sup>14</sup> than in *Themis*<sup>+/+</sup> (control) total thymocytes (Fig. 5c). Lysis of thymocytes in the absence of PTP inhibitors resulted in the rapid oxidation and inactivation of SHP-1 (Supplementary Fig. 3c,d); consequently, we were unable to accurately evaluate the PTP activity of SHP-1 immunoprecipitated from thymocyte lysates by the tyrosine-phosphatase assay. However, SHP-1 was much less susceptible to oxidation by pervanadate in *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes than in *Themis*<sup>+/+</sup> total thymocytes (Fig. 5d and Supplementary Fig. 3e). The susceptibility of SHP-1 to oxidation by pervanadate was restored in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes with transgenic expression of THEMIS2 (ref. 13) (Fig. 5e), which demonstrated



**Figure 4** Deletion of *Ptpn6* alleviates the developmental block in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes. **(a)** Flow cytometry of cells from the thymus (left) or spleen (right) of *Themis*<sup>+/+</sup> *Ptpn6*<sup>+/+</sup> *Cd4-Cre* mice, *Themis*<sup>-/-</sup> *Ptpn6*<sup>+/+</sup> *Cd4-Cre* mice, *Themis*<sup>-/-</sup> *Ptpn6*<sup>fl/fl</sup> *Cd4-Cre* mice or *Themis*<sup>+/+</sup> *Ptpn6*<sup>fl/fl</sup> *Cd4-Cre* mice (left margin), assessing the staining of CD4 versus CD8 on total thymocytes (left column) or gated TCR<sup>hi</sup> thymocytes (right column) (thymus), or the staining CD4 versus CD8 on total splenocytes (left column) or staining of CD62L versus CD44 on gated CD4SP T cells (right column) (spleen). Numbers adjacent to outlined areas indicate percent cells in each gated area. **(b)** Quantification of CD4SP cells and CD8SP cells in the thymus and spleen of mice of the genotypes in **(a)** (key). **(c)** Immunoblot analysis of THEMIS, SHP-1 and actin (loading control) in the thymocytes in **(a)** (genotypes, above lanes). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.005 (*t*-test). Data are from one experiment representative of four experiments with *n* = 1 mouse per genotype in each **(a,c)** or are from four experiments with *n* = 1 mouse per genotype in each **(b)**; mean + s.d.).

a function shared by THEMIS and THEMIS2. The activation of T cells and B cells results in the production of ROS, predominantly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and this effect has been shown to positively regulate both TCR and BCR signaling and effector responses through oxidative inhibition of SHP-1 (refs. 26–28). In the presence of THEMIS, active-site oxidation of SHP-1 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assessed by immunoblot analysis with antibody to sulfonated PTP active sites, was markedly increased (Fig. 5f), which indicated that THEMIS regulated the redox state of SHP-1 in response to physiological ROS. Together these results demonstrated that THEMIS inhibited the PTP activity of SHP-1 by promoting or stabilizing ROS-mediated oxidation of the active-site cysteine residue of SHP-1.

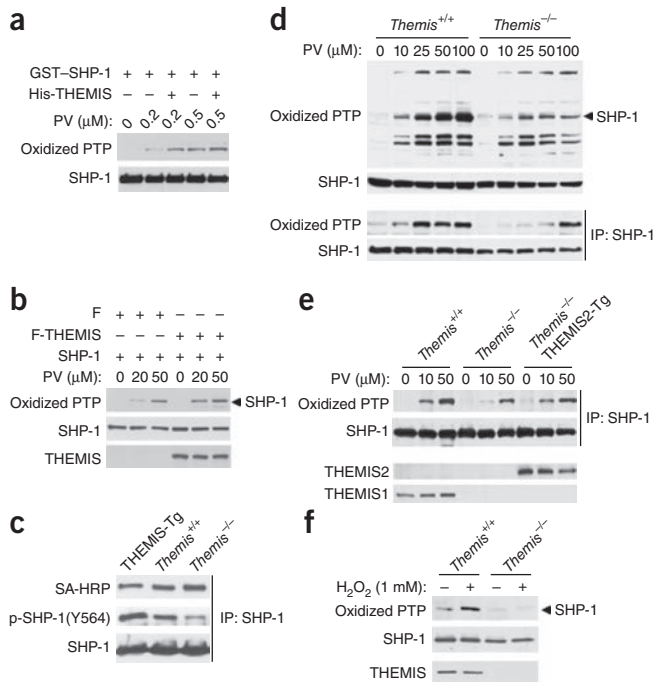
#### p-SHP-1 does not correspond with PTP activity

We found that phosphorylation of SHP-1, which occurs at two C-terminal tyrosine residues (Tyr536 and Tyr564), was lower in *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes than in *Themis*<sup>+/+</sup> total thymocytes (Fig. 6a,b), in confirmation of published results<sup>16</sup>. The amount of tyrosine-phosphorylated SHP-1 (p-SHP-1) in total thymocytes correlated with the expression of THEMIS protein, and the amount of p-SHP-1 was restored in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes by expression of a transgene encoding THEMIS2 (ref. 13) (Fig. 6a–c). The lower abundance of p-SHP-1 in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes has been interpreted as evidence of diminished catalytic activity of SHP-1 (ref. 16); however, phosphorylation of SHP-1 is not required for its PTP catalytic activity, and its physiological relevance has not been established<sup>6,29</sup>. The amount of catalytically active SHP-1 in unstimulated *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes was greater than, not less than, that in *Themis*<sup>+/+</sup> total thymocytes (Fig. 5c,f). Because SHP-1 is a target of SHP-1's phosphatase activity<sup>6,29,30</sup>, we reasoned that the diminished amount of p-SHP-1 in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes was secondary to increased auto- or trans-dephosphorylation by SHP-1. Indeed, treatment of both *Themis*<sup>+/+</sup> total thymocytes and *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes with pervanadate

or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which inhibit SHP-1 activity, led to an increase in p-SHP-1 relative to its abundance in their untreated counterparts (Fig. 6d,e). Together these results demonstrated that SHP-1's phosphorylation status could not be used to predict its PTP catalytic activity and suggested that the lower abundance of p-SHP-1 in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes was secondary to enhanced auto- or trans-dephosphorylation by SHP-1.

#### *Themis*<sup>-/-</sup> signaling defects in the presence of ROS

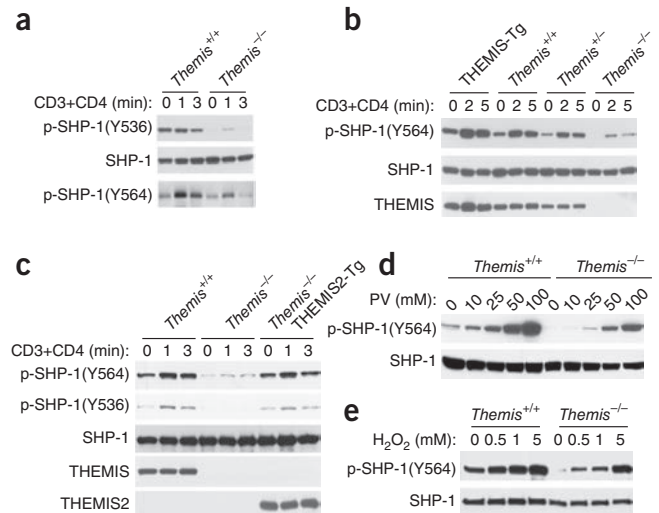
In contrast to mature T cells, in which engagement of the TCR induces the production of ROS<sup>31–33</sup>, stimulation of thymocytes via the TCR failed to elicit ROS<sup>34</sup> (Supplementary Fig. 4a). However, ROS are induced in thymocytes by stimulation with the lectin concanavalin A<sup>34</sup>, which engages multiple cell-surface molecules in addition to the TCR. Tyrosine-phosphorylation of the PTK ZAP-70 (p-ZAP-70), a known target of SHP-1 (refs. 6,35), at Tyr319 was lower in *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes than in *Themis*<sup>+/+</sup> total thymocytes following stimulation with concanavalin A (Fig. 7a), whereas there was no difference between *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes and *Themis*<sup>+/+</sup> total thymocytes in their abundance of p-ZAP-70 following stimulation with anti-CD3 plus anti-CD4 (Fig. 7b,c). However, when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added at the time of stimulation with anti-CD3 plus anti-CD4, the tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 induced by this was lower in *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes than in *Themis*<sup>+/+</sup> total thymocytes (Fig. 7b). *In vitro* cell culture promotes ROS production due to high oxygen tension as well as pro-oxidant metabolic and media effects<sup>36</sup>. Freshly harvested *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes exhibited no clear defects in proximal TCR signaling responses relative to those of *Themis*<sup>+/+</sup> total thymocytes (Fig. 7c). However, after *in vitro* culture for 6 h, the tyrosine phosphorylation of ZAP-70, as well as the tyrosine-phosphorylation of LCK (phosphorylated at Tyr394), another putative target of SHP-1 (ref. 37), was lower in *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes than in *Themis*<sup>+/+</sup> total thymocytes in response to either stimulation with anti-CD3 plus anti-CD4 (Fig. 7c,d) or stimulation with peptide presented by



**Figure 5** THEMIS promotes or stabilizes the oxidation of SHP-1.

(a) Immunoblot analysis of the *in vitro* active-site oxidation of GST-SHP-1 after treatment with various concentrations (above lanes) of pervanadate (PV) in the presence or absence of histidine-tagged (His-) THEMIS (above lanes). (b) Immunoblot analysis of the active-site oxidation of SHP-1 in HEK-293 cells transfected to express a Flag epitope vector (F) or Flag-tagged (F-) THEMIS (above lanes) and treated with various concentrations of pervanadate; arrowhead (right margin) indicates SHP-1 (throughout). (c) Immunoblot analysis of proteins immunoprecipitated with anti-SHP-1 from total thymocytes of mice with transgenic expression of THEMIS (THEMIS-Tg), or *Themis*<sup>+/+</sup> or *Themis*<sup>-/-</sup> mice (above lanes) after labeling with iodoacetyl-polyethylene glycol-biotin, probed with streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) for the detection catalytically active (reduced) SHP-1 (top), antibody to SHP-1 phosphorylated at Tyr564 (p-SHP-1(Tyr564); middle) or anti-SHP-1 (bottom). (d) Immunoblot analysis of active-site oxidation of SHP-1 in *Themis*<sup>+/+</sup> and *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes treated with various concentrations of pervanadate, assessed in cell lysates (top two blots) or proteins immunoprecipitated with anti-SHP-1 (bottom two blots). (e) Immunoblot analysis of thymocytes obtained from *Themis*<sup>+/+</sup> or *Themis*<sup>-/-</sup> mice or from *Themis*<sup>-/-</sup> mice with transgenic expression of THEMIS2 (THEMIS2-Tg) (above lanes) and treated with various concentrations of pervanadate, assessed in proteins immunoprecipitated with anti-SHP-1 (top two blots) or cell lysates (bottom two blots). (f) Immunoblot analysis of active-site oxidation of SHP-1 in thymocytes treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Data are representative of two experiments (a,b,d), six experiments (c) or three experiments (e,f).

antigen-presenting cells (Supplementary Fig. 4b). *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes also exhibited less induction of tyrosine-phosphorylation of LCK and ZAP-70 in response to treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone than that of *Themis*<sup>+/+</sup> total thymocytes treated in an identical way (Fig. 7e). De-phosphorylation of ZAP-70 or of the related B cell PTK SYK by SHP-1 was inhibited by THEMIS in HEK-293 cells transfected with plasmids encoding ZAP-70 or SYK plus plasmid encoding SHP-1 and cultured under conditions in which ROS are constitutively produced<sup>36</sup> (Fig. 7f,g). THEMIS-mediated inhibition of the PTP activity of SHP-1 in HEK-293 cells transfected with plasmids encoding SYK and SHP-1 (Supplementary Fig. 5a) or *in vitro* (Supplementary Fig. 5b) was attenuated by the addition of the ROS scavenger *N*-acetyl-L-cysteine, which indicated that the redox regulation of SHP-1 by THEMIS was



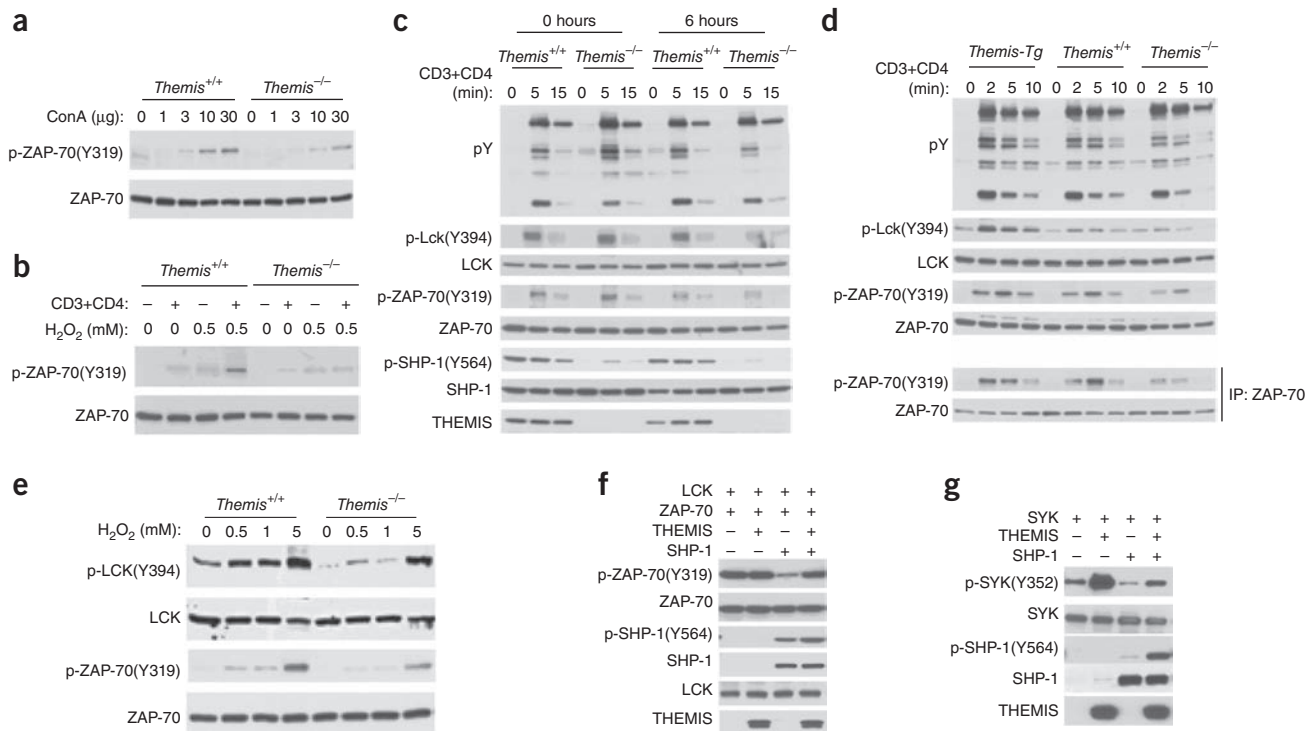
**Figure 6** The diminished tyrosine-phosphorylation of SHP-1 in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes is caused by increased PTP activity of SHP-1. (a) Immunoblot analysis of SHP-1 phosphorylated at Tyr536 (p-SHP-1(Y536)) or Tyr564 (p-SHP-1(Y564)) and total SHP-1 (left margin) in *Themis*<sup>+/+</sup> and *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes left unstimulated (0) or stimulated for 1 or 3 min (above lanes) with anti-CD3 plus anti-CD4 (CD3+CD4). (b) Immunoblot analysis of SHP-1 phosphorylated at Tyr564 and total SHP-1, as well as total THEMIS (left margin), in total thymocytes obtained from mice with transgenic expression of THEMIS, and *Themis*<sup>+/+</sup>, *Themis*<sup>+/+</sup> or *Themis*<sup>-/-</sup> mice (above blots). (c) Immunoblot analysis of tyrosine-phosphorylated and total SHP-1 (as in a; left margin) in total thymocytes obtained from *Themis*<sup>+/+</sup> and *Themis*<sup>-/-</sup> mice and *Themis*<sup>-/-</sup> mice with transgenic expression of THEMIS2 (above blots) and stimulated as in a (above lanes). (d,e) Immunoblot analysis of tyrosine-phosphorylated and total SHP-1 (as in b; left margin) in total thymocytes obtained from *Themis*<sup>+/+</sup> and *Themis*<sup>-/-</sup> mice and treated with various concentrations (above lanes) of pervanadate (d) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (e). Data are representative of three experiments (a,c), four experiments (b) or six experiments (d,e).

dependent upon ROS. Collectively, these results established a positive role for THEMIS in proximal TCR signaling by promoting or stabilizing the oxidation of SHP-1 by ROS.

## DISCUSSION

Here we have shown that a critical function of THEMIS during T cell development is to negatively regulate the activity of the PTP SHP-1 in DP thymocytes and thereby enhance the TCR signaling response to low-affinity self-pMHC and enable positive selection. THEMIS promoted or stabilized oxidation of the catalytic cysteine of SHP-1, which inhibited its PTP activity, and this regulatory activity was conferred by the CABIT modules that bound directly to the PTP domain of SHP-1.

While it remains to be determined how the CABIT modules regulate the oxidation of SHP-1, several plausible mechanisms can be suggested on the basis of their inferred structure together with what is already known about the structure and redox regulation of SHP-1. CABIT modules, which are composed of multiple SH3-like  $\beta$ -barrel domains<sup>9</sup>, probably form an extensive protein-binding globular interface that specifically recognizes the PTP domain of SHP-1. The catalytic cysteine residue of all classical PTPs is housed inside a pocket with an aperture that allows the entry of only the phosphate moiety on tyrosine residues<sup>38</sup>. Thus, binding of the CABIT modules might prevent access of the oxidized catalytic cysteine of SHP-1 to reducing agents such as glutathione in the bulk solvent or to cytosolic



**Figure 7** Attenuated TCR signaling responses in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes in the presence of ROS. **(a,b)** Immunoblot analysis of ZAP-70 phosphorylated at Tyr319 (p-ZAP-70(Y319)) and total ZAP-70 (left margins) in *Themis*<sup>+/+</sup> and *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes stimulated with various concentrations (above lanes) of concanavalin A (ConA) **(a)** or with various concentrations (above lanes) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence (+) or absence (-) of anti-CD3 plus anti-CD4 **(b)**. **(c)** Immunoblot analysis of signaling responses (left margin) in *Themis*<sup>+/+</sup> or *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes cultured for 0 h (left) or 6 h (right) at 37 °C in serum-free medium and left unstimulated (0) or stimulated for 5 or 15 min (above lanes) with anti-CD3 plus anti-CD4, assessed as tyrosine phosphorylation (pY), LCK phosphorylated at Tyr394 (p-LCK(Y394)) and total LCK, tyrosine-phosphorylated and total ZAP-70 (as in **a,b**), SHP-1 phosphorylated at Tyr564 (p-SHP-1(Y564)) and total SHP-1, and total THEMIS (left margin). **(d)** Immunoblot analysis of signaling responses (left margin; as in **c**) in total thymocytes obtained from mice with transgenic expression of THEMIS, or *Themis*<sup>+/+</sup> or *Themis*<sup>-/-</sup> mice, then cultured for 6 h at 37 °C in serum-free medium and left unstimulated (0) or stimulated for 2, 5 or 10 min (above lanes) with anti-CD3 plus anti-CD4. **(e)** Immunoblot analysis of tyrosine-phosphorylated and total LCK and ZAP-70 (as in **c**) in *Themis*<sup>+/+</sup> or *Themis*<sup>-/-</sup> total thymocytes treated with various concentrations (above lanes) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **(f)** Immunoblot analysis of tyrosine-phosphorylated and total ZAP-70 and SHP-1 (as in **c**), and total LCK and THEMIS (left margin), in HEK-293 cells transfected with various combinations (above lanes) of plasmids encoding LCK (always included, to induce phosphorylation of ZAP-70), ZAP-70, THEMIS and/or SHP-1. **(g)** Immunoblot analysis of SYK phosphorylated at Tyr352 (p-SYK(Y352)) and total SYK, tyrosine-phosphorylated and total SHP-1 (as in **c**) and total THEMIS in HEK-293 cells transfected with various combinations (above lanes) of plasmids encoding SYK, THEMIS and SHP-1. Data are representative of three experiments (**a,b,d,e**), four experiments (**c**) or two experiments (**f,g**).

redox-regulatory proteins<sup>39</sup>. Alternatively, the CABIT modules might stabilize the PTP domain of SHP-1 in an unfolded state, which would expose the catalytic cysteine to oxidation by ROS or prevent reactivation of the oxidized catalytic cysteine by inhibiting intra-molecular relay of sulfenic acid to the two regulatory cysteine residues (Cys329 and Cys363) in SHP-1 (refs. 40,41). We note that our *in vitro* PTP-inhibition data suggest that the inhibitory effect of THEMIS cannot be explained solely by redox regulation. Thus, binding of the CABIT modules probably also blocks access of the catalytic cysteine to phosphorylated-tyrosine ligands, a mechanism of inhibition that is not mutually exclusive with redox regulation.

Although the CABIT modules of THEMIS bound directly to SHP-1, experimental data suggest that the interaction of THEMIS with GRB2 is important for its *in vivo* function<sup>12,18,20</sup>. Co-binding of SHP-1 and THEMIS to GRB2 brings these proteins into close proximity and might facilitate and stabilize their direct interaction. In addition, following engagement of the TCR, GRB2, via its SH2 domain, recruits SHP-1 to tyrosine-phosphorylated ligands at the cell membrane, including LAT and CD28 (ref. 42). Thus, the binding to GRB2 ensures that THEMIS is positioned to affect the activity of

the cellular portion of SHP-1 that is presumably the most relevant to TCR signaling. Finally, GRB2 might also be needed to position SHP-1 and THEMIS near sites of ROS production by NADPH oxidases at the cell membrane.

It has been proposed that THEMIS enhances the activity of SHP-1, either directly or by assisting in its recruitment to LAT, and thereby acts to dampen TCR signaling in DP thymocytes<sup>16</sup>. According to that model, the PTP activity of SHP-1 is diminished in *Themis*<sup>-/-</sup> DP thymocytes, and engagement of the TCR by low-affinity ligands that normally promote positive selection results in the transduction of enhanced signaling responses that trigger negative selection<sup>16</sup>. Our results do not support that model. If the thymocyte-maturation defect of *Themis*<sup>-/-</sup> mice was caused by diminished SHP-1 activity, deletion of *Ptpn6* or inhibition of the PTP activity of SHP-1 should not have ‘rescued’, and might possibly have exacerbated, the block in T cell development in *Themis*<sup>-/-</sup> mice. Instead, inhibition of the PTP activity of SHP-1 or deletion of *Ptpn6* in DP thymocytes alleviated the developmental block imposed by THEMIS deficiency; these results identified enhanced PTP activity of SHP-1 as the underlying cause of the maturational defect in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes. It is also



relevant that T cell development is not 'rescued' in either *Themis*<sup>-/-</sup> mice deficient in BIM, a proapoptotic member of the BCL-2 family of prosurvival proteins (*Bim*<sup>-/-</sup>)<sup>14</sup> or *Themis*<sup>-/-</sup> mice with transgenic expression of BCL-2 (ref. 7), which indicates that the developmental block in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes is not secondary to increased negative selection, as has been speculated<sup>16</sup>.

It is well established that DP thymocytes are more sensitive to TCR stimulation than are mature T cells<sup>19</sup>. Although the mechanism(s) underlying this sensitivity has (have) remained unclear, the enhanced signaling ability of DP thymocytes is thought to be especially important for positive selection, which is mediated by signals generated from low-affinity TCR-self-pMHC interactions in the thymus. Our results, together with the profound block in positive selection exhibited by *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes, suggest that THEMIS might be responsible for the selective sensitivity of DP thymocytes to engagement of the TCR. Consistent with that, DP thymocytes have high expression of THEMIS, but its expression is downregulated as thymocytes transition to the SP stage and become less responsive to low-affinity self ligands<sup>7</sup>, a property that is necessary for the prevention of autoimmunity. Thus, stage-specific regulation of THEMIS represents a mechanism for transient and selective attenuation of SHP-1 activity in DP thymocytes to enable positive selection while preserving the SHP-1-mediated inhibitory pathway for limiting the responsiveness of mature T cells.

Our results suggest that in addition to regulating SHP-1, THEMIS might also regulate the activity of SHP-2, a closely related class I SH2 domain PTP. THEMIS bound to SHP-2, and the PTP activity of SHP-2 was attenuated by THEMIS (albeit only slightly in *in vitro* assays). If THEMIS does have an inhibitory effect on SHP-2 in thymocytes, this might help to explain the observation that under certain stimulatory conditions, the kinase ERK and calcium signaling responses to engagement of the TCR are enhanced in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes<sup>16</sup>. Unlike SHP-1, which is thought to have an exclusively inhibitory role in signal transduction, SHP-2 positively regulates ERK and calcium-NFAT-mediated signaling<sup>6,43,44</sup>. However, it is notable that in contrast to the 'rescue' observed in *Themis*<sup>-/-</sup>*Ptpn6*<sup>-/-</sup> mice, deletion of the gene encoding SHP-2 (*Ptpn11*) did not alleviate the block in positive selection in *Themis*<sup>-/-</sup> mice (data not shown), which would indicate that the main function of THEMIS in thymocytes is to regulate the catalytic activity of SHP-1.

Our results have also identified an important role for ROS in thymocyte selection. Published data have suggested that ROS might have a role in positive selection and the maturation of SP thymocytes, but this mechanism has not been investigated extensively<sup>45,46</sup>. ROS, generated following the activation of T cells by the cell-membrane NADPH oxidase NOX2 or by mitochondria as a result of 'metabolic reprogramming', or locally produced by macrophages at sites of inflammation, have been shown to positively regulate the activation and effector responses of mature T cells, in part by inhibition of SHP-1 (ref. 47). The origin of ROS production in the thymus remains to be elucidated and could include both intrinsic (thymocyte-derived) sources and extrinsic (cortical epithelial, dendritic cell or macrophage) sources. The defects in TCR signaling in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes, which stem at least in part from diminished oxidative inactivation of SHP-1 by ROS, are most clearly revealed under conditions in which ROS are generated or present during TCR-co-receptor engagement. This provides an explanation for the relatively mild signaling defects and the contradictory results reported by studies in which activation of *Themis*<sup>-/-</sup> thymocyte was performed under conditions in which ROS are not present or are not produced<sup>7,8,14,16</sup>.

Analysis of a comprehensive collection of over 100 species across the eukaryotic tree has revealed that the CABIT module is found only in metazoa and that its emergence correlates with the expansion of the phosphorylated-tyrosine signaling network<sup>9</sup> (data not shown). Together with the biochemical function established for THEMIS in our study here, this suggests that the CABIT module evolved in metazoa as a mechanism for regulating phosphorylated-tyrosine signaling. The sequence diversity outside the core sequence of CABIT modules raises the possibility that different CABIT modules might have evolved to interact with distinct PTPs. That, combined with organ-restricted or developmentally restricted expression of CABIT proteins, such as that exhibited by THEMIS, could represent a novel mechanism for selective regulation of PTK-PTP signaling responses in particular cellular contexts or during specific stages of maturation.

## METHODS

Methods, including statements of data availability and any associated accession codes and references, are available in the [online version of the paper](#).

*Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.*

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Muschen (University of California, San Francisco) for *Ptpn6*<sup>flox/flox</sup> mice; H. Gu (McGill University) for *Grb2*<sup>fl/fl</sup> mice; A. Ullrich (Max-Planck Institute, Germany) for *Ptpn6* cDNA; L. Tautz (Sanford-Burnham Medical Research Institute) for *Ptpn7* cDNA; J. Chernoff (Fox Chase Cancer Center) for plasmid encoding hemagglutinin-tagged PTPN1; and A. Bhandoola, R. Bosselut, R. Cornall, K. Pfeifer and A. Singer for critical review of the manuscript. Supported by the Intramural Research Program of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (1ZIAHD001803 to P.E.L.) and by the Intramural Research Program of the National Library of Medicine (L.A.).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.C., C.W., E.Z., J.L. and J.A. performed the experiments; S.C., R.L. and P.E.L. were responsible for the concept and experimental design; L.A. performed proteomics, protein modeling and evolutionary analysis for the CABIT module and CABIT proteins; and P.E.L. wrote the manuscript.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Koch, U. & Radtke, F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 539–562 (2011).
- Aifantis, I., Mandal, M., Sawai, K., Ferrando, A. & Vilimas, T. Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor. *Immunity* **209**, 159–169 (2006).
- Starr, T.K., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 139–176 (2003).
- Hogquist, K.A. & Jameson, S.C. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate 'decisions' and effector function. *Nat. Immunol.* **15**, 815–823 (2014).
- Brownlie, R.J. & Zamoyska, R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 257–269 (2013).
- Pao, L.I., Badour, K., Siminovitch, K.A. & Neel, B.G. Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 473–523 (2007).
- Lesourne, R. *et al.* Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat. Immunol.* **10**, 840–847 (2009).
- Fu, G. *et al.* Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat. Immunol.* **10**, 848–856 (2009).
- Johnson, A.L. *et al.* Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat. Immunol.* **10**, 831–839 (2009).
- Kakugawa, K. *et al.* A novel gene essential for the development of single positive thymocytes. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5128–5135 (2009).
- Patrick, M.S. *et al.* Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 16345–16350 (2009).

12. Paster, W. *et al.* GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J. Immunol.* **190**, 3749–3756 (2013).
13. Lesourne, R. *et al.* Interchangeability of Themis1 and Themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J. Immunol.* **189**, 1154–1161 (2012).
14. Zvezdova, E. *et al.* Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Sci. Signal.* **9**, ra51 (2016).
15. Paster, W. *et al.* A THEMIS-SHP1 complex promotes T-cell survival. *EMBO J.* **34**, 393–409 (2015).
16. Fu, G. *et al.* Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* **504**, 441–445 (2013).
17. Gascoigne, N.R. & Acuto, O. THEMIS: a critical TCR signal regulator for ligand discrimination. *Curr. Opin. Immunol.* **33**, 86–92 (2015).
18. Okada, T. *et al.* Differential function of Themis CABIT domains during T cell development. *PLoS One* **9**, e89115 (2014).
19. Davey, G.M. *et al.* Preselection thymocytes are more sensitive to T cell receptor stimulation than mature T cells. *J. Exp. Med.* **188**, 1867–1874 (1998).
20. Zvezdova, E. *et al.* In vivo functional mapping of the conserved protein domains within murine Themis1. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 721–728 (2014).
21. Cibotti, R., Punt, J.A., Dash, K.S., Sharrow, S.O. & Singer, A. Surface molecules that drive T cell development in vitro in the absence of thymic epithelium and in the absence of lineage-specific signals. *Immunity* **6**, 245–255 (1997).
22. Pathak, M.K. & Yi, T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J. Immunol.* **167**, 3391–3397 (2001).
23. Lee, P.P. *et al.* A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* **15**, 763–774 (2001).
24. Huyer, G. *et al.* Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* **272**, 843–851 (1997).
25. Karisch, R. & Neel, B.G. Methods to monitor classical protein-tyrosine phosphatase oxidation. *FEBS J.* **280**, 459–475 (2013).
26. Michalek, R.D. *et al.* The requirement of reversible cysteine sulfenic acid formation for T cell activation and function. *J. Immunol.* **179**, 6456–6467 (2007).
27. Singh, D.K. *et al.* The strength of receptor signaling is centrally controlled through a cooperative loop between Ca<sup>2+</sup> and an oxidant signal. *Cell* **121**, 281–293 (2005).
28. Capasso, M. *et al.* HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species. *Nat. Immunol.* **11**, 265–272 (2010).
29. Lorenz, U. SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. *Immunol. Rev.* **228**, 342–359 (2009).
30. Ozawa, T., Nakata, K., Mizuno, K. & Yakura, H. Negative autoregulation of Src homology region 2-domain-containing phosphatase-1 in rat basophilic leukemia-2H3 cells. *Int. Immunol.* **19**, 1049–1061 (2007).
31. Devadas, S., Zaritskaya, L., Rhee, S.G., Oberley, L. & Williams, M.S. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J. Exp. Med.* **195**, 59–70 (2002).
32. Los, M. *et al.* IL-2 gene expression and NF- $\kappa$ B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO J.* **14**, 3731–3740 (1995).
33. Jackson, S.H., Devadas, S., Kwon, J., Pinto, L.A. & Williams, M.S. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat. Immunol.* **5**, 818–827 (2004).
34. Pani, G., Colavitti, R., Borrello, S. & Galeotti, T. Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. *Biochem. J.* **347**, 173–181 (2000).
35. Plas, D.R. *et al.* Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science* **272**, 1173–1176 (1996).
36. Halliwell, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed. J.* **37**, 99–105 (2014).
37. Stefanova, I. *et al.* TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat. Immunol.* **4**, 248–254 (2003).
38. Andersen, J.N. *et al.* Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7117–7136 (2001).
39. Tanner, J.J., Parsons, Z.D., Cummings, A.H., Zhou, H. & Gates, K.S. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases: structural and chemical aspects. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 77–97 (2011).
40. Pregel, M.J. & Storer, A.C. Active site titration of the tyrosine phosphatases SHP-1 and PTP1B using aromatic disulfides. Reaction with the essential cysteine residue in the active site. *J. Biol. Chem.* **272**, 23552–23558 (1997).
41. Chen, C.Y., Willard, D. & Rudolph, J. Redox regulation of SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatases by two backdoor cysteines. *Biochemistry* **48**, 1399–1409 (2009).
42. Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. & Jordan, M.S. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 591–619 (2009).
43. Bunda, S. *et al.* Inhibition of SHP2-mediated dephosphorylation of Ras suppresses oncogenesis. *Nat. Commun.* **6**, 8859 (2015).
44. Fang, X. *et al.* Shp2 activates Fyn and Ras to regulate RBL-2H3 mast cell activation following Fc $\epsilon$ RI aggregation. *PLoS One* **7**, e40566 (2012).
45. Moon, E.Y., Han, Y.H., Lee, D.S., Han, Y.M. & Yu, D.Y. Reactive oxygen species induced by the deletion of peroxiredoxin II (PrxII) increases the number of thymocytes resulting in the enlargement of PrxII-null thymus. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2119–2128 (2004).
46. Jin, R. *et al.* Trx1/TrxR1 system regulates post-selected DP thymocytes survival by modulating ASK1-JNK/p38 MAPK activities. *Immunol. Cell Biol.* **93**, 744–752 (2015).
47. Simeoni, L. & Bogeski, I. Redox regulation of T-cell receptor signaling. *Biol. Chem.* **396**, 555–568 (2015).

## ONLINE METHODS

**Mice.** *Themis*<sup>-/-</sup> mice<sup>7</sup> and mice with transgenic expression of THEMIS<sup>13</sup> were generated as described. *Ptpn6*<sup>fllox/fllox</sup> mice<sup>48</sup> were obtained from M. Muschen (UCSF). *Grb2*<sup>fllox/fllox</sup> mice<sup>49</sup> were obtained from H. Gu (McGill University). *LCK-Cre* and *CD4-Cre* transgenic mice<sup>23</sup> were obtained from Taconic. All animal experiments were performed according to ACUC approved protocols (ASP# 15-020; PEL).

**Antibodies and reagents.** For stimulation, biotin-anti-CD3 (553060), biotin-anti-CD4 (553728), and biotin-anti-CD28 (553296), used at 0.5 µg each per 1 × 10<sup>7</sup> thymocytes, were from BD Biosciences. For immunoprecipitation, anti-Flag (F1804) Sigma-Aldrich; anti-SHP-1 (SC287) and anti-SHP-2 (SC280), with 1 µg of antibody used for 1 × 10<sup>7</sup> thymocytes, were from Santa Cruz. For immunoblot analysis, anti-pTyr (05321), anti-GST (06332), anti-ERK (06182), anti-SHP-1 (06117) EMD Millipore; anti-pTyr564-SHP-1 (8849) and anti-pTyr416-Src (2101) were from Cell signaling Technology; anti-pTyr319-ZAP-70 (612574) and anti-GRB2 (610111) were from BD Biosciences; anti-LCK (SC433), anti-SYK (SC1077), anti-ZAP-70 (SC574), anti-pERK (SC7383) and anti-hemagglutinin tag (SC805) were from Santa Cruz; anti-PTPN7 (ab118978) was from Abcam; anti-Myc tag (M0473) was from MBL International; anti-SHP-1 (MS1190) was from Thermo Fisher; anti-pTyr536-SHP-1(SP1571) was from ECM Biosciences; anti-actin (A5441) was from Sigma-Aldrich; and anti-oxidized PTP active site mAb (MAB2844) was from R&D Systems. The antibodies for immunoblot analysis were diluted 1:1,000. The rabbit polyclonal antiserum to THEMIS<sup>7</sup> or THEMIS2 (ref. 13) has been described. Streptavidin-HRP conjugate was purchased from Sigma-Aldrich. Streptavidin was purchased from Southern Biotechnology.

**Plasmids and constructs.** The constructs for Flag-tagged THEMIS and deletion mutants were subcloned into pFLAG-CMV2 vector by PCR with THEMIS-eGFP plasmid<sup>9</sup>. GST-THEMIS was subcloned into pEBG vector by PCR. THEMIS (C153A and C413A) was generated by site-directed mutagenesis with the Quik Change Kit (Stratagene). FLAG-tagged THEMIS2 was subcloned into pFLAG-CMV2 vector by PCR with mouse cDNA for THEMIS2 from ImaGene. *Ptpn6* cDNA was obtained from A. Ullrich (Max-Planck Institute, Germany). SHP-1 deletion mutants were subcloned into pCDNA3 vector by PCR from *Ptpn6* wild type cDNA. *Ptpn7* cDNA was provided by L. Tautz (Sanford-Burnham Medical Research Institute). Plasmid encoding hemagglutinin-tagged PTPN1 was a gift from J. Chernoff (Fox Chase Cancer Center).

**Immunoprecipitation and immunoblot analysis.** Thymocytes were stimulated with anti-CD3 biotin plus anti-CD4 biotin followed by cross-linking with streptavidin. Cells were then washed in ice-cold PBS and, unless stated otherwise, were lysed in standard lysis buffer (1% Nonidet P-40, 10 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 50 mM β-glycerophosphate, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, and protease inhibitors (Roche)). Immunoprecipitation and immunoblot analysis were performed as described<sup>14</sup>.

**Transient Transfections.** HEK-293 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% (vol/vol) FBS and 2 mM glutamine, plus penicillin and streptomycin (100 U/ml each). 1 × 10<sup>6</sup> cells were co-transfected with the appropriate plasmid using Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific). For pervanadate treatment, cells were first serum starved for 16 h after transfection.

**GST-precipitation assays.** GST-SHP-1 protein was purchased from Abcam. His-tagged THEMIS protein was purified by Ni-NTA column from the transformed *Escherichia coli* bacterial strain BL21DE3. GST fusion proteins were incubated with the indicated His-tagged proteins in GST binding buffer (300 mM HEPES (pH 7), 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA, 1 mg/ml BSA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF and protease inhibitors) for 30 min on ice and then glutathione-Sepharose (GE Healthcare) was added. After incubation for 30 min at 4 °C, this mixture was washed three times with GST wash buffer: [0.2% Triton X-100 and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> in 1× PBS].

**In vitro PTP assay.** GST-SHP-1, GST-PTPN1, and GST-PTPN7 fusion proteins were purchased from Abcam. GST-SHP-2 protein was purified with glutathione-Sepharose columns from the transformed *E. coli* bacterial strain BL21DE3. Purified PTP proteins were incubated with or without His-THEMIS (or variant), His-THEMIS2 and/or GRB2 proteins at a 1:5 molar ratio for 10 min on ice. PTP substrate peptide (RRLEDAEpYAARG) was added at a concentration of 0.2 mM in phosphatase assay buffer (20–180, EMD Millipore) and incubated for 30 min at room temperature. Released phosphate was detected by addition of malachite green (17–125, EMD Millipore) and quantitated from a standard curve. *N*-acetyl-L-cysteine was obtained from Sigma (Cat# A9165).

**Detection of reduced (catalytically active) SHP-1.** Reduced SHP-1 was detected by direct labeling of cell lysates with Iodoacetyl PEG-biotin (21334, Thermo Scientific). Cells were lysed in degassed oxidation lysis buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.5% NP-40, 0.5% Triton X-100, 50 mM NaF, 1 mM PMSE, 0.4 mM Iodoacetyl PEG-biotin, 100 µM DTPA, 200 U/ml catalase, and protease inhibitors). Lysates were immunoprecipitated with anti-SHP-1 overnight. Protein G-Sepharose was added and lysates were rotated for 1 h at 4 °C. Beads were washed three times with oxidation wash buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.5% Triton X-100, 50 mM NaF). Proteins were eluted with SDS loading buffer, separated on SDS-PAGE then transferred to PVDF membranes. Blots were probed with Streptavidin-HRP.

**Analysis of SHP-1 oxidation after stimulation with pervanadate or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Thymocytes or HEK-293 cells were stimulated with pervanadate for 10 min or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min at room temperature. Pervanadate (1 mM stock) was prepared with 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> mixed with 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final concentration) was 0.5–5 mM as noted for individual experiments. Following treatment, cells were washed with degassed 1× PBS and lysed in degassed standard lysis buffer including 10 mM iodoacetamide and 10 mM NEM. Immunoblot analysis of SHP-1 oxidation was performed with antibody to oxidized PTP active site.

**In vitro oxidation of SHP-1.** GST-SHP-1 fusion protein was incubated with glutathione-Sepharose for 30 min in degassed GST binding buffer minus Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and washed with degassed 1× GST wash buffer minus Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Beads were incubated with or without His-THEMIS fusion protein in phosphatase assay buffer for 10 min on ice and then pervanadate was added and protein solution was incubated for 10 min at room temperature. Reactions were washed with degassed GST wash buffer minus Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. SHP-1 oxidation was visualized by immunoblot analysis with antibody to oxidized PTP active site.

**In vitro thymocyte-differentiation assay.** The *in vitro* thymocyte differentiation assay was performed as described<sup>21</sup>. In brief, DP thymocytes purified by magnetic bead enrichment (Miltenyi) were resuspended in RPMI 1640 (supplemented with 50 µM 2-mercaptoethanol and 10% charcoal/dextran treated FBS) and incubated overnight in wells coated with anti-CD3 (10 µg/ml) plus anti-CD2 (5 µg/ml; RM2-5; BD Biosciences). Cells were extensively washed and either analyzed immediately by flow cytometry (stimulatory culture) or incubated for 24 h in the same medium before analysis by flow cytometry (recovery culture). Sodium stibogluconate (CAS16037-91-5) was from EMD Millipore.

**Statistics.** For PTP assays and cell (thymocyte and lymphocyte) counts, significance was calculated by *t*-test, 2-tailed, type 2 (unpaired equal variance).

**Data availability.** The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the paper and its supplementary information files.

48. Pao, L.I. *et al.* B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity. *Immunity* **27**, 35–48 (2007).
49. Jang, I.K. *et al.* Grb2 functions at the top of the T-cell antigen receptor-induced tyrosine kinase cascade to control thymic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 10620–10625 (2010).

## Corrigendum: Quantifying the shifting landscape of B cell immunodominance

Gordon A Dale, Jessica R Shartouny & Joshy Jacob

*Nat. Immunol.* **18**, 367–368 (2017); published online 22 March 2017; corrected after print 3 April 2017

In the version of this article initially published, a spelling error was made in the citation list. The error has been corrected in the HTML and PDF versions of the article.

## Erratum: Epigenetic landscapes reveal transcription factors that regulate CD8<sup>+</sup> T cell differentiation

Bingfei Yu, Kai Zhang, J Justin Milner, Clara Toma, Runqiang Chen, James P Scott-Browne, Renata M Pereira, Shane Crotty, John T Chang, Matthew E Pipkin, Wei Wang & Ananda W Goldrath

*Nat. Immunol.*; doi:10.1038/ni.3706; corrected online 27 March 2017

In the version of this article initially published online, some labels in Figure 2 were illegible or incorrect. Those should read “Enhancers ( $\times 10^3$ )” along the top and “TE, MP and M” (top to bottom) along the left margin of Figure 2a; “N, TE, MP and M” (left to right) above the plot in Figure 2b; and “GO” below the plot in Figure 2c. Also, in the third sentence of the final paragraph of the final subsection of Results (Validation of PageRank-predicted TFs), the description of the control cells (“shCon-transfected”) was incorrect. The correct text is “...lower among shNr3c1-transduced cells than among shCon-transduced cells...”. The errors have been corrected in the print, PDF and HTML versions of this article.

## Erratum: THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1

Seeyoung Choi, Claude Warzecha, Ekaterina Zvezdova, Jan Lee, Jérémy Argenty, Renaud Lesourne, L Aravind & Paul E Love

*Nat. Immunol.*; doi:10.1038/ni.3692; corrected online 7 March 2017

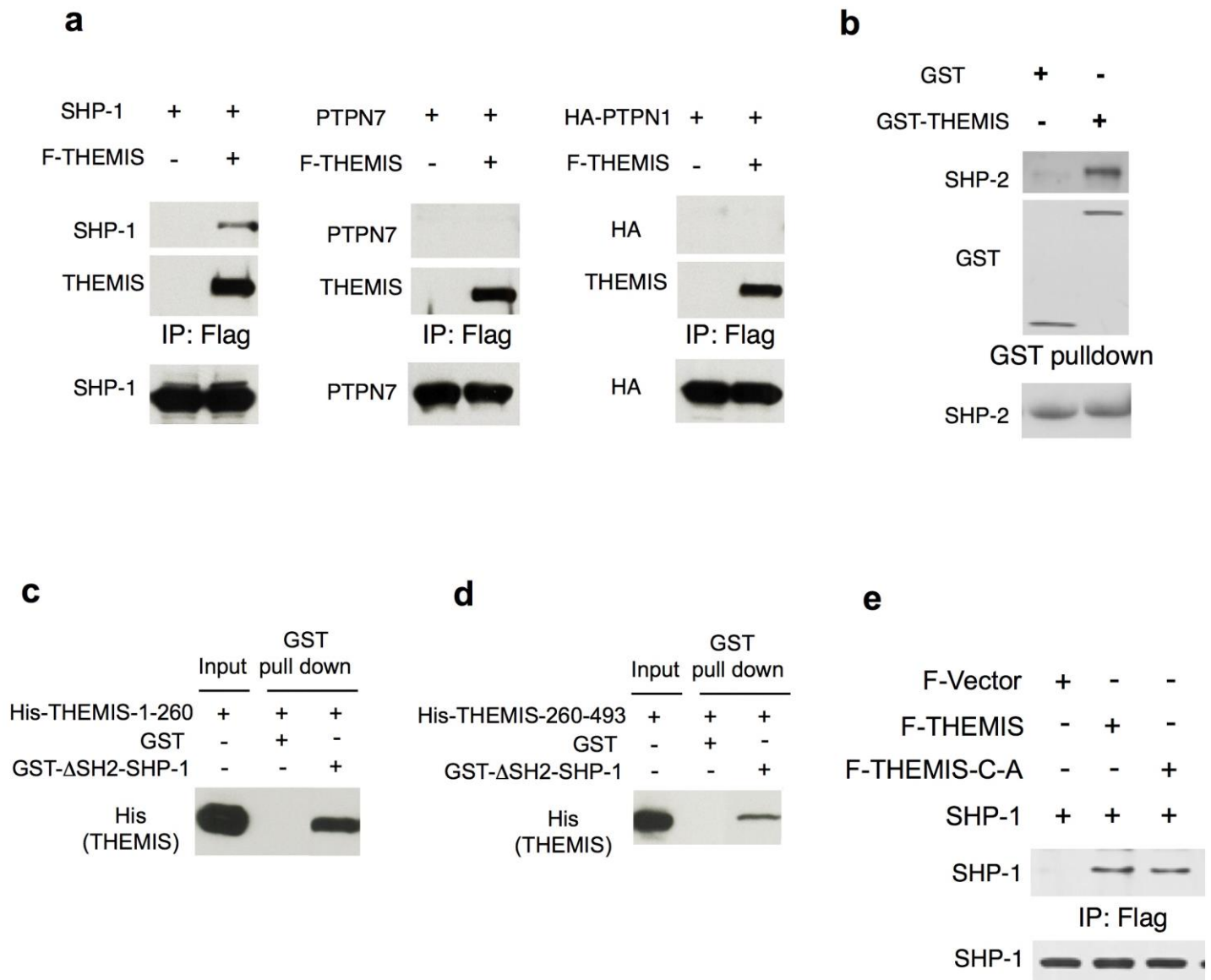
In the version of this article initially published online, in the second sentence of the first paragraph of the third subsection of Results (‘Deletion of *Ptpn6* restores T cell development in *Themis*<sup>-/-</sup> mice’), the TCR chain is identified incorrectly as ‘CD3’; that phrase should read “...antibody to the TCR invariant chain CD3 $\epsilon$  (anti-CD3 $\epsilon$ )...” instead. In the legend to Figure 3, the *P* value ( $< 0.005$ ) was incorrect; the correct value is  $P < 0.05$ . Also, in the final sentence of that legend, the directions ‘(left)’ and ‘(right)’ are incorrect; that should read “Data are representative of (top) or from (bottom) four experiments...” instead. In Figure 4a, the numbers along the horizontal axes are incorrectly vertical; they should be horizontal instead. In Figure 4b, the labels along the vertical axes of the second and fourth plots incorrectly include ‘(%)’; the correct label is ‘CD8SP cells ( $\times 10^6$ )’ only. In the third sentence of the first paragraph of the fifth subsection of Results (‘p-SHP-1 does not correspond with PTP activity’), the word ‘of’ is missing; this should read “The lower abundance of p-SHP-1...” instead. In the legend to Figure 5c, the antibody is incorrectly set off in commas; that should read “...immunoprecipitated with anti-SHP-1 from...” instead. Finally, Figure 7e is too large and should be the same size as all other panels in that figure. The errors have been corrected in the print, PDF and HTML versions of this article.

## Erratum: CCL19-CCR7–dependent reverse transendothelial migration of myeloid cells clears *Chlamydia muridarum* from the arterial intima

Mark Roufaiel, Eric Gracey, Allan Siu, Su-Ning Zhu, Andrew Lau, Hisham Ibrahim, Marwan Althagafi, Kelly Tai, Sharon J Hyduk, Kateryna O Cybulsky, Sherine Ensan, Angela Li, Rickvinder Besla, Henry M Becker, Haiyan Xiao, Sanjiv A Luther, Robert D Inman, Clinton S Robbins, Jenny Jongstra-Bilen & Myron I Cybulsky

*Nat. Immunol.* **11**, 1263–1272 (2016); published online 26 September 2016; corrected after print 20 March 2017

In the version of this article initially published, the label along the horizontal axis of the graph in Figure 1a (‘Dose (mg)’) is incorrect. The correct label is ‘Dose ( $\mu\text{g}$ )’. The error has been corrected in the HTML and PDF versions of the article.

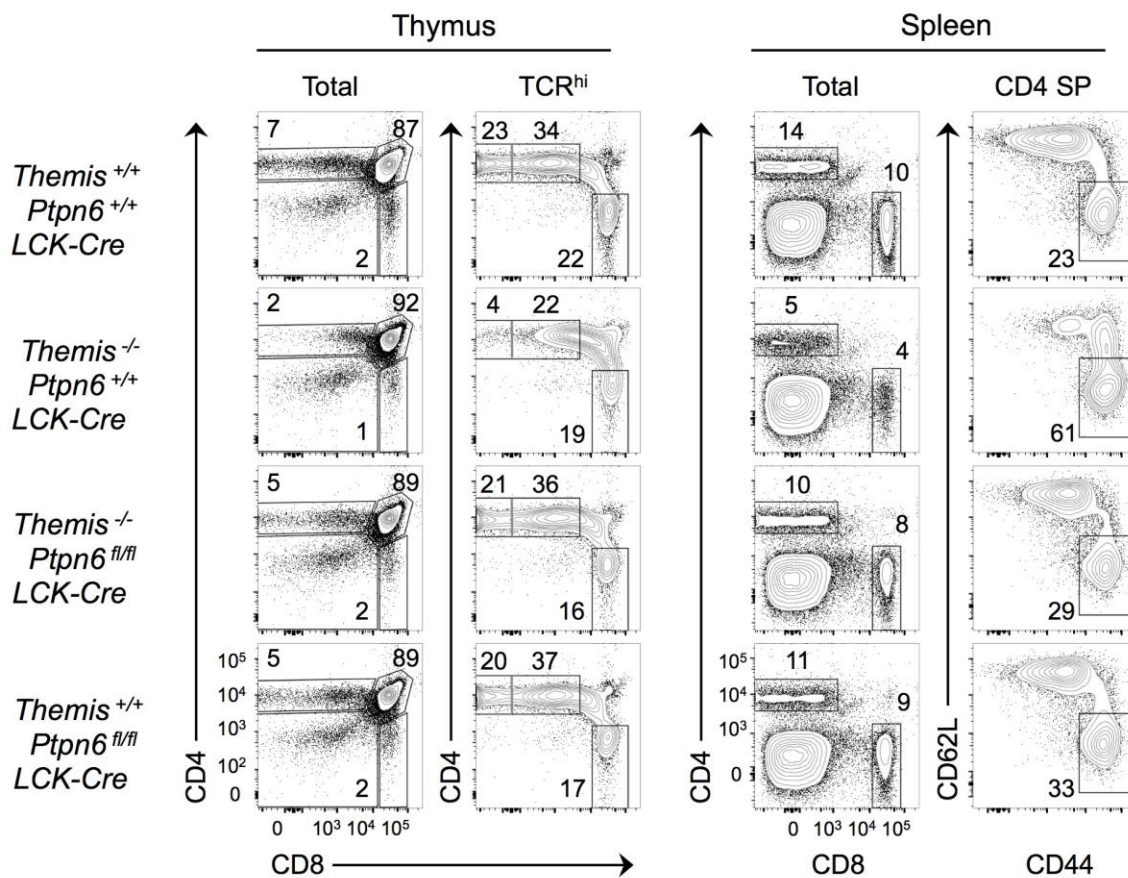


Supplementary Figure 1

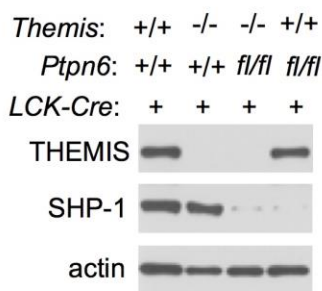
**THEMIS selectively binds to SHP-1 and SHP-2.**

**a**, THEMIS binds to SHP-1 but not PTPN1 or PTPN7. HEK-293 cells were transfected with plasmids encoding Flag-tagged THEMIS plus plasmids encoding SHP-1 (left), PTPN7 (middle) or PTPN1 (right). Cell lysates of transfected cells were analyzed directly by SDS-PAGE and immunoblotting (lower blots) or incubated with anti-Flag and immunoprecipitated proteins were subjected to SDS-PAGE then immunoblotted with the indicated antibodies (upper blots). One representative of two experiments. **b**, THEMIS binds to SHP-2. HEK-293 cells were transfected with plasmids encoding GST or GST-THEMIS. Lower blot is endogenous SHP-2. Upper blots show GST or GST-THEMIS pull downs blotted with anti-SHP-2 or anti-GST. One representative of two experiments. **c,d**, THEMIS CABIT modules bind to the SHP-1 PTP domain. Purified His-tagged CABIT-1 (THEMIS-1-260) or CABIT-2 (THEMIS-260-493) and GST-ΔSH2-SHP-1 proteins were incubated in GST binding buffer then incubated with glutathione beads. Bound proteins were subjected to SDS-PAGE and then blotted with anti-His. **e**, THEMIS-C-A binds SHP-1. CABIT-1 and CABIT-2 core domain cysteine residues were mutated to alanine (C-A). Plasmids encoding THEMIS, THEMIS-C-A and SHP-1 were transfected into HEK-293 cells in the combinations indicated. Flag (THEMIS) immunoprecipitated proteins (upper blot) or cell lysates (lower blot) were blotted for SHP-1. One representative of two experiments.

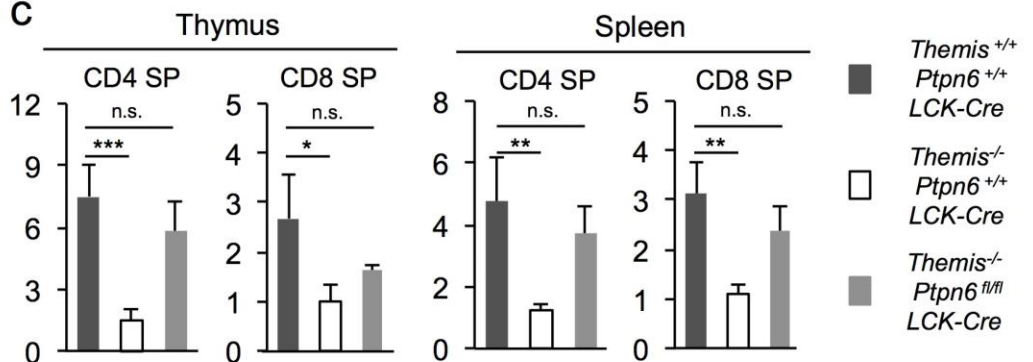
**a**



**b**



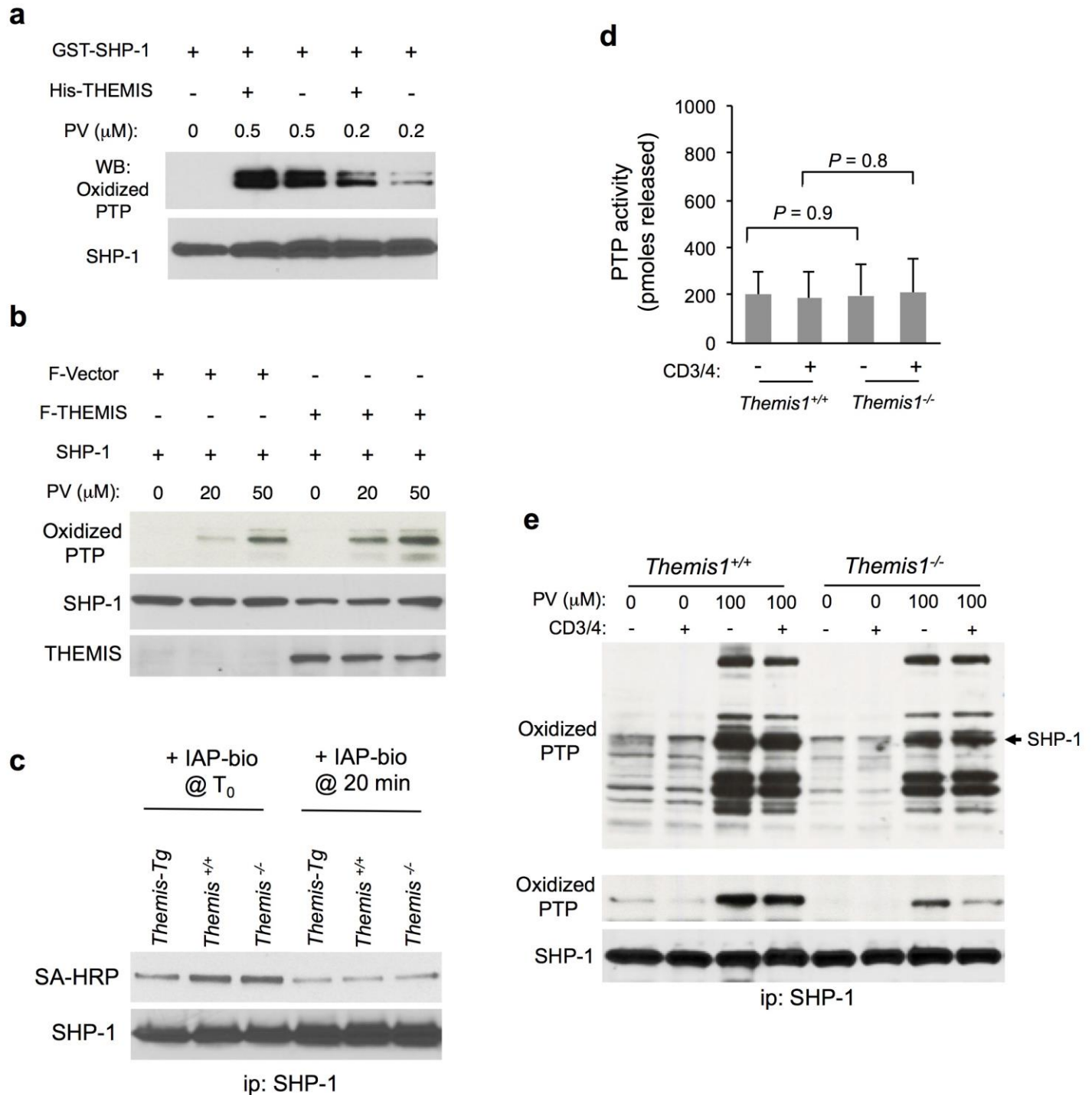
**c**



**Supplementary Figure 2**

**Deletion of *Ptpn6* 'rescues' T cell development in *Themis*<sup>-/-</sup> mice.**

**a**, Flow cytometry analysis of thymocytes (left) or splenocytes (right) from mice of the indicated genotype. Thymus: two parameter plots show CD4 versus CD8 staining of total thymocytes or gated TCR<sup>hi</sup> thymocytes. Spleen: two parameter plots show CD4 versus CD8 staining of total spleen cells or CD62L versus CD44 staining of gated CD4 SP cells. Percentage of cells in the indicated quadrants are shown. **b**, Expression of THEMIS and SHP-1 in total thymocytes from the experiment shown. **c**, CD4 SP and CD8 SP T cell counts (x10<sup>6</sup>) from thymus and spleen of the indicated mice (see a). Data shown are representative of 3 independent experiments. Error bars are SD, t-test 2-tailed, equal variance. \**P*<.05, \*\**P*<.01, \*\*\**P*<.005. n.s., not significant (*P*>.05).



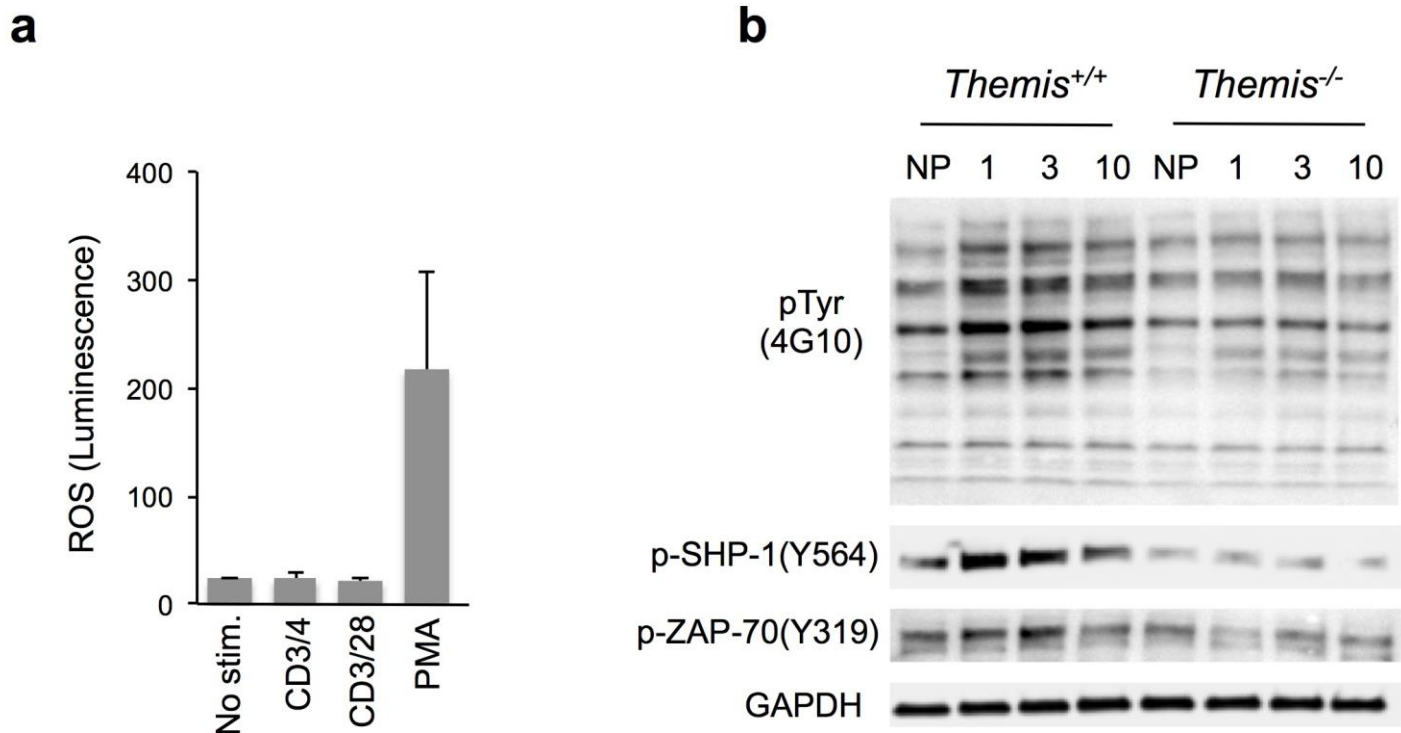
Supplementary Figure 3

**THEMIS promotes or stabilizes active-site oxidation of SHP-1.**

**a**, SHP-1 oxidation by pervanadate (PV) *in vitro*. Repeat of experiment shown in Fig. 5a. **b**, SHP-1 oxidation by PV in transfected HEK293 cells. Repeat of experiment shown in Fig. 5b. **c**, SHP-1 is rapidly oxidized in thymocytes lysed in buffer lacking PTP inhibitors. Lanes 1-3, thymocytes from the indicated mice were lysed on ice in degassed oxidation lysis buffer containing IAP-Bio to immediately label reduced PTP active site cysteines. Lanes 4-6, thymocytes were lysed on ice for 20 min in lysis buffer without PTP inhibitors then

IAP-Bio was added. All lysates were incubated for 1 hr with anti-SHP-1 and immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblotting with Streptavidin (SA)-HRP to detect biotinylated protein. **d**, PTP activity of SHP-1 immunoprecipitated from thymocyte cell lysates. Cells were lysed in degassed PTP lysis buffer without PTP inhibitors for 20 min on ice, anti-SHP-1 was added and lysates were rotated for 1 h at 4°C. Immunoprecipitated SHP-1 was assayed for PTP activity as described in methods. **e**, SHP-1 oxidation *in vivo*. Repeat of experiment shown in Fig. 5d.

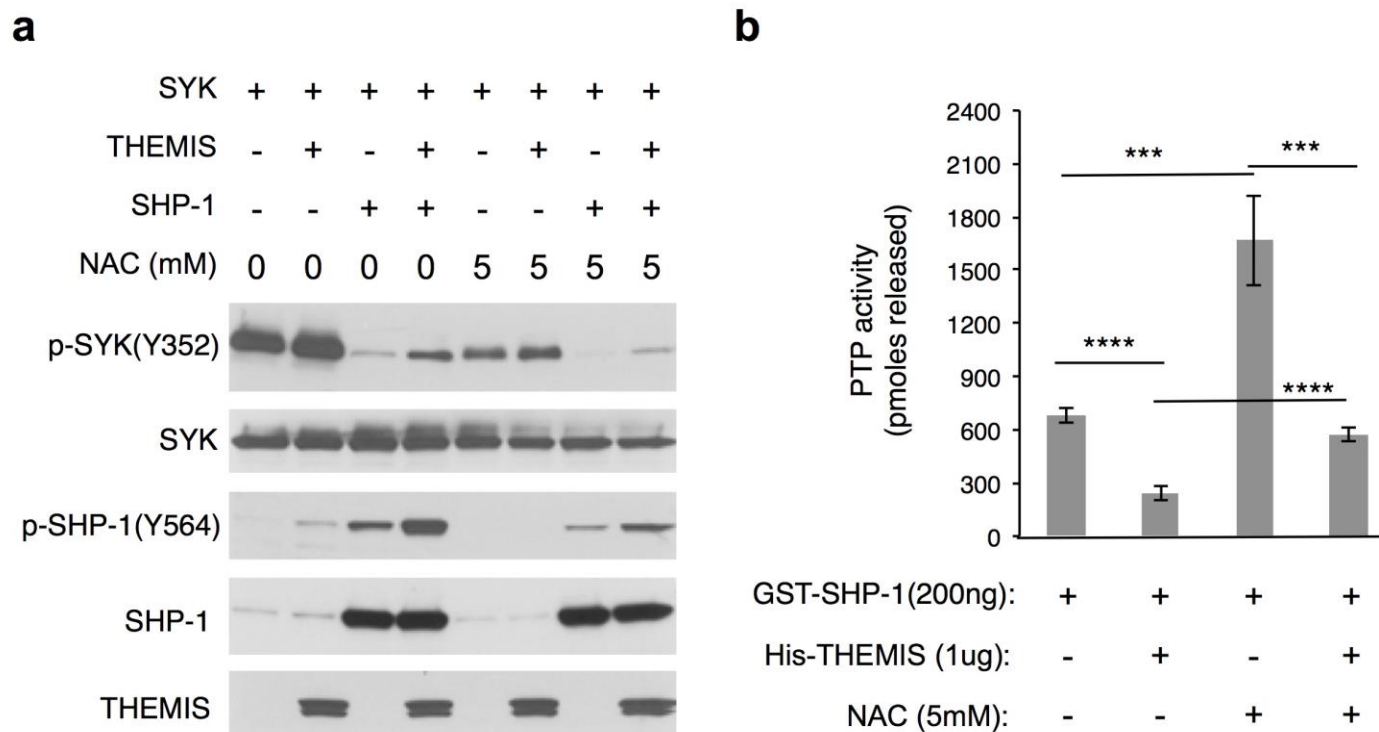




**Supplementary Figure 4**

***Themis*<sup>-/-</sup> signaling defects are revealed in the presence of ROS.**

**a**, TCR stimulation does not induce ROS production in thymocytes. Freshly harvested thymocytes from B6 mice were unstimulated or stimulated for 5 min with anti-CD3+CD4, anti-CD3+CD28 or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), lysed, and Reactive Oxygen Species (ROS) were measured by chemiluminescence assay. Results are from three experiments. **b**, Reduced induction of p-ZAP-70 in peptide stimulated *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes. Purified CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes from MHCII (I-A)<sup>-/-</sup> mice expressing the OTII-TCR were rested for three hours at 5x10<sup>6</sup> cells/ml in RPMI at 37°C prior stimulation. Purified splenic B cells were pulsed for 2h at 37°C with 100ng/ml of OVA peptide (ISQAVHAAHAEINEAGR) or no peptide (NP) in RPMI supplemented with 5% FBS and 10mM HEPES. For stimulation, pulsed B cells and thymocytes were mixed at a ratio of 1/10 and spun at 5000 x g prior incubation at 37°C for the indicated time. Cells were lysed in Standard lysis buffer then subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies. Data shown are representative of 2 independent experiments.



**Supplementary Figure 5**

**Inhibition of SHP-1 by THEMIS is attenuated by the ROS scavenger *N*-acetyl-L-cysteine (NAC).**

**a**, THEMIS-mediated inhibition of SHP-1 is attenuated by NAC in transfected HEK-293 cells. HEK-293 cells were transfected with plasmid encoding the protein tyrosine kinase SYK, a target of SHP-1, plus or minus plasmids encoding SHP-1 and THEMIS. Transfected cells were treated or not overnight with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) before lysis, SDS-PAGE and western blotting with the indicated antibodies. One representative of 2 experiments. **b**, THEMIS-mediated inhibition of SHP-1 *in vitro* is partially attenuated in the presence of NAC. SHP-1 was assayed for PTP activity in the presence or absence of THEMIS and NAC as indicated. PTP assay was performed as is described in Methods. Bar graphs show means  $\pm$  SD, t-test, two-tailed, equal variance.  $n=3$  each. \*\*\* $P<.005$ , \*\*\*\* $P<.001$ .



**Annexe 3 : Garreau A, Blaize G, Argenty J, Rouquié N, Tourdès A, Wood SA, Saoudi A, Lesourne R. 2017. Grb2-Mediated Recruitment of USP9X to LAT Enhances Themis Stability following Thymic Selection. J Immunol 199:2758-2766.**

Pour cette annexe, j'ai contribué à la révision de l'article. Brièvement, j'ai stimulé des thymocytes issus de souris déficientes en USP9X ou en THEMIS1 avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD4 pendant 1 ou 3 minutes. J'ai analysé par westernblot, la phosphorylation de SHP-1 et ZAP-70. Il s'agit de la figure 3F de l'article. D'autres expériences consistant à analyser la signalisation suite au traitement des thymocytes avec l'inhibiteur de déubiquitine enzyme PR619 ont aussi été réalisées mais n'ont pas été présentées dans l'article.



# Grb2-Mediated Recruitment of USP9X to LAT Enhances Themis Stability following Thymic Selection

Anne Garreau,\* Gaëtan Blaize,\*<sup>1</sup> Jérémy Argenty,\*<sup>1</sup> Nelly Rouquié,\* Audrey Tourdès,\* Stephen A. Wood,<sup>†</sup> Abdelhadi Saoudi,\* and Renaud Lesourne\*

**Themis is a new component of the TCR signaling machinery that plays a critical role during T cell development. The positive selection of immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive thymocytes and their commitment to the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> single-positive stage are impaired in *Themis*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that Themis might be important to sustain TCR signals during these key developmental processes. However, the analysis of Themis mRNA levels revealed that *Themis* gene expression is rapidly extinguished during positive selection. We show in this article that Themis protein expression is increased in double-positive thymocytes undergoing positive selection and is sustained in immature single-positive thymocytes, despite the strong decrease in Themis mRNA levels in these subsets. We found that Themis stability is controlled by the ubiquitin-specific protease USP9X, which removes ubiquitin K48-linked chains on Themis following TCR engagement. Biochemical analyses indicate that USP9X binds directly to the N-terminal CABIT domain of Themis and indirectly to the adaptor protein Grb2, with the latter interaction enabling recruitment of Themis/USP9X complexes to LAT, thereby sustaining Themis expression following positive selection. Together, these data suggest that TCR-mediated signals enhance Themis stability upon T cell development and identify USP9X as a key regulator of Themis protein turnover. *The Journal of Immunology*, 2017, 199: 2758–2766.**

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

The fate of thymocytes during these processes is dependent upon signals transmitted by the TCR and by coreceptors, such as CD4 and CD8, that bind together with the TCR to self-pMHCs. The strength of the TCR–self-pMHC interaction and the differential

kinetics of CD4 and CD8 surface expression during the transition from the DP stage to the SP stage govern the intensity and the duration of TCR signals, which, in turn, dictate distinct developmental outcomes (3). Although positive selection and CD4 lineage commitment are promoted by sustained or repeated TCR signaling waves (4–8), negative selection and CD8 lineage commitment are preferentially induced by short-lived or interrupted TCR signaling events, respectively (5, 8–10).

Signals triggered by TCRs and coreceptors propagate through a complex network of intracellular signaling proteins that exhibit enhancing or inhibitory functions. TCR engagement by pMHC leads to activation of the protein tyrosine kinases Lck and ZAP70, which phosphorylate the transmembrane adaptor protein LAT on multiple tyrosine residues (11). Phosphorylated LAT proteins serve as docking sites for cytosolic adaptors (e.g., Grb2, GADS, and SLP76) that enable the recruitment of effectors proteins, such as PLCγ1, Vav1, and Itk, which, in turn, trigger distinct signaling pathways important for the regulation of T cell development (12). Inhibitory proteins, such as the protein tyrosine phosphatase SHP-1, function to attenuate or interrupt TCR-mediated signals, according to the strength of the TCR–pMHC interactions (13–15).

Themis is a recently identified TCR signaling protein that has an important role during T cell development (16–18). It contains a proline-rich C-terminal sequence (PRS), which binds to the adaptor protein Grb2 (19, 20), and two globular cysteine-containing, all-β in Themis (CABIT) domains (17). Themis is recruited to LAT through Grb2 following TCR engagement (21). Although the molecular function of Themis has long remained elusive, it was shown recently that Themis enhances TCR signaling in thymocytes by blocking the inhibitory activity of SHP-1 (22). This action is mediated by the CABIT domains of Themis, which bind to the phosphatase domain of SHP-1 and promote or stabilize oxidation of the SHP-1 catalytic cysteine (22).

The phenotype of *Themis*<sup>-/-</sup> mice shows that Themis is essential for the positive selection of DP thymocytes (16–18) and for their commitment to the CD4 lineage (18), suggesting that Themis

\*Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Université de Toulouse, CNRS, INSERM, UPS, 31024 Toulouse, France; and <sup>†</sup>Griffith Institute for Drug Discovery, Griffith University, Brisbane, Queensland 4111, Australia

<sup>1</sup>G.B. and J.A. contributed equally to this work.

ORCID: 0000-0003-4494-9704 (G.B.); 0000-0001-9133-330X (A.T.); 0000-0002-2576-7457 (S.A.W.); 0000-0001-7015-8178 (A.S.).

Received for publication April 20, 2017. Accepted for publication August 10, 2017.

This work was supported by INSERM and Sanofi (Avenir grant to R.L.), the Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques, a Marie Curie International Reintegration grant (to R.L.), the French Ministry of Higher Education and Research (Ph.D. fellowships to A.G. and G.B.), and the Fondation pour la Recherche Médicale (extension of the Ph.D. fellowship that had been awarded to A.G.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Renaud Lesourne, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, CHU Purpan, 31024 Toulouse Cedex 3, France. E-mail address: renaud.lesourne@inserm.fr

Abbreviations used in this article: CABIT, cysteine-containing, all-β in Themis; DN, double-negative; DP, double-positive; DUB, deubiquitylating enzyme; HA, hemagglutinin; β2m, β2-microglobulin; PRS, proline-rich C-terminal sequence; self-pMHC, self-peptide bound to the MHC; SP, single-positive; USP, ubiquitin-specific protease; *Usp9X*<sup>+/+</sup>, *Usp9X*<sup>lox/lox</sup>, *Usp9X*<sup>-/-</sup>, *Usp9X*<sup>lox/lox</sup>; *Cd4-Cre*.

Copyright © 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/17/\$35.00

might be important to perpetuate and sustain TCR signals during these steps of T cell development. However, previous studies reported that the transcription of the gene encoding for Themis is strongly downregulated in DP cells at the early stages of positive selection (16, 17). We show in this article that, despite the strong downregulation of Themis mRNA, the amount of Themis protein increases following positive selection. We found that Themis stability is controlled by the ubiquitin-specific protease USP9X, which removes K48-linked ubiquitin chains on Themis following TCR engagement. Biochemical analyses reveal that USP9X binds directly to the N-terminal CABIT domain of Themis. Using Grb2-deficient thymocytes, we show that Grb2 promotes the recruitment of Themis/USP9X to LAT, which stabilizes Themis expression during T cell development.

## Materials and Methods

### Mice

C57BL/6 mice are from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). *Themis*<sup>-/-</sup> (18), *Grb2*<sup>+/-</sup> (23), and *Usp9X*<sup>lox/lox</sup> (24) mice were described previously. AND TCR-transgenic mice were from Taconic Farms. OT-1 and OT-2 TCR-transgenic mice were provided by Prof. R. Liblau (INSERM UMR 1043, Toulouse, France), and CD4-Cre mice were provided by Dr. O. Joffre (INSERM UMR 1043). All of the experiments were conducted with sex- and age-matched mice between 6 and 10 wk old that were housed under specific pathogen-free conditions at the INSERM animal facility (Zoo-technie US-006; accreditation number A-31 55508), which is accredited by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice. All experimental protocols were approved by the local ethics committee and are in compliance with the French and European regulations on the care and protection of laboratory animals (European Commission Directive 2010/63).

### Abs and flow cytometry

The following Abs and reagents were used in this study: anti-Vav1 (C-14), anti-c-Cbl (A9), anti-GAPDH (FL-335), anti-ERDj3 (C-7), and anti-GFP (B-2) (all from Santa Cruz Biotechnology); anti-V5 and anti-USP9X (Bethyl Laboratories); anti-p-SHP1 (Y564), anti-p-ZAP (Y319), anti-ubiquitin (P4D1), anti-K48 (D9D5), and anti-K63 (D7A11) polyubiquitin (all from Cell Signaling Technology); anti-hemagglutinin (HA) and anti-FLAG (M2) (Sigma-Aldrich); and anti-Themis (Q13-1103), anti-Grb2, anti-protein tyrosine phosphatase 1C/SHP-1, and anti-LAT Y226 (all from BD Biosciences). Anti-Themis (3A3) Ab was provided by Dr. P.E. Love (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Anti-FLAG M2 and anti-V5 Agarose Affinity Gel were from Sigma-Aldrich. Thymocytes were incubated for the indicated period of times with MG132 (20 μM) or with PR-619 (10 μM) (Sigma-Aldrich). Fluorochrome-conjugated Abs against CD4 and CD69 were from BioLegend, and those against CD8α, CD5, TCRβ, and Themis were from eBioscience. Biotin-conjugated Abs against CD3ε (145-2C11) and CD4 (GK1.5) were purchased from BD Biosciences. For flow cytometry analysis, single-cell suspensions from thymus, spleen, or lymph nodes were incubated in PBS, 0.5% BSA, and 2 mM EDTA containing the appropriate Abs. Intracellular staining was performed by fixing cells with 4% formaldehyde and permeabilizing them with 0.5% Triton X-100. Cell detection was performed on a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences), after analysis was performed with FlowJo software (TreeStar).

### Real-time PCR analysis

For the purification of thymocyte subpopulations, total thymocytes were labeled with the appropriate Abs. Each population was isolated with a BD FACSAria cell sorter. For gene-expression studies, total cell RNA was isolated with an RNeasy Kit (QIAGEN). RNA samples (500 ng of each) were reverse transcribed with SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and were assayed by real-time PCR. Transcripts were quantified with a Roche LightCycler 480 System. Duplicates were run for each sample in a 96-well plate; β2-microglobulin (β2m) served as the endogenous reference gene. The relative quantification method was used, with the mRNA abundance of the gene of interest normalized to the abundance of β2m mRNA; the average of control thymocyte samples served as the calibrator value. Themis primers were exon-3 forward 5'-TGAAATC-CAAGGTGTGCTGA-3', exon-4 reverse 5'-CGTCCGTAGACAGCAAC-TGA-3', β2m forward 5'-ACATACGCCTGCAGAGTTAAGCAT-3', and β2m reverse 5'-CGATCCCAGTAGACGGTCTTG-3'.

### Plasmids and constructs

Plasmids encoding for FLAG-ThemisWt, FLAG-ThemisΔPRS, GFP-Themis, and V5-USP9X were described previously (20, 25). HA-Ubiquitin, HA-UbiquitinK48R, and FLAG-USP19 were purchased from Addgene. Plasmids encoding for FLAG-ThemisΔCABIT1(1–243), FLAG-ThemisΔCABIT2(267–494), HA-UbiquitinK63R, HA-UbiquitinK33R, and HA-UbiquitinK29R were generated by site-directed mutagenesis using a QuikChange kit (Stratagene).

### Cell stimulation and immunoprecipitation

For the analysis of Themis ubiquitylation,  $6 \times 10^7$  thymocytes or  $5 \times 10^6$  Jurkat cells were stimulated or not with anti-CD3ε, anti-CD4, and streptavidin (30 μg/ml) at 37°C. Stimulation was stopped on ice, and cells were immediately centrifuged and resuspended in 140 μl of ice-cold lysis buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM NaF, 1 mM EDTA, 1% SDS, 10 mM iodoacetamide, 10 mM *N*-ethylmaleimide, and Protease Inhibitor Cocktail Tablet [Roche]). Lysates were boiled at 95°C for 10 min and sonicated two times for 5 s (30% duty cycle). Lysates were diluted in 1.4 ml of ice-cold lysis buffer without SDS and cleared by centrifugation at 12,000 rpm for 15 min at 4°C. Themis was immunoprecipitated from cleared lysate for 2 h at 4°C with 15 μl of protein A-Sepharose resin coated with 10 μl of serum containing polyclonal rabbit anti-Themis Abs. Resins were washed and incubated on a shaker for 15 min with elution buffer (100 μg/ml Themis antigenic peptides, 50 mM Tris, and 150 mM NaCl). Samples were further processed for Western blot analysis. For any other immunoprecipitation, thymocytes or Jurkat cells were resuspended in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM NaF, 10% glycerol, and Protease Inhibitor Cocktail Tablet [Roche]) for 20 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 12,000 rpm for 15 min at 4°C, and proteins were immunoprecipitated from cleared lysate with 15 μl of Sepharose resin coated with the indicated Abs for 2 h at 4°C.

### Cell lines and transfections

Jurkat-TAG cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich). Human embryonic kidney epithelial cells (HEK293) were maintained in DMEM and 10% FBS. For transfection, 10<sup>7</sup> Jurkat-TAG cells were washed three times with RPMI 1640 medium without FBS and resuspended in 100 μl of Ingenio electroporation solution (Euro-medex) containing 20 μg of the indicated plasmids. Cells were electroporated with the Nucleofector II Device (H10 program). For lipofection, HEK293 cells were incubated for 6 h with 500 μl of DMEM containing 5 μg of the indicated plasmids and 15 μl of Lipofectamine 2000 (Tebu-bio).

### Pull-down assays

Ten micrograms of purified human USP9X (E-552; Boston Biochem) and 10 μg of purified mouse Themis were incubated for 45 min in buffer containing 150 mM NaCl and 10 mM Tris (pH 7.4). The solution was adjusted with 0.2% Triton X-100, and USP9X was immunoprecipitated for 3 h at 4°C with 15 μl of protein A-Sepharose resin coated with anti-USP9X Abs. Samples were further processed for Western blot analysis.

### Western blot

Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was blocked with 20% FCS for the analysis of Themis ubiquitylation and 5% milk for coimmunoprecipitation analysis in TBST for 1 h at room temperature prior to incubation with primary Abs at 4°C overnight. After washing, membranes were incubated with secondary Abs for 1 h at room temperature. Subsequently, membranes were incubated with ECL solution for 5 min in the dark, and luminescence was captured using a Bio-Rad XRS+ imager. Images were analyzed using Bio-Rad Image Lab software.

### Statistical analysis

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

## Results

### Posttranslational control of Themis expression during positive selection

We first compared the protein and mRNA levels of Themis in DP thymocytes, before selection ("preselection," TCR<sup>lo</sup>CD69<sup>lo</sup>CD5<sup>lo</sup>)

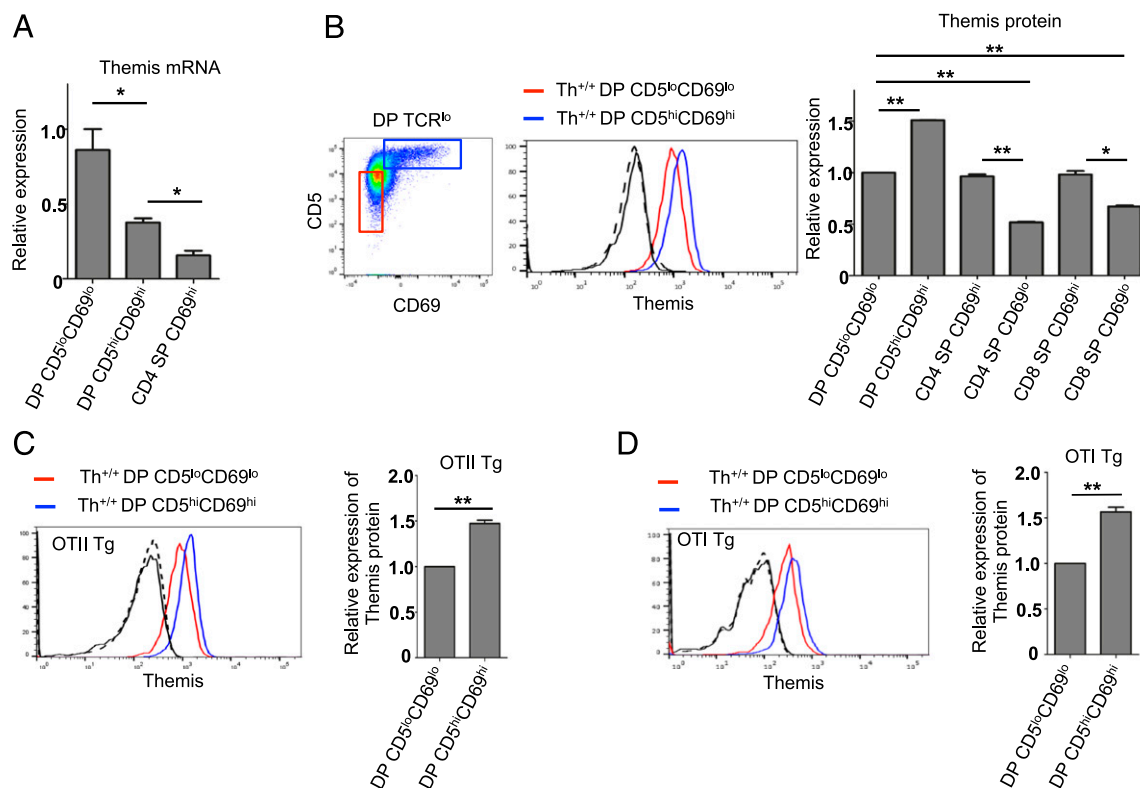
or soon after they were stimulated by self-pMHC ligand (TCR<sup>lo</sup> CD69<sup>hi</sup>CD5<sup>hi</sup>). In accordance with previous studies (16, 17), we found that Themis mRNA levels are strongly decreased in TCR<sup>lo</sup> CD69<sup>hi</sup>CD5<sup>hi</sup> DP thymocytes compared with those in preselection DP thymocytes (Fig. 1A). Unexpectedly, we found that the amount of Themis protein is increased in DP thymocytes undergoing positive selection, indicating a posttranslational regulation of Themis expression (Fig. 1B). The amount of Themis protein was similarly increased in TCR<sup>lo</sup>CD69<sup>hi</sup>CD5<sup>hi</sup> DP thymocytes expressing class I (OT-1) or class II (OT-2) restricted TCRs, suggesting that the increased amount of Themis observed in these cells does not result from a shift in the TCR repertoire and is not specific to thymocytes positively selected by MHC class I or MHC class II self-pMHC interactions (Fig. 1C, 1D). Further analyses at later stages of T cell development show that Themis mRNA levels are decreased by ~80% in CD69<sup>hi</sup> CD4 SP thymocytes compared with those in preselection DP thymocytes, whereas the amounts of Themis protein are similar in these two populations (Fig. 1B). Finally, Themis protein levels are decreased in mature CD69<sup>lo</sup> CD4 and CD8 SP thymocytes compared with preselection DP thymocytes, confirming the previously reported decrease in Themis protein expression in these mature thymocyte subsets (Fig. 1B).

#### Ubiquitin-specific proteases regulate Themis expression in thymocytes

The discrepancy between Themis mRNA and protein levels during the positive selection of DP thymocytes suggests that posttranslational events might be important to stabilize Themis expression

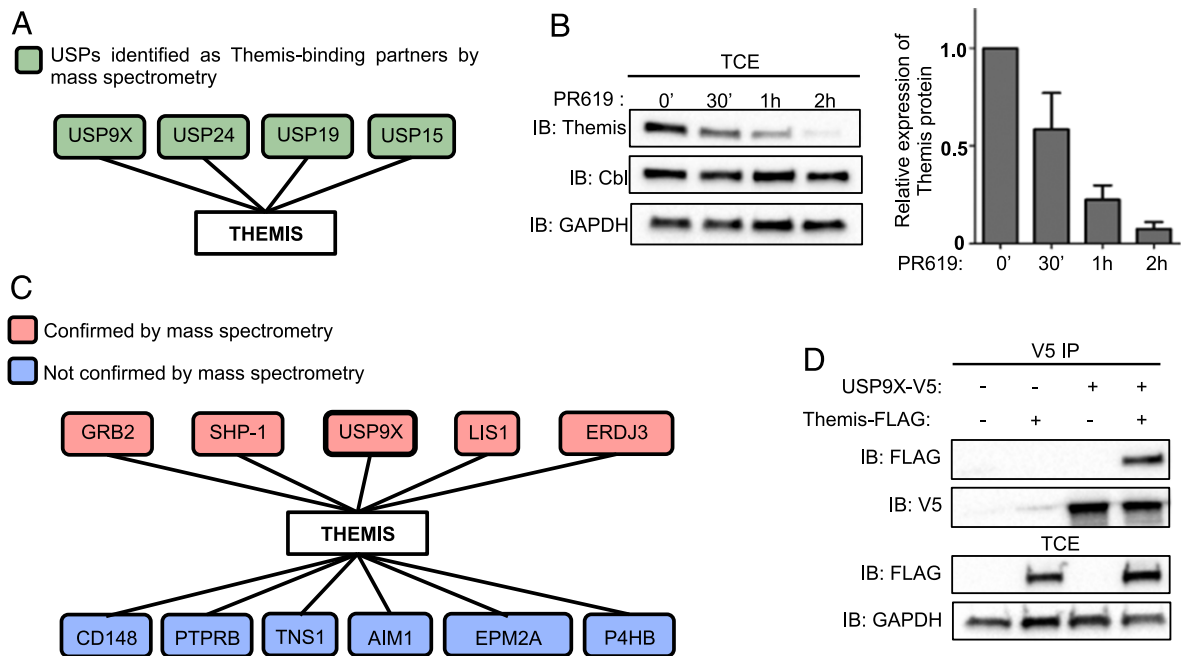
at this stage of T cell development. Ubiquitin-specific proteases (USPs) remove mono- or polyubiquitin chains on proteins and, thus, enhance their stability by preventing them from degradation by the proteasome (26). Previously, mass spectrometry analysis of proteins that coimmunoprecipitate with Themis in thymocytes led us to identify several USPs (USP9X, USP24, USP19, and USP15) (Fig. 2A), among other proteins, as potential binding partners of Themis in these cells (27). To investigate the potential role of these interactions on Themis expression, we incubated thymocytes with PR619, a well-characterized inhibitor that blocks the activity of most deubiquitylating enzymes (DUBs) (28). We found that incubation of thymocytes with PR619 results in a rapid and dramatic decrease in the amount of Themis protein, whereas the amount of other signaling proteins, such as c-Cbl, was not affected, indicating that Themis expression is highly sensitive to DUB-mediated stabilization (Fig. 2B). We identified USP9X, but not the other USPs, as a binding partner of Themis in a yeast two-hybrid screen using a cDNA bank of murine splenocytes (Fig. 2C). Transfection of HEK293T cells with cDNA encoding tagged versions of Themis and USP9X confirmed the binding of USP9X to Themis (Fig. 2D).

To investigate whether USP9X controls the stability of Themis, we analyzed Themis protein levels in thymocytes from *Usp9X<sup>fllox/fllox</sup>* mice expressing the *Cd4-Cre* transgene, which begins to be expressed in DP thymocytes (29). We found that the amount of Themis was similar in *Usp9X<sup>fllox/fllox</sup> (Usp9X<sup>+/+</sup>)* and *Usp9X<sup>fllox/fllox</sup>; Cd4-Cre (Usp9X<sup>-/-</sup>)* CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative (DN) thymocytes but was decreased in *Usp9X<sup>-/-</sup>* DP thymocytes (Fig. 3A, 3B).



**FIGURE 1.** Posttranslational control of Themis expression during positive selection. **(A)** Real-time PCR analysis of Themis mRNA abundance in preselection DP (TCR<sup>lo</sup>CD69<sup>lo</sup>CD5<sup>lo</sup>), “self-pMHC stimulated” DP (TCR<sup>lo</sup>CD69<sup>hi</sup>CD5<sup>hi</sup>), and CD4 SP CD69<sup>hi</sup> thymocytes. **(B)** Contour plot represents the gating strategy to analyze Themis expression in preselection (red rectangle) and self-pMHC-stimulated (blue rectangle) DP thymocytes (left panel). Line graph represents Themis staining in the indicated DP thymocyte subsets from *Themis<sup>+/+</sup>* and *Themis<sup>-/-</sup>* mice (black and dashed lines) (middle panel). Bar graph represents the relative expression of Themis protein in the indicated thymocyte subsets normalized to its expression level in preselection DP thymocytes (right panel). Themis staining in the indicated DP thymocyte subsets from OT-2 TCR-transgenic **(C)** and OT-1 TCR-transgenic **(D)** mice (black and dashed lines represent the isotype control). Bar graphs represent the relative expression of Themis protein in the indicated DP thymocyte subsets. Data are mean + SEM of three (A and B) or four (C and D) independent experiments. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, two-tailed, paired *t* test.





**FIGURE 2.** Themis expression is controlled by ubiquitin-specific proteases. **(A)** USPs identified as Themis-binding partners by mass spectrometry in Zvezdova et al. (27). **(B)** Western blot analysis of Themis, Cbl, and GAPDH in thymocytes incubated with PR619 (10  $\mu$ M) for the indicated times. Total cytoplasmic extracts (TCE) from each sample were analyzed by Western blot with the indicated Abs. Bar graph shows the relative abundance of Themis proteins after PR619 treatment at the indicated times, as determined by calculating the ratios of the intensities of the bands corresponding to Themis proteins/GAPDH (loading control). **(C)** Schematic diagram of Themis-binding partners identified by a yeast two-hybrid screen. Proteins shaded in red were also identified as Themis interactors by mass spectrometry in thymocytes (27). **(D)** HEK293 cells were transfected with plasmids encoding FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding V5-tagged USP9X. Samples were subjected to immunoprecipitation (IP) with Abs specific for V5 and analyzed by Western blotting with Abs specific to the indicated epitope. Western blots are from one experiment and are representative of three (B) and four (D) independent experiments.

Themis protein levels were further decreased in positively selected *Usp9X*<sup>-/-</sup> CD4 and CD8 SP thymocytes and in peripheral CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 3A–C). However, the amount of Themis remained higher in *Usp9X*<sup>-/-</sup> SP thymocytes than in thymocytes treated with PR619 (Fig. 2B), indicating that USPs other than USP9X contribute to regulate Themis expression. Quantification of *Themis* mRNA amounts by real-time PCR showed similar expression levels in *Usp9X*<sup>+/+</sup> and *Usp9X*<sup>-/-</sup> DP and CD4 SP thymocytes, showing that the decreased protein abundance of Themis in *Usp9X*<sup>-/-</sup> thymocytes does not result from a transcriptional defect (Fig. 3D). The adaptor protein Grb2 and the tyrosine phosphatase SHP-1, which are known binding partners of Themis, were expressed normally in *Usp9X*<sup>-/-</sup> CD4 SP thymocytes, indicating a selective effect of USP9X on Themis (Fig. 3E).

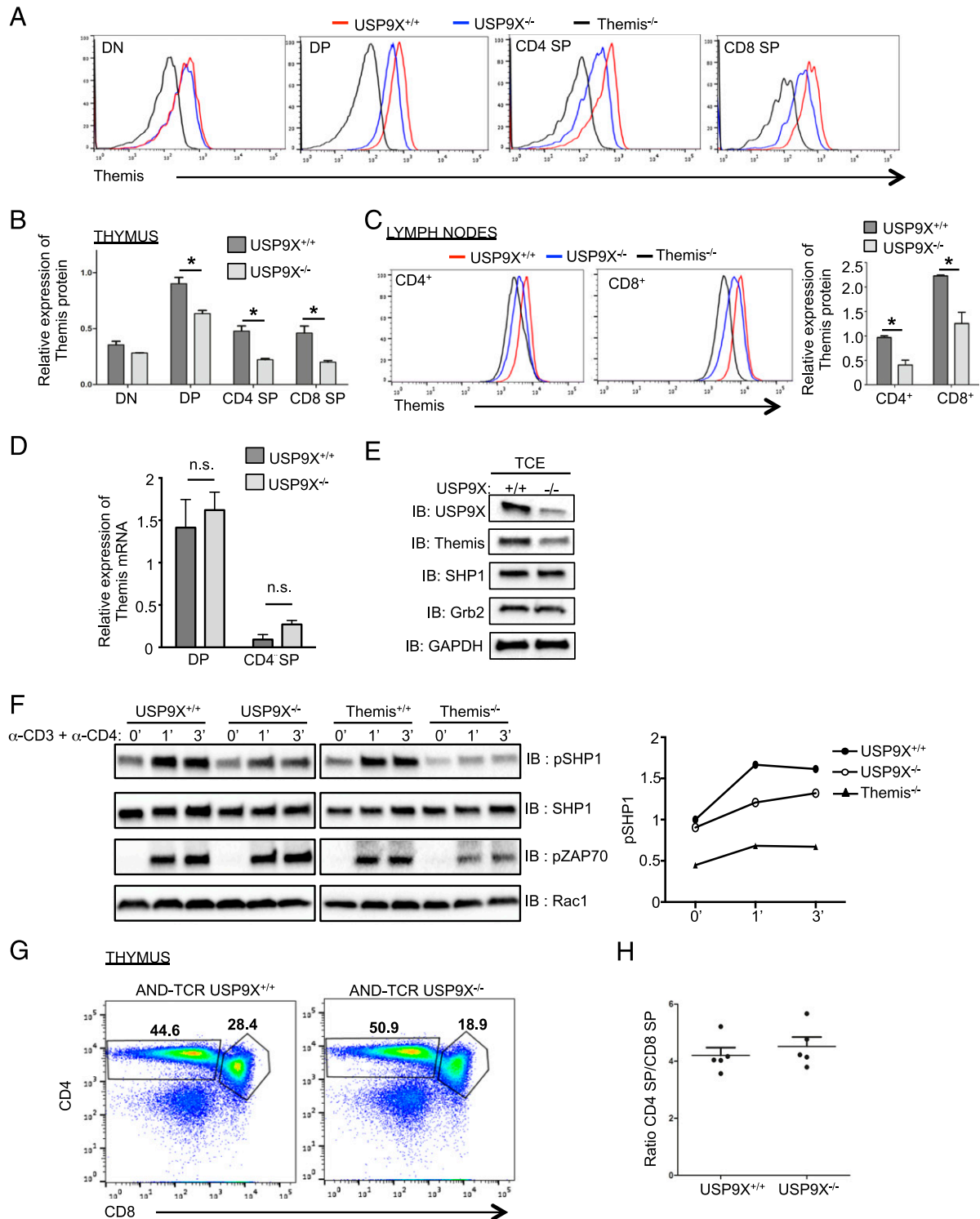
To examine whether the reduced expression of Themis in *Usp9X*<sup>-/-</sup> thymocytes has a functional effect on Themis-mediated signaling, we compared the phosphorylation of SHP-1 and ZAP70, which are known to be impaired in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes, in *Usp9X*<sup>+/+</sup> and *Usp9X*<sup>-/-</sup> CD4 SP thymocytes. We found that SHP-1 phosphorylation was decreased in *Usp9X*<sup>-/-</sup> CD4 SP thymocytes compared with that in *Usp9X*<sup>+/+</sup> control cells (Fig. 3F). The phosphorylation of SHP-1 was more strongly impaired in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes than in *Usp9X*<sup>-/-</sup> thymocytes, in accordance with the partial decrease in Themis expression levels observed in *Usp9X*<sup>-/-</sup> thymocytes (Fig. 3F). Although the phosphorylation of ZAP70 was reduced in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes compared with that in control cells, it was not affected in *Usp9X*<sup>-/-</sup> thymocytes, suggesting that the inhibition of SHP-1 by Themis remains sufficient in *Usp9X*<sup>-/-</sup> thymocytes to promote the activity of potential targets of SHP-1, such as ZAP70 (Fig. 3F). To determine the impact of USP9X deficiency on positive selection, we next crossed *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice with transgenic mice expressing a fixed MHC class II-restricted  $\alpha\beta$ -TCR transgene (AND). We

found similar proportions of CD4 SP thymocytes in AND *Usp9X*<sup>+/+</sup> and *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice, indicating that the reduced expression level of Themis in *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice is not sufficient to significantly impair positive selection (Fig. 3G). CD4 SP/CD8 SP ratios in thymocytes in *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice were also comparable to those in *Usp9X*<sup>+/+</sup> mice, suggesting that the choice for CD4 or CD8 lineage was also normal in *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3H).

#### *USP9X promotes Themis deubiquitylation following TCR engagement*

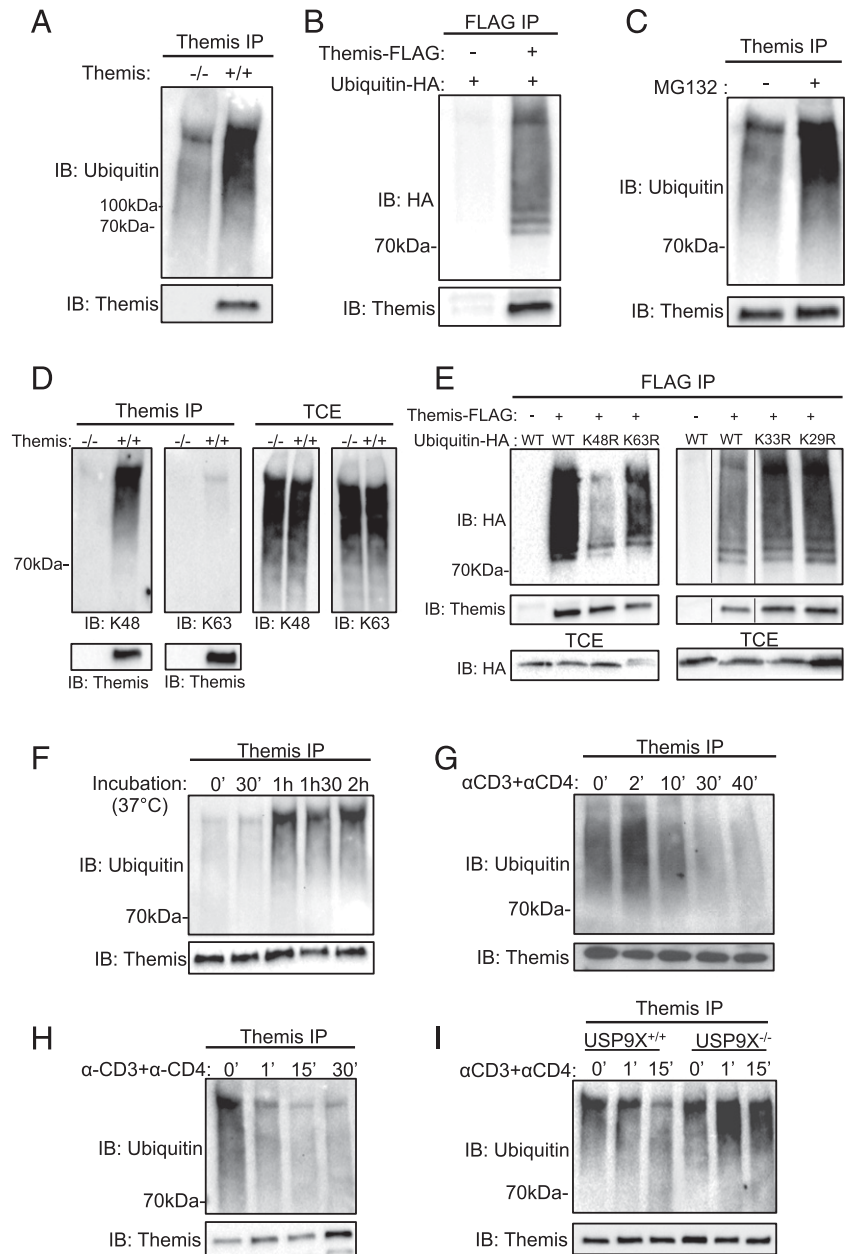
We next investigated whether Themis is directly regulated by ubiquitin-mediated modifications. Analysis of Themis in unstimulated thymocytes and in Jurkat cells transfected with cDNA encoding for tagged versions of Themis and ubiquitin showed that Themis is polyubiquitylated (Fig. 4A, 4B). Incubation of thymocytes with the proteasome inhibitor MG132 resulted in an increase in ubiquitylated Themis, supporting that Themis is targeted to the proteasome through ubiquitin chain modifications (Fig. 4C). We next investigated the type of linkage by which Themis-ubiquitin chains are assembled. We found that ubiquitylated Themis was recognized by ubiquitin K48 chain-specific Abs, but not by Abs specific for ubiquitin K63 chains, in freshly isolated thymocytes (Fig. 4D). Confirming these results, we found that Themis ubiquitylation was strongly reduced in Jurkat cells expressing tagged versions of ubiquitin mutated on its K48 residue (K48R), whereas it was only moderately affected in Jurkat cells expressing K63R, K29R, and K33R ubiquitin mutants (Fig. 4E).

We noticed that Themis ubiquitylation was increased when thymocytes were rested for 1 h in culture medium, suggesting that stimuli occurring in the thymic environment might dampen or prevent Themis ubiquitylation (Fig. 4F). Thus, we examined the effect of TCR cross-linking on Themis ubiquitylation and found that the amount of ubiquitylated Themis decreases following the



**FIGURE 3.** Themis expression is controlled by USP9X. **(A and B)** Flow cytometry analysis of Themis protein abundance in DN, DP, CD4 SP, and CD8 SP thymocyte subsets from *Usp9X*<sup>+/+</sup>, *Usp9X*<sup>-/-</sup>, and *Themis*<sup>-/-</sup> mice. **(B)** Relative expression of Themis protein in the indicated subsets from *Usp9X*<sup>+/+</sup> and *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice. **(C)** Line graphs represent Themis staining in lymph node CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from *Usp9X*<sup>+/+</sup>, *Usp9X*<sup>-/-</sup>, and *Themis*<sup>-/-</sup> mice (left panel). Bar graph represents the relative expression of Themis protein in the T cell subsets (right panel). Data are mean + SEM of two independent experiments. **(D)** Real-time PCR analysis of Themis mRNA abundance in DP and CD4 SP thymocytes from *Usp9X*<sup>+/+</sup> and *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice. **(E)** Western blot analysis of USP9X, Themis, SHP-1, Grb2, and GAPDH in total thymocytes from *Usp9X*<sup>+/+</sup> and *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice. **(F)** Western blot analysis of SHP-1 (Y564) and ZAP70 (Y319) phosphorylation in total thymocytes from *Usp9X*<sup>+/+</sup> and *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice (left and middle panels). Graph represents the quantification of SHP-1 phosphorylation normalized to the amount of Rac1 (right panel). **(G)** Flow cytometry analysis of positive selection in AND *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice. Contour plots represent CD4 versus CD8 staining profiles of thymocytes from *Usp9X*<sup>+/+</sup> and *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice expressing the AND TCR. Data are representative of four independent experiments. **(H)** Graph shows the CD3<sup>hi</sup> CD4 SP/CD3<sup>hi</sup> CD8 SP thymocyte ratio in *Usp9X*<sup>+/+</sup> (*n* = 4) and *Usp9X*<sup>-/-</sup> (*n* = 5) mice. Data are mean + SEM of three (B) or two (C, D, and F) independent experiments. Western blots are from one experiment and are representative of four (E) or two (F) independent experiments. \**p* < 0.05, two-tailed, unpaired *t* test. n.s., not significant.

**FIGURE 4.** USP9X removes K48 ubiquitin chains on Themis following TCR engagement. **(A)** Themis was immunoprecipitated from cellular extracts of thymocytes as described in *Materials and Methods*. Samples were analyzed by Western blotting with anti-ubiquitin and anti-Themis Abs. **(B)** Jurkat cells were transfected with plasmids encoding for FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding HA-tagged ubiquitin. Themis was immunoprecipitated from cellular extracts, and samples were analyzed by Western blotting with anti-HA Abs. **(C)** Total thymocytes were incubated with MG132 for 2 h. Samples were subjected to immunoprecipitation with Abs specific for Themis and analyzed by Western blotting with Abs specific for the indicated proteins. **(D)** Western blot analysis of Themis ubiquitylation in total thymocytes with Abs specific for K48 or K63 polyubiquitin chains. **(E)** Jurkat cells were transfected with plasmids encoding FLAG-tagged Themis plus plasmids encoding HA-tagged ubiquitin wild-type (WT) or ubiquitin K48R, K63R, K33R, or K29R. Samples were subjected to immunoprecipitation with Abs specific for FLAG and analyzed by Western blotting with Abs specific for the indicated proteins. The black lines indicate where parts of the image were joined. **(F)** Freshly isolated thymocytes were rested or not (0') for the indicated times at 37°C. Themis was immunoprecipitated from cellular extracts analyzed by Western blotting with anti-ubiquitin Abs. Thymocytes from C57BL/6 **(G)** and *Usp9X*<sup>+/+</sup> or *Usp9X*<sup>-/-</sup> **(I)** mice were stimulated with premixed anti-CD3 (αCD3) and anti-CD4 (αCD4) Abs for the indicated times. Samples were subjected to immunoprecipitation with Abs specific for Themis and were analyzed by Western blotting with Abs specific of the indicated proteins. **(H)** CD4<sup>+</sup> peripheral T cells were stimulated with premixed anti-CD3 and anti-CD4 Abs for the indicated times. Themis was immunoprecipitated, and ubiquitylation was analyzed by Western blotting. Western blots are from one experiment and are representative of four (A–C), three (D–F and I), six (G), and two (H) independent experiments.



stimulation of thymocytes or peripheral CD4<sup>+</sup> T cells with anti-CD3 + anti-CD4 Abs (Fig. 4G, 4H). In contrast, we found that Themis ubiquitylation was enhanced in *Usp9X*<sup>-/-</sup> thymocytes after stimulation, suggesting that ubiquitin ligases may further ubiquitylate Themis following TCR engagement but that USP9X overcomes this process and reduces Themis ubiquitylation to less than its baseline level by removing polyubiquitin chains on Themis (Fig. 4I).

#### *USP9X interacts directly with Themis CABIT1 domain*

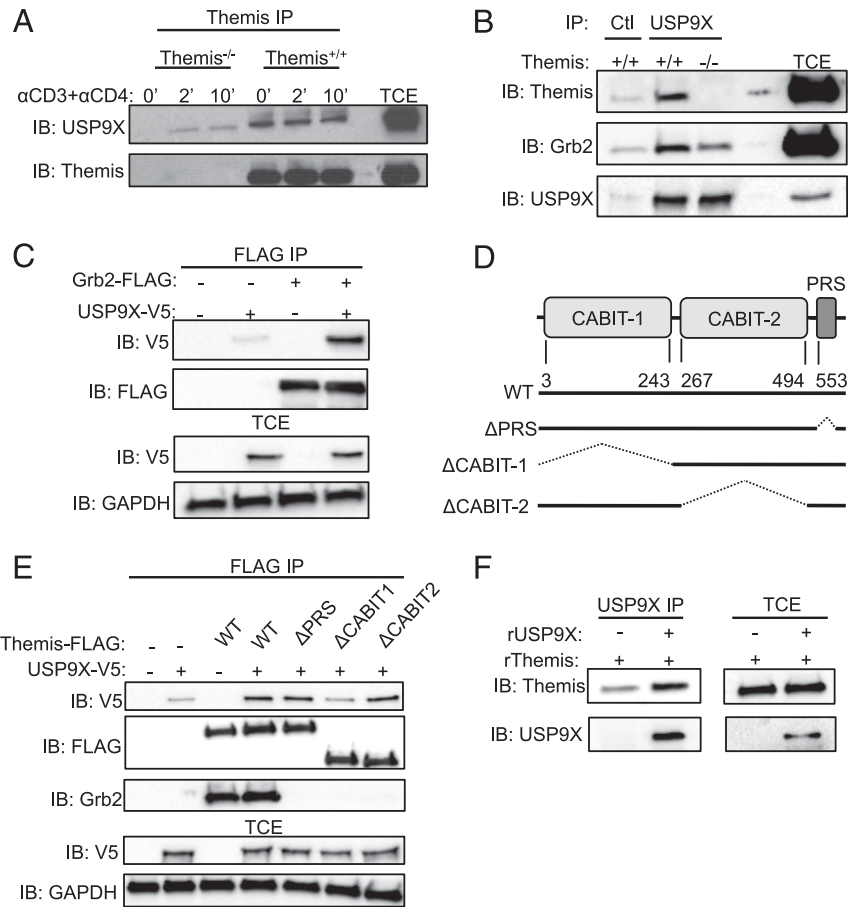
We next investigated the molecular mechanism by which USP9X controls Themis expression and ubiquitylation. We found that USP9X coimmunoprecipitates with Themis in unstimulated thymocytes (Fig. 5A). TCR cross-linking with anti-CD3 and anti-CD4 Abs did not result in a significant increase in this interaction (Fig. 5A). Additionally, we found that Grb2 and Themis coimmunoprecipitate with USP9X in thymocytes (Fig. 5B). Transfection of HEK293T cells with cDNA-encoding tagged versions of Grb2 and USP9X confirmed the binding of USP9X to Grb2 (Fig. 5C), indicating that Grb2 and USP9X may interact in

the absence of Themis. However, the coimmunoprecipitation of Grb2 with USP9X was reduced in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes, suggesting that part of the interaction between Grb2 and USP9X occurs through Themis in thymocytes (Fig. 5B). The mutation of Themis PRS, required for the binding of Themis to Grb2, did not prevent Themis interaction with USP9X in 293T cells, supporting a direct interaction between Themis and USP9X (Fig. 5D, 5E). Accordingly, we found that recombinant proteins of Themis and USP9X could coprecipitate in cell-free assays (Fig. 5F). We next investigated whether the CABIT modules of Themis were important for its interaction with USP9X and found that deletion of Themis' CABIT1(1–260) domain, but not of its CABIT2(260–493) domain, impaired the coimmunoprecipitation of USP9X with Themis (Fig. 5D, 5E).

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

The recruitment of USP9X to LAT promotes its phosphorylation on one of its serine residues (S1600) and enhances its catalytic activity

**FIGURE 5.** USP9X interacts directly with the N-terminal CABIT domain of Themis. Thymocytes from *Themis*<sup>+/+</sup> and *Themis*<sup>-/-</sup> mice were stimulated (A) or not (B) with premixed anti-CD3 and anti-CD4 Abs for the indicated times. Samples were subjected to immunoprecipitation with Abs specific for Themis (A) or USP9X (B) and then analyzed by Western blotting with Abs specific for the indicated proteins. (C) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding for V5-tagged USP9X plus plasmids encoding for FLAG-tagged Grb2. Samples were subjected to immunoprecipitation with Abs specific for FLAG and then analyzed by Western blotting with Abs specific for the indicated proteins. (D) Schematic diagram of Themis constructs used for transfection. (E) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding for V5-tagged USP9X plus plasmids encoding for the indicated Themis constructs. Samples were subjected to immunoprecipitation with Abs specific for FLAG and analyzed by Western blotting with Abs specific for the indicated proteins. (F) Purified Themis and USP9X proteins were incubated together prior to immunoprecipitation with Abs specific for USP9X and Western blot analyses with the indicated Abs. Western blots are from one experiment and are representative of three (A and C) or two (B, E, and F) independent experiments.



(30). Because Grb2 is important for the recruitment of Themis to LAT, we suspected that Grb2 might also be involved in the translocation of USP9X to LAT signaling complexes through its interaction with Themis. To address this possibility, we analyzed the interaction of USP9X with LAT in thymocytes partially deficient for Grb2 (*Grb2*<sup>+/-</sup>) to avoid the substantial perturbations of early TCR signaling observed in thymocytes fully deficient for Grb2 (31). We found that the amounts of LAT that coimmunoprecipitate with USP9X following TCR engagement were decreased in *Grb2*<sup>+/-</sup> heterozygote thymocytes (Fig. 6A). We then analyzed Themis ubiquitylation in *Grb2*<sup>+/-</sup> thymocytes, suspecting that Grb2 might be important to regulate USP9X activity and, thereby, to positively regulate Themis deubiquitylation. We found that the ubiquitylation of Themis was increased in *Grb2*<sup>+/-</sup> thymocytes compared with that in *Grb2*<sup>+/+</sup> thymocytes when thymocytes were stimulated with anti-CD3 + anti-CD4 Abs (Fig. 6B). Accordingly, we found that the expression levels of Themis were comparable in *Grb2*<sup>+/+</sup> and *Grb2*<sup>+/-</sup> DN thymocytes but were decreased in *Grb2*<sup>+/-</sup> DP thymocytes (Fig. 6C, 6D). The amounts of Themis protein were further decreased in SP thymocytes, whereas the relative amount of Themis mRNA remained unchanged in these cells (Fig. 6C–E). Expression of other binding partners of Grb2, such as Cbl or Vav1, remained unchanged in *Grb2*<sup>+/-</sup> thymocytes, indicating that Grb2 selectively stabilizes Themis in thymocytes (Fig. 6F). Collectively, these results identify Grb2 as an important regulator of Themis stability that promotes the deubiquitylation of Themis by USP9X following TCR engagement.

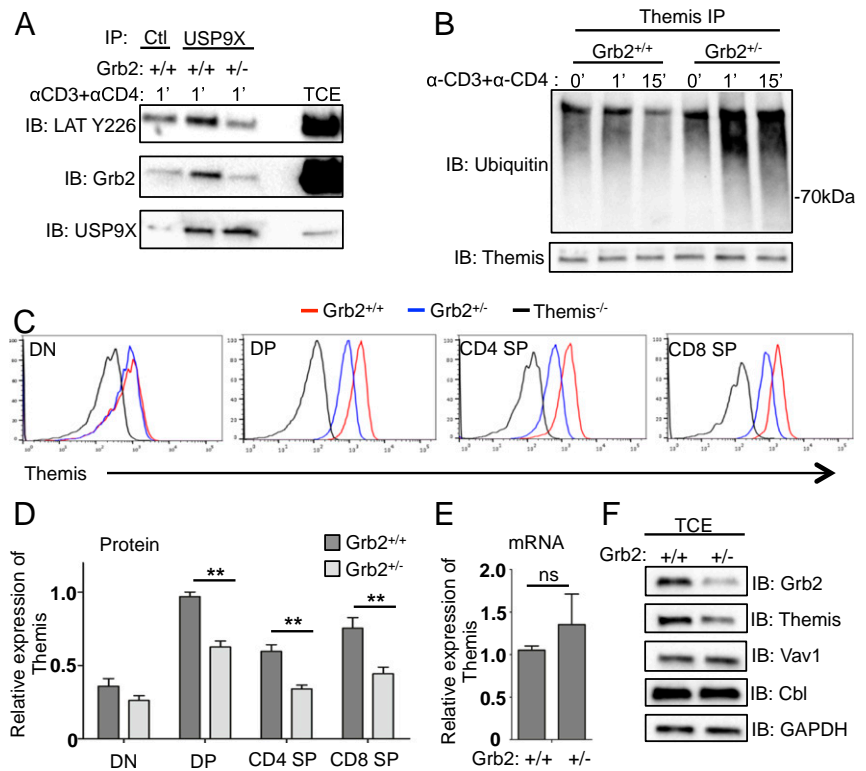
## Discussion

The strong defect in T cell development initially reported in *Themis*<sup>-/-</sup> mice and the concomitant lack of a clear molecular

model to explain this phenotype have led to intensive investigations to resolve the molecular function of this protein. Recent findings suggesting that Themis enhances TCR signaling through the selective inhibition of the tyrosine phosphatase SHP-1 constitute an important breakthrough in the comprehension of this enigmatic molecule (22). Although the role of Themis in TCR signaling begins to be better understood, the mechanisms that regulate Themis expression and/or function have not yet been investigated. In this article, we show that Themis binds to the ubiquitin-specific protease USP9X, which sustains Themis expression transiently during positive selection, whereas the gene encoding for Themis is transcriptionally shutdown. USP9X associates with Themis/Grb2 signaling complexes and enhances Themis stability by removing K48-ubiquitin chains on Themis following TCR engagement. Our study suggests that Grb2 is required for the recruitment of Themis into TCR signaling complexes, as well as contributes to stabilize Themis expression to sustain TCR signals by recruiting USP9X to LAT, where its activity is enhanced following initial signaling events (30).

We show that Themis is ubiquitylated predominantly by K48-linked chains that have a well-established function in the targeting of proteins to proteasomes for degradation (32). Supporting this mechanism, ubiquitylated Themis accumulates when thymocytes are incubated with the proteasome inhibitor MG132. Themis ubiquitylation is detected in unstimulated thymocytes and Jurkat cells, suggesting that Themis is constitutively ubiquitylated in these cells and may have a high turnover rate. These results are supported by proteomic resources obtained in Jurkat cells that identify up to 21 ubiquitylation sites on Themis (33). The mechanism that promotes Themis ubiquitylation is unknown. We previously used mass spectrometry to characterize the interactome of

**FIGURE 6.** Grb2 prevents Themis ubiquitylation and degradation by promoting the recruitment of USP9X to LAT. **(A and B)** Thymocytes from *Grb2*<sup>+/+</sup> and *Grb2*<sup>+/-</sup> mice were stimulated with premixed anti-CD3 and anti-CD4 Abs for the indicated times. Samples were subjected to immunoprecipitation with control (Ctl) (A), anti-USP9X (A), or anti-Themis (B) Abs and analyzed by Western blotting with the indicated Abs. **(C)** Themis staining in the indicated thymocyte subsets from *Grb2*<sup>+/+</sup>, *Grb2*<sup>+/-</sup>, and *Themis*<sup>-/-</sup> mice. **(D)** Relative expression of Themis protein in the indicated thymocyte subsets. **(E)** Real-time PCR analysis of Themis mRNA abundance in total thymocytes from *Grb2*<sup>+/+</sup> and *Grb2*<sup>+/-</sup> mice. **(F)** Total cytoplasmic extracts (TCE) of thymocytes from *Grb2*<sup>+/+</sup> and *Grb2*<sup>+/-</sup> mice were analyzed by Western blotting. Data in (C–E) are mean + SEM of three independent experiments. Western blots are from one experiment and are representative of three (F and B) or one (A) independent experiment. \**p* < 0.05, two-tailed, unpaired *t* test.



Themis in thymocytes and identified several ubiquitin ligases, such as c-Cbl, Ahi2, and Nedd4, as potential binding partners of Themis (27). The cellular levels of Themis remain unchanged in *c-Cbl*<sup>-/-</sup> thymocytes (data not shown), suggesting that Ahi2, Nedd4, or another ubiquitin ligase might be responsible for Themis ubiquitylation.

In this study, we show that the amount of ubiquitylated Themis is decreased following TCR cross-linking, suggesting that TCR-mediated signals promote deubiquitylation and stabilization of Themis. We identified Themis as a new target for the DUB USP9X, a protein that was recently shown to positively regulate TCR signaling (34). USP9X enhances TCR signaling by removing inhibitory monoubiquitylation from ZAP70 and by preventing the sequestration of ZAP70 in early endosomes (30). Interestingly, it was recently shown that the recruitment of USP9X to LAT in peripheral CD4 T cells induces its phosphorylation on S1600, which enhances its catalytic activity (30); however, the mechanism of USP9X recruitment to LAT was not identified in that study. Our biochemical analysis demonstrates that USP9X binds directly to Themis through its CABIT domains, and it may also bind directly to Grb2. Themis binds to the C-terminal SH3 domain of Grb2 via its PRS and is recruited by Grb2 to tyrosine phosphorylated LAT following TCR engagement (21). By facilitating the recruitment of Themis/USP9X complexes to LAT, Grb2 might promote activation of USP9X by serine phosphorylation, which then deubiquitylates Themis. Supporting this mechanism, we found that Themis ubiquitylation is increased in *Grb2*<sup>+/-</sup> thymocytes. Thus, in addition to recruiting Themis to LAT signaling complexes, Grb2 is important for the stabilization of Themis once it becomes recruited to this transmembrane adaptor.

We show that the amounts of Themis protein are increased in DP thymocytes stimulated by self-pMHC ligand even though Themis mRNA is decreased, suggesting that positive-selection signals stabilize Themis protein expression and shut down *Themis* gene expression. The stabilization of Themis protein at this stage of

T cell development might be important to compensate for the profound drop in Themis mRNA levels that could lead to a sudden decrease in TCR signaling and, consequently, impair positive selection or CD4 lineage commitment, which are known to be dependent upon long-lasting TCR signals (35). In contrast, the downregulation of Themis mRNA levels might be important in the longer term, in peripheral T cells, to persistently reduce the amount of Themis protein and, thereby, to dampen the responsiveness of these cells to self-ligands, which is required for the prevention of autoimmunity. It is interesting to note in this context that Themis and SHP-1 expression profiles are inversely correlated, with SHP-1 being more highly expressed in mature T cells than in immature DP thymocytes (36). Reducing the Themis/SHP-1 ratio in mature T cells might be important to relieve the brake that Themis exerts on SHP-1 and enable this phosphatase to inhibit weak TCR signals that may potentially lead to self-recognition (15).

We previously showed that positive selection is impaired when Themis expression level is decreased by 2-fold in AND TCR-transgenic mice hemideficient for Themis (*Themis*<sup>+/-</sup>), indicating that a quantitative variation in Themis expression may affect positive selection (27). However, we found that positive selection and CD4 lineage choice occur normally in *Usp9X*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that the reduced expression of Themis observed in *Usp9X*<sup>-/-</sup> DP thymocytes might not be sufficient to significantly impair these developmental processes. Notably, the partial reduction in Themis expression in *Usp9X*<sup>-/-</sup> thymocytes only moderately attenuated SHP-1 phosphorylation in comparison with the strong reduction observed in *Themis*<sup>-/-</sup> thymocytes, and it had no impact on Grb2 expression level, which is decreased in Themis-deficient thymocytes (27). It is possible that USP9X acts redundantly with other USPs to stabilize Themis expression during these late stages of T cell development. Supporting this hypothesis, the expression levels of Themis are only moderately decreased in *Usp9X*<sup>-/-</sup> thymocytes in comparison with the dramatic decrease in Themis expression observed in thymocytes

treated with the pan-DUB inhibitor PR619. Mass spectrometry analysis of Themis binding partners showed that Themis binds other USPs (USP24, USP19, and USP15), in addition to USP9X, that have no reported function in T cell development (27). Further studies will be required to evaluate the role of these proteins in Themis-mediated signaling events and more generally on thymic selection processes.

We previously showed that Themis enhances Grb2 stability by reducing its ubiquitylation in thymocytes (27). This suggests that Themis and Grb2 are more stable as a complex than as free unbound proteins. This mutual stabilization mechanism might be important to enrich thymocytes with effective Themis/Grb2 signaling complexes, which may facilitate the transmission of TCR signals and their persistence during the development of T cells. We showed, in the same article, that the transgenic expression of Themis in *Grb2*<sup>+/-</sup> thymocytes expressing the class II-restricted AND TCR rescues the defect in positive selection resulting from the partial loss of Grb2 (27). We speculated at that time that Themis acts by readjusting the amount of intracellular Grb2 close to its level in wild-type thymocytes. This new study provides a different interpretation for these data, suggesting that the defect in positive selection in Grb2-deficient mice might result from the destabilization of Themis and from the subsequent decrease in its expression. Thus, an unexpected function of Grb2 could be to maintain the expression of Themis above a certain level and under which level TCR signals are not sufficient to effectively promote positive selection. Whether the transgenic expression of Themis rescues the defect in positive selection in thymocytes that are fully deficient for Grb2 remains to be addressed.

## Acknowledgments

We thank P.E. Love for critical reading of the manuscript, the Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan flow cytometry facility, and the INSERM UMS006-CREFRE animal care facility.

## Disclosures

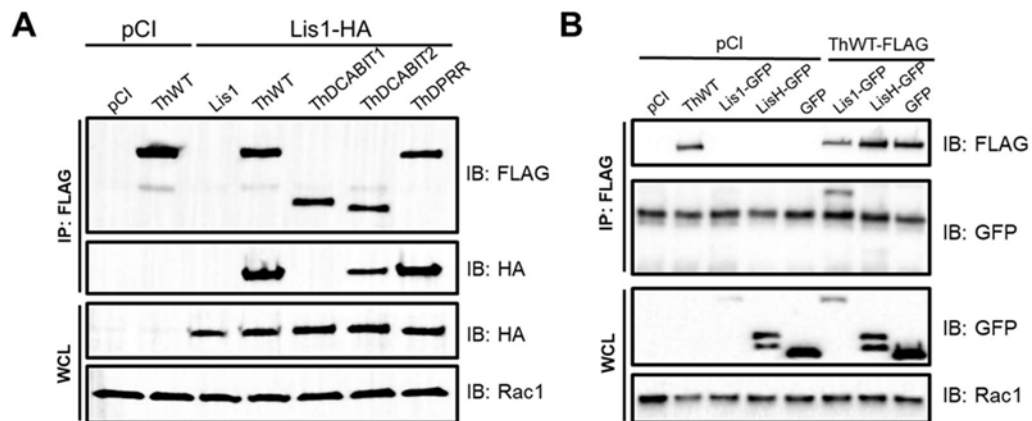
The authors have no financial conflicts of interest.

## References

- Carpenter, A. C., and R. Bosselut. 2010. Decision checkpoints in the thymus. *Nat. Immunol.* 11: 666–673.
- Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 139–176.
- Hogquist, K. A., and S. C. Jameson. 2014. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate 'decisions' and effector function. *Nat. Immunol.* 15: 815–823.
- Wilkinson, R. W., G. Anderson, J. J. Owen, and E. J. Jenkinson. 1995. Positive selection of thymocytes involves sustained interactions with the thymic microenvironment. *J. Immunol.* 155: 5234–5240.
- Mariathasan, S., A. Zakarian, D. Bouchard, A. M. Michie, J. C. Zúñiga-Pflücker, and P. S. Ohashi. 2001. Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J. Immunol.* 167: 4966–4973.
- Ross, J. O., H. J. Melichar, B. B. Au-Yeung, P. Herzmark, A. Weiss, and E. A. Robey. 2014. Distinct phases in the positive selection of CD8+ T cells distinguished by intrathymic migration and T-cell receptor signaling patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E2550–E2558.
- Daniels, M. A., E. Teixeira, J. Gill, B. Hausmann, D. Roubaty, K. Holmberg, G. Werlen, G. A. Holländer, N. R. Gascoigne, and E. Palmer. 2006. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444: 724–729.
- Au-Yeung, B. B., H. J. Melichar, J. O. Ross, D. A. Cheng, J. Zikherman, K. M. Shokat, E. A. Robey, and A. Weiss. 2014. Quantitative and temporal requirements revealed for Zap70 catalytic activity during T cell development. *Nat. Immunol.* 15: 687–694.
- Brugnera, E., A. Bhandoola, R. Cibotti, Q. Yu, T. I. Ginter, Y. Yamashita, S. O. Sharrow, and A. Singer. 2000. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 13: 59–71.
- Dzhagalov, I. L., K. G. Chen, P. Herzmark, and E. A. Robey. 2013. Elimination of self-reactive T cells in the thymus: a timeline for negative selection. *PLoS Biol.* 11: e1001566.
- Acuto, O., V. Di Bartolo, and F. Michel. 2008. Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 699–712.
- Malissen, B., C. Grégoire, M. Malissen, and R. Roncagalli. 2014. Integrative biology of T cell activation. *Nat. Immunol.* 15: 790–797.
- Kosugi, A., J. Sakakura, K. Yasuda, M. Ogata, and T. Hamaoka. 2001. Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts. *Immunity* 14: 669–680.
- Lorenz, U. 2009. SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. *Immunol. Rev.* 228: 342–359.
- Stefanová, I., B. Hemmer, M. Vergelli, R. Martin, W. E. Biddison, and R. N. Germain. 2003. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat. Immunol.* 4: 248–254.
- Fu, G., S. Vallée, V. Rybakina, M. V. McGuire, J. Ampudia, C. Brockmeyer, M. Salek, P. R. Fallen, J. A. Hoerter, A. Munshi, et al. 2009. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat. Immunol.* 10: 848–856.
- Johnson, A. L., L. Aravind, N. Shulzhenko, A. Morgun, S. Y. Choi, T. L. Croxford, T. Lambe, H. Domaschek, E. M. Kucharska, L. Zheng, et al. 2009. Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat. Immunol.* 10: 831–839.
- Lesourne, R., S. Uehara, J. Lee, K. D. Song, L. Li, J. Pinkhasov, Y. Zhang, N. P. Weng, K. F. Wildt, L. Wang, et al. 2009. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat. Immunol.* 10: 840–847.
- Patrick, M. S., H. Oda, K. Hayakawa, Y. Sato, K. Eshima, T. Kirikae, S. Iemura, M. Shirai, T. Abe, T. Natsume, et al. 2009. Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 16345–16350.
- Lesourne, R., E. Zvezdova, K. D. Song, D. El-Khoury, S. Uehara, V. A. Barr, L. E. Samelson, and P. E. Love. 2012. Interchangeability of Themis1 and Themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J. Immunol.* 189: 1154–1161.
- Paster, W., C. Brockmeyer, G. Fu, P. C. Simister, B. de Wet, A. Martinez-Riaño, J. A. Hoerter, S. M. Feller, C. Wülfing, N. R. Gascoigne, and O. Acuto. 2013. GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J. Immunol.* 190: 3749–3756.
- Choi, S., C. Warzecha, E. Zvezdova, J. Lee, J. Argenty, R. Lesourne, L. Aravind, and P. E. Love. 2017. THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1. [Published erratum appears in 2017 *Nat. Immunol.* 18: 705.] *Nat. Immunol.* 18: 433–441.
- Gong, Q., A. M. Cheng, A. M. Akk, J. Alberola-Ila, G. Gong, T. Pawson, and A. C. Chan. 2001. Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat. Immunol.* 2: 29–36.
- Stegeman, S., L. A. Jolly, S. Premaratne, J. Gecz, L. J. Richards, A. Mackay-Sim, and S. A. Wood. 2013. Loss of Usp9x disrupts cortical architecture, hippocampal development and TGFβ-mediated axonogenesis. *PLoS One* 8: e68287.
- Théard, D., F. Labarrade, M. Partisani, J. Milanini, H. Sakagami, E. A. Fon, S. A. Wood, M. Franco, and F. Luton. 2010. USP9x-mediated deubiquitination of EFA6 regulates de novo tight junction assembly. *EMBO J.* 29: 1499–1509.
- Komander, D., M. J. Clague, and S. Urbé. 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 550–563.
- Zvezdova, E., J. Mikolajczak, A. Garreau, M. Marcellin, L. Rigal, J. Lee, S. Choi, G. Blaize, J. Argenty, J. Familiades, et al. 2016. Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Sci. Signal.* 9: ra51.
- Tian, X., N. S. Isamiddinova, R. J. Peroutka, S. J. Goldenberg, M. R. Mattern, B. Nicholson, and C. Leach. 2011. Characterization of selective ubiquitin and ubiquitin-like protease inhibitors using a fluorescence-based multiplex assay format. *Assay Drug Dev. Technol.* 9: 165–173.
- Shi, J., and H. T. Petrie. 2012. Activation kinetics and off-target effects of thymus-initiated cre transgenes. *PLoS One* 7: e46590.
- Naik, E., and V. M. Dixit. 2016. Usp9x is required for lymphocyte activation and homeostasis through its control of ZAP70 ubiquitination and PKCβ kinase activity. *J. Immunol.* 196: 3438–3451.
- Jang, I. K., J. Zhang, Y. J. Chiang, H. K. Kole, D. G. Cronshaw, Y. Zou, and H. Gu. 2010. Grb2 functions at the top of the T-cell antigen receptor-induced tyrosine kinase cascade to control thymic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 10620–10625.
- Pickart, C. M. 1997. Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J.* 11: 1055–1066.
- Udeshi, N. D., T. Svinikina, P. Mertins, E. Kuhn, D. R. Mani, J. W. Qiao, and S. A. Carr. 2013. Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K-ε-GG) antibody enables routine quantification of 10,000s of ubiquitination sites in single proteomics experiments. *Mol. Cell. Proteomics* 12: 825–831.
- Naik, E., J. D. Webster, J. DeVoss, J. Liu, R. Suriben, and V. M. Dixit. 2014. Regulation of proximal T cell receptor signaling and tolerance induction by deubiquitinase Usp9x. *J. Exp. Med.* 211: 1947–1955.
- Liu, X., and R. Bosselut. 2004. Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo. *Nat. Immunol.* 5: 280–288.
- Stephen, T. L., A. Tikhonova, J. M. Riberdy, and T. M. Laufer. 2009. The activation threshold of CD4+ T cells is defined by TCR/peptide-MHC class II interactions in the thymic medulla. *J. Immunol.* 183: 5554–5562.



## Annexe 4 : Détermination des domaines d'interaction entre THEMIS1 et Lis1



**(A)** Des cellules HEK293T ont été co-transfectées de plasmides codants les protéines Lis1-HA et THEMIS1-Flag WT (ThWT) ou codant pour la protéine THEMIS1-Flag privée de domaine CABIT1 (ThDCABIT1), CABIT2 (ThDCABIT2) ou PRR (ThDPRR). Les cellules ont été lysées puis FLAG a été immunoprécipité. Le Westernblot représente les protéines Lis1-HA co-immunoprécipitées avec les différentes protéines THEMIS1. Nous observons que le CABIT1 est important pour l'interaction entre THEMIS1 et Lis1. Rac1 a été utilisée comme contrôle de quantité dans la condition WCL. **(B)** Des cellules HEK293T ont été co-transfectées de plasmides codant les protéines THEMIS1-Flag WT (ThWT) et Lis1-GFP WT ou codant pour la région LisH-GFP. Les cellules ont été lysées puis FLAG a été immunoprécipité. Le Westernblot représente les protéines Lis1-GFP ou LisH-GFP co-immunoprécipitées ou nous avec les différentes protéines THEMIS1. Nous observons que le domaine LisH ne suffit pas pour l'interaction entre THEMIS1 et Lis1 suggérant que THEMIS1 interagisse avec l'hélice  $\beta$  de Lis1. Rac1 a été utilisée comme contrôle de quantité dans la condition WCL.





# PORTFOLIO

**Au cours de cette thèse, j'ai pu participer à la revision de trois publications scientifiques insérées en annexe1, annexe2 et annexe3 de cette thèse.**

## I) Compétences expérimentales acquises

Au cours de cette these j'ai pu acquérir les compétences suivantes :

→ **Analyse par cytométrie en flux (MACSQUANT, LSR-II, LSR-FORTESSA)** : marquages de surface et intracellulaires pour phénotypage, analyses de la prolifération et du cycle cellulaire et traitements sur FlowJO.

→ **Imagerie en flux (ImageStreamX)** : marquages des cellules, analyses sur le logiciel IDEAS des images

→ **Microscopie confocale et video-microscopie (LSM710 et Spinning Disk)** : réalisation de marquages pour microscopie confocale et vidéo-microscopie et analyses des images sur le logiciel ImageJ,

→ **Culture cellulaire** des LT primaires de souris, des thymocytes doubles négatifs et de lignées cellulaires Jurkats, HEK293T, OP9 et P13.9

→ Réalisation de stimulation de thymocytes et de LT *in vitro* pour l'analyse de protéines phosphorylées, d'immunoprécipitation et révélation par westernblot ou spectrométrie de masse

→ Transfection de cellules Jurkats et HEK293T pour immunoprecipitation et révélation par westernblot.

## II) Formations suivies

→ **Formation "Microscopie de fluorescence"** : présentation de la microscopie et des différentes techniques d'imagerie

→ **Formation "ImageJ"** : apprentissage des fonctions principalement utilisées sur ImageJ pour les traitements d'images

→ **Formation "Enjeux sociétaux de la recherche"** : Présentation des consignes éthiques dans un laboratoire de recherche concernant la transmission des résultats, la transparence des expériences dans un article scientifique et dans les essais cliniques

→ **Formation "Vers le métier de chercheur"**: présentation de différents chercheurs et des formations qu'ils ont suivi jusqu'à leur prise de poste



# REFERENCES

1. **Li J, Reantragoon R, Kostenko L, Corbett AJ, Varigos G, Carbone FR.** 2017. The frequency of mucosal-associated invariant T cells is selectively increased in dermatitis herpetiformis. *Australas J Dermatol* **58**:200-204.
2. **Tsuda H, Sakai M, Michimata T, Tanebe K, Hayakawa S, Saito S.** 2001. Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* **45**:295-302.
3. **Kearse KP, Roberts JL, Singer A.** 1995. TCR alpha-CD3 delta epsilon association is the initial step in alpha beta dimer formation in murine T cells and is limiting in immature CD4+ CD8+ thymocytes. *Immunity* **2**:391-399.
4. **Sussman JJ, Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J, Weissman AM, Saito T, Klausner RD, Ashwell JD.** 1988. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell* **52**:85-95.
5. **Bolliger L, Johansson B.** 1999. Identification and functional characterization of the zeta-chain dimerization motif for TCR surface expression. *J Immunol* **163**:3867-3876.
6. **Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW.** 2002. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* **111**:967-979.
7. **Cosson P, Lankford SP, Bonifacino JS, Klausner RD.** 1991. Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature* **351**:414-416.
8. **Soetandyo N, Wang Q, Ye Y, Li L.** 2010. Role of intramembrane charged residues in the quality control of unassembled T-cell receptor alpha-chains at the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **123**:1031-1038.
9. **Alcover A, Mariuzza RA, Ermonval M, Acuto O.** 1990. Lysine 271 in the transmembrane domain of the T-cell antigen receptor beta chain is necessary for its assembly with the CD3 complex but not for alpha/beta dimerization. *J Biol Chem* **265**:4131-4135.
10. **Li ZG, Wu WP, Manolios N.** 1996. Structural mutations in the constant region of the T-cell antigen receptor (TCR)beta chain and their effect on TCR alpha and beta chain interaction. *Immunology* **88**:524-530.
11. **Fields BA, Mariuzza RA.** 1996. Structure and function of the T-cell receptor: insights from X-ray crystallography. *Immunol Today* **17**:330-336.
12. **Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA.** 1996. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* **274**:209-219.
13. **Wegener AM, Hou X, Dietrich J, Geisler C.** 1995. Distinct domains of the CD3-gamma chain are involved in surface expression and function of the T cell antigen receptor. *J Biol Chem* **270**:4675-4680.
14. **Bolliger L, Johansson B, Palmer E.** 1997. The short extracellular domain of the T cell receptor zeta chain is involved in assembly and signal transduction. *Mol Immunol* **34**:819-827.

15. **Johansson B, Palmer E, Bolliger L.** 1999. The extracellular domain of the zeta-chain is essential for TCR function. *J Immunol* **162**:878-885.
16. **Bäckström BT, Rubin B, Peter A, Tiefenthaler G, Palmer E.** 1997. T cell receptor alpha-chain tail is required for protein kinase C-mediated down-regulation, but not for signaling. *Eur J Immunol* **27**:1433-1441.
17. **Reth M.** 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**:383-384.
18. **Irving BA, Weiss A.** 1991. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* **64**:891-901.
19. **Letourneur F, Klausner RD.** 1992. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* **255**:79-82.
20. **Straus DB, Weiss A.** 1993. The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J Exp Med* **178**:1523-1530.
21. **Bettini ML, Chou PC, Guy CS, Lee T, Vignali KM, Vignali DAA.** 2017. Cutting Edge: CD3 ITAM Diversity Is Required for Optimal TCR Signaling and Thymocyte Development. *J Immunol* **199**:1555-1560.
22. **Sunder-Plassmann R, Lialios F, Madsen M, Koyasu S, Reinherz EL.** 1997. Functional analysis of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signal transduction: the two YxxL segments within a single CD3zeta-ITAM are functionally distinct. *Eur J Immunol* **27**:2001-2009.
23. **Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE.** 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**:869-877.
24. **Schatz DG, Swanson PC.** 2011. V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu Rev Genet* **45**:167-202.
25. **Sleckman BP, Bardon CG, Ferrini R, Davidson L, Alt FW.** 1997. Function of the TCR alpha enhancer in alphabeta and gammadelta T cells. *Immunity* **7**:505-515.
26. **Bouvier G, Watrin F, Naspetti M, Verthuy C, Naquet P, Ferrier P.** 1996. Deletion of the mouse T-cell receptor beta gene enhancer blocks alphabeta T-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7877-7881.
27. **Bories JC, Demengeot J, Davidson L, Alt FW.** 1996. Gene-targeted deletion and replacement mutations of the T-cell receptor beta-chain enhancer: the role of enhancer elements in controlling V(D)J recombination accessibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7871-7876.
28. **Monroe RJ, Seidl KJ, Gaertner F, Han S, Chen F, Sekiguchi J, Wang J, Ferrini R, Davidson L, Kelsoe G, Alt FW.** 1999. RAG2:GFP knockin mice reveal novel aspects of RAG2 expression in primary and peripheral lymphoid tissues. *Immunity* **11**:201-212.
29. **Roose JP, Diehn M, Tomlinson MG, Lin J, Alizadeh AA, Botstein D, Brown PO, Weiss A.** 2003. T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. *PLoS Biol* **1**:E53.
30. **Patra AK, Drewes T, Engelmann S, Chuvpilo S, Kishi H, Hünig T, Serfling E, Bommhardt UH.** 2006. PKB rescues calcineurin/NFAT-induced arrest of Rag expression and pre-T cell differentiation. *J Immunol* **177**:4567-4576.
31. **Chao J, Rothschild G, Basu U.** 2014. Ubiquitination events that regulate recombination of immunoglobulin Loci gene segments. *Front Immunol* **5**:100.

32. **Liu Y, Subrahmanyam R, Chakraborty T, Sen R, Desiderio S.** 2007. A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. *Immunity* **27**:561-571.
33. **Matthews AG, Kuo AJ, Ramón-Maiques S, Han S, Champagne KS, Ivanov D, Gallardo M, Carney D, Cheung P, Ciccone DN, Walter KL, Utz PJ, Shi Y, Kutateladze TG, Yang W, Gozani O, Oettinger MA.** 2007. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* **450**:1106-1110.
34. **Hathcock KS, Farrington L, Ivanova I, Livak F, Selimyan R, Sen R, Williams J, Tai X, Hodes RJ.** 2011. The requirement for pre-TCR during thymic differentiation enforces a developmental pause that is essential for V-DJ $\beta$  rearrangement. *PLoS One* **6**:e20639.
35. **Maddon PJ, Molineaux SM, Maddon DE, Zimmerman KA, Godfrey M, Alt FW, Chess L, Axel R.** 1987. Structure and expression of the human and mouse T4 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:9155-9159.
36. **Norment AM, Littman DR.** 1988. A second subunit of CD8 is expressed in human T cells. *EMBO J* **7**:3433-3439.
37. **Shiue L, Gorman SD, Parnes JR.** 1988. A second chain of human CD8 is expressed on peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* **168**:1993-2005.
38. **Doyle C, Strominger JL.** 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* **330**:256-259.
39. **Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR.** 1988. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* **336**:79-81.
40. **Rosenstein Y, Ratnofsky S, Burakoff SJ, Herrmann SH.** 1989. Direct evidence for binding of CD8 to HLA class I antigens. *J Exp Med* **169**:149-160.
41. **König R, Huang LY, Germain RN.** 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* **356**:796-798.
42. **Potter TA, Rajan TV, Dick RF, Bluestone JA.** 1989. Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **337**:73-75.
43. **Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK, Buxton SE, Garrett TP, Clayberger C, Krensky AM, Norment AM, Littman DR, Parham P.** 1990. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* **345**:41-46.
44. **Wooldridge L, van den Berg HA, Glick M, Gostick E, Laugel B, Hutchinson SL, Milicic A, Brenchley JM, Douek DC, Price DA, Sewell AK.** 2005. Interaction between the CD8 coreceptor and major histocompatibility complex class I stabilizes T cell receptor-antigen complexes at the cell surface. *J Biol Chem* **280**:27491-27501.
45. **Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, Carbone FR, Peterson PA, Wilson IA, Teyton L.** 1996. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* **384**:577-581.
46. **Huppa JB, Axmann M, Mörtelmaier MA, Lillemeier BF, Newell EW, Brameshuber M, Klein LO, Schütz GJ, Davis MM.** 2010. TCR-peptide-MHC interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity. *Nature* **463**:963-967.

47. **Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB.** 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**:301-308.
48. **Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC, Weiss A.** 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**:1136-1139.
49. **Artyomov MN, Lis M, Devadas S, Davis MM, Chakraborty AK.** 2010. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:16916-16921.
50. **Jiang N, Huang J, Edwards LJ, Liu B, Zhang Y, Beal CD, Evavold BD, Zhu C.** 2011. Two-stage cooperative T cell receptor-peptide major histocompatibility complex-CD8 trimolecular interactions amplify antigen discrimination. *Immunity* **34**:13-23.
51. **Casas J, Brzostek J, Zarnitsyna VI, Hong JS, Wei Q, Hoerter JA, Fu G, Ampudia J, Zamoyska R, Zhu C, Gascoigne NR.** 2014. Ligand-engaged TCR is triggered by Lck not associated with CD8 coreceptor. *Nat Commun* **5**:5624.
52. **Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sánchez-Madrid F, Alarcón B.** 2002. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* **109**:901-912.
53. **Gil D, Schrum AG, Alarcón B, Palmer E.** 2005. T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes. *J Exp Med* **201**:517-522.
54. **de la Cruz J, Kruger T, Parks CA, Silge RL, van Oers NS, Luescher IF, Schrum AG, Gil D.** 2011. Basal and antigen-induced exposure of the proline-rich sequence in CD3ε. *J Immunol* **186**:2282-2290.
55. **Minguet S, Swamy M, Alarcón B, Luescher IF, Schamel WW.** 2007. Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3. *Immunity* **26**:43-54.
56. **van Oers NS, Killeen N, Weiss A.** 1996. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J Exp Med* **183**:1053-1062.
57. **Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A.** 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**:649-662.
58. **Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE.** 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**:83-92.
59. **Paz PE, Wang S, Clarke H, Lu X, Stokoe D, Abo A.** 2001. Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem J* **356**:461-471.
60. **Abraham N, Veillette A.** 1990. Activation of p56lck through mutation of a regulatory carboxy-terminal tyrosine residue requires intact sites of autophosphorylation and myristylation. *Mol Cell Biol* **10**:5197-5206.
61. **Paige LA, Nadler MJ, Harrison ML, Cassady JM, Geahlen RL.** 1993. Reversible palmitoylation of the protein-tyrosine kinase p56lck. *J Biol Chem* **268**:8669-8674.

62. **Straus DB, Chan AC, Patai B, Weiss A.** 1996. SH2 domain function is essential for the role of the Lck tyrosine kinase in T cell receptor signal transduction. *J Biol Chem* **271**:9976-9981.
63. **Caron L, Abraham N, Pawson T, Veillette A.** 1992. Structural requirements for enhancement of T-cell responsiveness by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Mol Cell Biol* **12**:2720-2729.
64. **Denny MF, Kaufman HC, Chan AC, Straus DB.** 1999. The lck SH3 domain is required for activation of the mitogen-activated protein kinase pathway but not the initiation of T-cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* **274**:5146-5152.
65. **Shaw AS, Amrein KE, Hammond C, Stern DF, Sefton BM, Rose JK.** 1989. The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* **59**:627-636.
66. **Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Perlmutter RM, Littman DR.** 1990. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* **60**:755-765.
67. **Ostergaard HL, Shackelford DA, Hurley TR, Johnson P, Hyman R, Sefton BM, Trowbridge IS.** 1989. Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:8959-8963.
68. **Amrein KE, Sefton BM.** 1988. Mutation of a site of tyrosine phosphorylation in the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase, p56lck, reveals its oncogenic potential in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:4247-4251.
69. **Xu W, Harrison SC, Eck MJ.** 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* **385**:595-602.
70. **Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J.** 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* **385**:602-609.
71. **Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC.** 1999. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* **3**:629-638.
72. **Hardwick JS, Sefton BM.** 1995. Activation of the Lck tyrosine protein kinase by hydrogen peroxide requires the phosphorylation of Tyr-394. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:4527-4531.
73. **Nika K, Soldani C, Salek M, Paster W, Gray A, Etzensperger R, Fugger L, Polzella P, Cerundolo V, Dushek O, Höfer T, Viola A, Acuto O.** 2010. Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* **32**:766-777.
74. **Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A.** 1991. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:9166-9170.
75. **Wange RL, Malek SN, Desiderio S, Samelson LE.** 1993. Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor zeta and CD3 epsilon from activated Jurkat T cells. *J Biol Chem* **268**:19797-19801.
76. **Watts JD, Affolter M, Krebs DL, Wange RL, Samelson LE, Aebersold R.** 1994. Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J Biol Chem* **269**:29520-29529.



77. **Williams BL, Irvin BJ, Sutor SL, Chini CC, Yacyshyn E, Bubeck Wardenburg J, Dalton M, Chan AC, Abraham RT.** 1999. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *EMBO J* **18**:1832-1844.
78. **Chan AC, Dalton M, Johnson R, Kong GH, Wang T, Thoma R, Kurosaki T.** 1995. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J* **14**:2499-2508.
79. **Grazioli L, Germain V, Weiss A, Acuto O.** 1998. Anti-peptide antibodies detect conformational changes of the inter-SH2 domain of ZAP-70 due to binding to the zeta chain and to intramolecular interactions. *J Biol Chem* **273**:8916-8921.
80. **Hatada MH, Lu X, Laird ER, Green J, Morgenstern JP, Lou M, Marr CS, Phillips TB, Ram MK, Theriault K.** 1995. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* **377**:32-38.
81. **Folmer RH, Geschwindner S, Xue Y.** 2002. Crystal structure and NMR studies of the apo SH2 domains of ZAP-70: two bikes rather than a tandem. *Biochemistry* **41**:14176-14184.
82. **Wu J, Zhao Q, Kurosaki T, Weiss A.** 1997. The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J Exp Med* **185**:1877-1882.
83. **Di Bartolo V, Mège D, Germain V, Pelosi M, Dufour E, Michel F, Magistrelli G, Isacchi A, Acuto O.** 1999. Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* **274**:6285-6294.
84. **Brdicka T, Kadlec TA, Roose JP, Pastuszak AW, Weiss A.** 2005. Intramolecular regulatory switch in ZAP-70: analogy with receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **25**:4924-4933.
85. **Zhang W, Tribble RP, Zhu M, Liu SK, McGlade CJ, Samelson LE.** 2000. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* **275**:23355-23361.
86. **Lin J, Weiss A.** 2001. Identification of the minimal tyrosine residues required for linker for activation of T cell function. *J Biol Chem* **276**:29588-29595.
87. **Patrick MS, Oda H, Hayakawa K, Sato Y, Eshima K, Kirikae T, Iemura S, Shirai M, Abe T, Natsume T, Sasazuki T, Suzuki H.** 2009. Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:16345-16350.
88. **Paster W, Brockmeyer C, Fu G, Simister PC, de Wet B, Martinez-Riaño A, Hoerter JA, Feller SM, Wülfing C, Gascoigne NR, Acuto O.** 2013. GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J Immunol* **190**:3749-3756.
89. **Liu SK, Fang N, Koretzky GA, McGlade CJ.** 1999. The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol* **9**:67-75.
90. **Bubeck Wardenburg J, Fu C, Jackman JK, Flotow H, Wilkinson SE, Williams DH, Johnson R, Kong G, Chan AC, Findell PR.** 1996. Phosphorylation of SLP-76 by the

- ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J Biol Chem* **271**:19641-19644.
91. **Bunnell SC, Diehn M, Yaffe MB, Findell PR, Cantley LC, Berg LJ.** 2000. Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade. *J Biol Chem* **275**:2219-2230.
  92. **Liu KQ, Bunnell SC, Gurniak CB, Berg LJ.** 1998. T cell receptor-initiated calcium release is uncoupled from capacitative calcium entry in Itk-deficient T cells. *J Exp Med* **187**:1721-1727.
  93. **Wunderlich L, Faragó A, Downward J, Buday L.** 1999. Association of Nck with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in activated T lymphocytes. *Eur J Immunol* **29**:1068-1075.
  94. **Raab M, da Silva AJ, Findell PR, Rudd CE.** 1997. Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* **6**:155-164.
  95. **da Silva AJ, Li Z, de Vera C, Canto E, Findell P, Rudd CE.** 1997. Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7493-7498.
  96. **Wang H, McCann FE, Gordan JD, Wu X, Raab M, Malik TH, Davis DM, Rudd CE.** 2004. ADAP-SLP-76 binding differentially regulates supramolecular activation cluster (SMAC) formation relative to T cell-APC conjugation. *J Exp Med* **200**:1063-1074.
  97. **Weiss A, Koretzky G, Schatzman RC, Kadlecsek T.** 1991. Functional activation of the T-cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5484-5488.
  98. **Rhee SG.** 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**:281-312.
  99. **Lewis RS.** 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **19**:497-521.
  100. **Shaw PJ, Qu B, Hoth M, Feske S.** 2013. Molecular regulation of CRAC channels and their role in lymphocyte function. *Cell Mol Life Sci* **70**:2637-2656.
  101. **Baksh S, Burakoff SJ.** 2000. The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin Immunol* **12**:405-415.
  102. **Savignac M, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Palczewska M, Mellström B, Naranjo JR.** 2005. Transcriptional repressor DREAM regulates T-lymphocyte proliferation and cytokine gene expression. *EMBO J* **24**:3555-3564.
  103. **Roose JP, Mollenauer M, Gupta VA, Stone J, Weiss A.** 2005. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol* **25**:4426-4441.
  104. **Houtman JC, Yamaguchi H, Barda-Saad M, Braiman A, Bowden B, Appella E, Schuck P, Samelson LE.** 2006. Oligomerization of signaling complexes by the multipoint binding of GRB2 to both LAT and SOS1. *Nat Struct Mol Biol* **13**:798-805.
  105. **Rincón M.** 2001. MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr Opin Immunol* **13**:339-345.

106. **Yu W, Fantl WJ, Harrowe G, Williams LT.** 1998. Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* **8**:56-64.
107. **Nguyen A, Burack WR, Stock JL, Kortum R, Chaika OV, Afkarian M, Muller WJ, Murphy KM, Morrison DK, Lewis RE, McNeish J, Shaw AS.** 2002. Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol* **22**:3035-3045.
108. **Laurent MN, Ramirez DM, Alberola-Ila J.** 2004. Kinase suppressor of Ras couples Ras to the ERK cascade during T cell development. *J Immunol* **173**:986-992.
109. **Matheny SA, Chen C, Kortum RL, Razidlo GL, Lewis RE, White MA.** 2004. Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature* **427**:256-260.
110. **Chen C, Lewis RE, White MA.** 2008. IMP modulates KSR1-dependent multivalent complex formation to specify ERK1/2 pathway activation and response thresholds. *J Biol Chem* **283**:12789-12796.
111. **Matheny SA, White MA.** 2009. Signaling threshold regulation by the Ras effector IMP. *J Biol Chem* **284**:11007-11011.
112. **Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ.** 2014. NF- $\kappa$ B control of T cell development. *Nat Immunol* **15**:15-25.
113. **Thome M.** 2004. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol* **4**:348-359.
114. **Genot EM, Arrieumerlou C, Ku G, Burgering BM, Weiss A, Kramer IM.** 2000. The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositide 3-kinase. *Mol Cell Biol* **20**:5469-5478.
115. **Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y.** 2001. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **276**:31858-31862.
116. **Xue L, Nolla H, Suzuki A, Mak TW, Winoto A.** 2008. Normal development is an integral part of tumorigenesis in T cell-specific PTEN-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:2022-2027.
117. **Huang H, Tindall DJ.** 2007. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* **120**:2479-2487.
118. **Juntilla MM, Koretzky GA.** 2008. Critical roles of the PI3K/Akt signaling pathway in T cell development. *Immunol Lett* **116**:104-110.
119. **Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA.** 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**:233-258.
120. **Beyersdorf N, Kerkau T, Hünig T.** 2015. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther* **4**:111-122.
121. **Howland KC, Ausubel LJ, London CA, Abbas AK.** 2000. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *J Immunol* **164**:4465-4470.
122. **Lucas PJ, Negishi I, Nakayama K, Fields LE, Loh DY.** 1995. Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response. *J Immunol* **154**:5757-5768.
123. **Miyahira Y, Katae M, Kobayashi S, Takeuchi T, Fukuchi Y, Abe R, Okumura K, Yagita H, Aoki T.** 2003. Critical contribution of CD28-CD80/CD86 costimulatory

- pathway to protection from *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* **71**:3131-3137.
124. **Andres PG, Howland KC, Nirula A, Kane LP, Barron L, Dresnek D, Sadra A, Imboden J, Weiss A, Abbas AK.** 2004. Distinct regions in the CD28 cytoplasmic domain are required for T helper type 2 differentiation. *Nat Immunol* **5**:435-442.
  125. **Gunzer M, Schäfer A, Borgmann S, Grabbe S, Zänker KS, Bröcker EB, Kämpgen E, Friedl P.** 2000. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* **13**:323-332.
  126. **Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS.** 2002. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* **295**:1539-1542.
  127. **Dustin ML, Bromley SK, Kan Z, Peterson DA, Unanue ER.** 1997. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3909-3913.
  128. **Kupfer A, Singer SJ.** 1989. The specific interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. IV. Membrane and cytoskeletal reorganizations in the bound T cell as a function of antigen dose. *J Exp Med* **170**:1697-1713.
  129. **Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN.** 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **296**:1873-1876.
  130. **Kupfer A, Swain SL, Janeway CA, Singer SJ.** 1986. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:6080-6083.
  131. **Kupfer H, Monks CR, Kupfer A.** 1994. Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. *J Exp Med* **179**:1507-1515.
  132. **Poo WJ, Conrad L, Janeway CA.** 1988. Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature* **332**:378-380.
  133. **Dustin ML, Choudhuri K.** 2016. Signaling and Polarized Communication Across the T Cell Immunological Synapse. *Annu Rev Cell Dev Biol* **32**:303-325.
  134. **Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A.** 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**:82-86.
  135. **Musci MA, Hendricks-Taylor LR, Motto DG, Paskind M, Kamens J, Turck CW, Koretzky GA.** 1997. Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J Biol Chem* **272**:11674-11677.
  136. **Liu J, Kang H, Raab M, da Silva AJ, Kraeft SK, Rudd CE.** 1998. FYB (FYN binding protein) serves as a binding partner for lymphoid protein and FYN kinase substrate SKAP55 and a SKAP55-related protein in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8779-8784.
  137. **Marie-Cardine A, Hendricks-Taylor LR, Boerth NJ, Zhao H, Schraven B, Koretzky GA.** 1998. Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. *J Biol Chem* **273**:25789-25795.
  138. **Katagiri K, Imamura M, Kinashi T.** 2006. Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. *Nat Immunol* **7**:919-928.

139. **Griffiths EK, Krawczyk C, Kong YY, Raab M, Hyduk SJ, Bouchard D, Chan VS, Kozieradzki I, Oliveira-Dos-Santos AJ, Wakeham A, Ohashi PS, Cybulsky MI, Rudd CE, Penninger JM.** 2001. Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science* **293**:2260-2263.
140. **Peterson EJ, Woods ML, Dmowski SA, Derimanov G, Jordan MS, Wu JN, Myung PS, Liu QH, Pribila JT, Freedman BD, Shimizu Y, Koretzky GA.** 2001. Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* **293**:2263-2265.
141. **Pauker MH, Reicher B, Fried S, Perl O, Barda-Saad M.** 2011. Functional cooperation between the proteins Nck and ADAP is fundamental for actin reorganization. *Mol Cell Biol* **31**:2653-2666.
142. **Zeng R, Cannon JL, Abraham RT, Way M, Billadeau DD, Bubeck-Wardenberg J, Burkhardt JK.** 2003. SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* **171**:1360-1368.
143. **Crespo P, Schuebel KE, Ostrom AA, Gutkind JS, Bustelo XR.** 1997. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* **385**:169-172.
144. **Pollitt AY, Insall RH.** 2009. WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *J Cell Sci* **122**:2575-2578.
145. **Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, Francke U, Abo A.** 1996. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* **84**:723-734.
146. **Aspenström P, Lindberg U, Hall A.** 1996. Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Biol* **6**:70-75.
147. **Valitutti S, Dessing M, Aktories K, Gallati H, Lanzavecchia A.** 1995. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* **181**:577-584.
148. **Delon J, Bercovici N, Liblau R, Trautmann A.** 1998. Imaging antigen recognition by naive CD4+ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response. *Eur J Immunol* **28**:716-729.
149. **Ilani T, Vasiliver-Shamis G, Vardhana S, Bretscher A, Dustin ML.** 2009. T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nat Immunol* **10**:531-539.
150. **Yi J, Wu XS, Crites T, Hammer JA.** 2012. Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *Mol Biol Cell* **23**:834-852.
151. **Yu Y, Fay NC, Smoligovets AA, Wu HJ, Groves JT.** 2012. Myosin IIA modulates T cell receptor transport and CasL phosphorylation during early immunological synapse formation. *PLoS One* **7**:e30704.
152. **Kumari S, Vardhana S, Cammer M, Curado S, Santos L, Sheetz MP, Dustin ML.** 2012. T Lymphocyte Myosin IIA is Required for Maturation of the Immunological Synapse. *Front Immunol* **3**:230.
153. **Bretscher A, Edwards K, Fehon RG.** 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:586-599.

154. **Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewicz VL, Bismuth G, Trautmann A, Germain RN, Delon J.** 2004. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* **5**:272-279.
155. **Kupfer A, Swain SL, Singer SJ.** 1987. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J Exp Med* **165**:1565-1580.
156. **Geiger B, Rosen D, Berke G.** 1982. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol* **95**:137-143.
157. **Kupfer A, Dennert G.** 1984. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol* **133**:2762-2766.
158. **Ueda H, Zhou J, Xie J, Davis MM.** 2015. Distinct Roles of Cytoskeletal Components in Immunological Synapse Formation and Directed Secretion. *J Immunol* **195**:4117-4125.
159. **Combs J, Kim SJ, Tan S, Ligon LA, Holzbaur EL, Kuhn J, Poenie M.** 2006. Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:14883-14888.
160. **Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Sakuma M, Ishihara C, Tokunaga M, Saito T.** 2011. Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse formation and T cell activation. *Immunity* **34**:919-931.
161. **Martín-Cófreces NB, Robles-Valero J, Cabrero JR, Mittelbrunn M, Gordón-Alonso M, Sung CH, Alarcón B, Vázquez J, Sánchez-Madrid F.** 2008. MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *J Cell Biol* **182**:951-962.
162. **Yi J, Wu X, Chung AH, Chen JK, Kapoor TM, Hammer JA.** 2013. Centrosome repositioning in T cells is biphasic and driven by microtubule end-on capture-shrinkage. *J Cell Biol* **202**:779-792.
163. **Kurowska M, Goudin N, Nehme NT, Court M, Garin J, Fischer A, de Saint Basile G, Ménasché G.** 2012. Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex. *Blood* **119**:3879-3889.
164. **Lamason RL, Kupfer A, Pomerantz JL.** 2010. The dynamic distribution of CARD11 at the immunological synapse is regulated by the inhibitory kinesin GAKIN. *Mol Cell* **40**:798-809.
165. **Lee KH, Dinner AR, Tu C, Campi G, Raychaudhuri S, Varma R, Sims TN, Burack WR, Wu H, Wang J, Kanagawa O, Markiewicz M, Allen PM, Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS.** 2003. The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* **302**:1218-1222.
166. **Finetti F, Paccani SR, Riparbelli MG, Giacomello E, Perinetti G, Pazour GJ, Rosenbaum JL, Baldari CT.** 2009. Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat Cell Biol* **11**:1332-1339.
167. **Orozco JT, Wedaman KP, Signor D, Brown H, Rose L, Scholey JM.** 1999. Movement of motor and cargo along cilia. *Nature* **398**:674.

168. **Finetti F, Patrussi L, Masi G, Onnis A, Galgano D, Lucherini OM, Pazour GJ, Baldari CT.** 2014. Specific recycling receptors are targeted to the immune synapse by the intraflagellar transport system. *J Cell Sci* **127**:1924-1937.
169. **Galgano D, Onnis A, Pappalardo E, Galvagni F, Acuto O, Baldari CT.** 2017. The T cell IFT20 interactome reveals new players in immune synapse assembly. *J Cell Sci* **130**:1110-1121.
170. **Osborne DG, Wetzel SA.** 2012. Trogocytosis results in sustained intracellular signaling in CD4(+) T cells. *J Immunol* **189**:4728-4739.
171. **Larghi P, Williamson DJ, Carpier JM, Dogniaux S, Chemin K, Bohineust A, Danglot L, Gaus K, Galli T, Hivroz C.** 2013. VAMP7 controls T cell activation by regulating the recruitment and phosphorylation of vesicular Lat at TCR-activation sites. *Nat Immunol* **14**:723-731.
172. **Zhu J, Yamane H, Paul WE.** 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* **28**:445-489.
173. **Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY.** 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* **30**:531-564.
174. **Johnson BJ, Costelloe EO, Fitzpatrick DR, Haanen JB, Schumacher TN, Brown LE, Kelso A.** 2003. Single-cell perforin and granzyme expression reveals the anatomical localization of effector CD8+ T cells in influenza virus-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:2657-2662.
175. **Ratner A, Clark WR.** 1993. Role of TNF-alpha in CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis. *J Immunol* **150**:4303-4314.
176. **Prévost-Blondel A, Roth E, Rosenthal FM, Pircher H.** 2000. Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J Immunol* **164**:3645-3651.
177. **Brehm MA, Daniels KA, Welsh RM.** 2005. Rapid production of TNF-alpha following TCR engagement of naive CD8 T cells. *J Immunol* **175**:5043-5049.
178. **Cheroutre H, Husain MM.** 2013. CD4 CTL: living up to the challenge. *Semin Immunol* **25**:273-281.
179. **Tian Y, Sette A, Weiskopf D.** 2016. Cytotoxic CD4 T Cells: Differentiation, Function, and Application to Dengue Virus Infection. *Front Immunol* **7**:531.
180. **Takeuchi A, Saito T.** 2017. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4. *Front Immunol* **8**:194.
181. **Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouaisi A, Akharid K, Silvestre R, Estaquier J.** 2014. Impairment of T cell function in parasitic infections. *PLoS Negl Trop Dis* **8**:e2567.
182. **Chang JT, Wherry EJ, Goldrath AW.** 2014. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol* **15**:1104-1115.
183. **Metz PJ, Arsenio J, Kakaradov B, Kim SH, Remedios KA, Oakley K, Akimoto K, Ohno S, Yeo GW, Chang JT.** 2015. Regulation of asymmetric division and CD8+ T lymphocyte fate specification by protein kinase C $\zeta$  and protein kinase C $\lambda$ /I. *J Immunol* **194**:2249-2259.
184. **Arsenio J, Metz PJ, Chang JT.** 2015. Asymmetric Cell Division in T Lymphocyte Fate Diversification. *Trends Immunol* **36**:670-683.
185. **Bray SJ.** 2016. Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**:722-735.

186. **Boisset JC, Robin C.** 2012. On the origin of hematopoietic stem cells: progress and controversy. *Stem Cell Res* **8**:1-13.
187. **He Q, Gao S, Lv J, Li W, Liu F.** 2017. BLOS2 maintains hematopoietic stem cells in the fetal liver via repressing Notch signaling. *Exp Hematol* **51**:1-6.e2.
188. **Orkin SH, Zon LI.** 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**:631-644.
189. **Zhang Y, Gao S, Xia J, Liu F.** 2018. Hematopoietic Hierarchy - An Updated Roadmap. *Trends Cell Biol.*
190. **Cordeiro Gomes A, Hara T, Lim VY, Herndler-Brandstetter D, Nevius E, Sugiyama T, Tani-Ichi S, Schlenner S, Richie E, Rodewald HR, Flavell RA, Nagasawa T, Ikuta K, Pereira JP.** 2016. Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity* **45**:1219-1231.
191. **Yu VW, Saez B, Cook C, Lotinun S, Pardo-Saganta A, Wang YH, Lymperi S, Ferraro F, Raaijmakers MH, Wu JY, Zhou L, Rajagopal J, Kronenberg HM, Baron R, Scadden DT.** 2015. Specific bone cells produce DLL4 to generate thymus-seeding progenitors from bone marrow. *J Exp Med* **212**:759-774.
192. **Ghaedi M, Steer CA, Martinez-Gonzalez I, Halim TYF, Abraham N, Takei F.** 2016. Common-Lymphoid-Progenitor-Independent Pathways of Innate and T Lymphocyte Development. *Cell Rep* **15**:471-480.
193. **Yui MA, Feng N, Rothenberg EV.** 2010. Fine-scale staging of T cell lineage commitment in adult mouse thymus. *J Immunol* **185**:284-293.
194. **Dar A, Schajnovitz A, Lapid K, Kalinkovich A, Itkin T, Ludin A, Kao WM, Battista M, Tesio M, Kollet O, Cohen NN, Margalit R, Buss EC, Baleux F, Oishi S, Fujii N, Larochelle A, Dunbar CE, Broxmeyer HE, Frenette PS, Lapidot T.** 2011. Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells. *Leukemia* **25**:1286-1296.
195. **Love PE, Bhandoola A.** 2011. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat Rev Immunol* **11**:469-477.
196. **Scimone ML, Aifantis I, Apostolou I, von Boehmer H, von Andrian UH.** 2006. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7006-7011.
197. **Zlotoff DA, Zhang SL, De Obaldia ME, Hess PR, Todd SP, Logan TD, Bhandoola A.** 2011. Delivery of progenitors to the thymus limits T-lineage reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* **118**:1962-1970.
198. **Gossens K, Naus S, Corbel SY, Lin S, Rossi FM, Kast J, Ziltener HJ.** 2009. Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *J Exp Med* **206**:761-778.
199. **Schwärzler C, Oliferenko S, Günthert U.** 2001. Variant isoforms of CD44 are required in early thymocyte development. *Eur J Immunol* **31**:2997-3005.
200. **Tan JB, Visan I, Yuan JS, Guidos CJ.** 2005. Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nat Immunol* **6**:671-679.
201. **Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M.** 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**:547-558.



202. **Francis OL, Chaudhry KK, Lamprecht T, Klco JM.** 2017. Impact of Notch disruption on myeloid development. *Blood Cancer J* **7**:e598.
203. **Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC.** 2004. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med* **200**:469-479.
204. **Franco CB, Scripture-Adams DD, Proekt I, Taghon T, Weiss AH, Yui MA, Adams SL, Diamond RA, Rothenberg EV.** 2006. Notch/Delta signaling constrains reengineering of pro-T cells by PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:11993-11998.
205. **Del Real MM, Rothenberg EV.** 2013. Architecture of a lymphomyeloid developmental switch controlled by PU.1, Notch and Gata3. *Development* **140**:1207-1219.
206. **Champhekar A, Damle SS, Freedman G, Carotta S, Nutt SL, Rothenberg EV.** 2015. Regulation of early T-lineage gene expression and developmental progression by the progenitor cell transcription factor PU.1. *Genes Dev* **29**:832-848.
207. **Lefebvre JM, Haks MC, Carleton MO, Rhodes M, Sinnathamby G, Simon MC, Eisenlohr LC, Garrett-Sinha LA, Wiest DL.** 2005. Enforced expression of Spi-B reverses T lineage commitment and blocks beta-selection. *J Immunol* **174**:6184-6194.
208. **Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T.** 2006. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* **25**:731-744.
209. **Longabaugh WJR, Zeng W, Zhang JA, Hosokawa H, Jansen CS, Li L, Romero-Wolf M, Liu P, Kueh HY, Mortazavi A, Rothenberg EV.** 2017. Bcl11b and combinatorial resolution of cell fate in the T-cell gene regulatory network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**:5800-5807.
210. **Johnson JL, Georgakilas G, Petrovic J, Kurachi M, Cai S, Harly C, Pear WS, Bhandoola A, Wherry EJ, Vahedi G.** 2018. Lineage-Determining Transcription Factor TCF-1 Initiates the Epigenetic Identity of T Cells. *Immunity* **48**:243-257.e210.
211. **Li L, Leid M, Rothenberg EV.** 2010. An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science* **329**:89-93.
212. **Hozumi K, Negishi N, Tsuchiya I, Abe N, Hirano K, Suzuki D, Yamamoto M, Engel JD, Habu S.** 2008. Notch signaling is necessary for GATA3 function in the initiation of T cell development. *Eur J Immunol* **38**:977-985.
213. **Van de Walle I, Dolens AC, Durinck K, De Mulder K, Van Loocke W, Damle S, Waegemans E, De Medts J, Velghe I, De Smedt M, Vandekerckhove B, Kerre T, Plum J, Leclercq G, Rothenberg EV, Van Vlierberghe P, Speleman F, Taghon T.** 2016. GATA3 induces human T-cell commitment by restraining Notch activity and repressing NK-cell fate. *Nat Commun* **7**:11171.
214. **Wojciechowski J, Lai A, Kondo M, Zhuang Y.** 2007. E2A and HEB are required to block thymocyte proliferation prior to pre-TCR expression. *J Immunol* **178**:5717-5726.
215. **Franklin DS, Godfrey VL, Lee H, Kovalev GI, Schoonhoven R, Chen-Kiang S, Su L, Xiong Y.** 1998. CDK inhibitors p18(INK4c) and p27(Kip1) mediate two separate pathways to collaboratively suppress pituitary tumorigenesis. *Genes Dev* **12**:2899-2911.

216. **Tsukiyama T, Ishida N, Shirane M, Minamishima YA, Hatakeyama S, Kitagawa M, Nakayama K.** 2001. Down-regulation of p27Kip1 expression is required for development and function of T cells. *J Immunol* **166**:304-312.
217. **Guidos CJ, Williams CJ, Wu GE, Paige CJ, Danska JS.** 1995. Development of CD4+CD8+ thymocytes in RAG-deficient mice through a T cell receptor beta chain-independent pathway. *J Exp Med* **181**:1187-1195.
218. **Diamond RA, Ward SB, Owada-Makabe K, Wang H, Rothenberg EV.** 1997. Different developmental arrest points in RAG-2 <sup>-/-</sup> and SCID thymocytes on two genetic backgrounds: developmental choices and cell death mechanisms before TCR gene rearrangement. *J Immunol* **158**:4052-4064.
219. **Anderson MK, Weiss AH, Hernandez-Hoyos G, Dionne CJ, Rothenberg EV.** 2002. Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity* **16**:285-296.
220. **Ha VL, Luong A, Li F, Casero D, Malvar J, Kim YM, Bhatia R, Crooks GM, Parekh C.** 2017. The T-ALL related gene BCL11B regulates the initial stages of human T-cell differentiation. *Leukemia* **31**:2503-2514.
221. **Yu S, Zhao DM, Jothi R, Xue HH.** 2010. Critical requirement of GABPA for normal T cell development. *J Biol Chem* **285**:10179-10188.
222. **Li L, Salido E, Zhou Y, Bhattacharyya S, Yannone SM, Dunn E, Meneses J, Feeney AJ, Cowan MJ.** 2005. Targeted disruption of the Artemis murine counterpart results in SCID and defective V(D)J recombination that is partially corrected with bone marrow transplantation. *J Immunol* **174**:2420-2428.
223. **Gao Y, Ferguson DO, Xie W, Manis JP, Sekiguchi J, Frank KM, Chaudhuri J, Horner J, DePinho RA, Alt FW.** 2000. Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature* **404**:897-900.
224. **Ouyang H, Nussenzweig A, Kurimasa A, Soares VC, Li X, Cordon-Cardo C, Li W, Cheong N, Nussenzweig M, Iliakis G, Chen DJ, Li GC.** 1997. Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination *In vivo*. *J Exp Med* **186**:921-929.
225. **Tydell CC, David-Fung ES, Moore JE, Rowen L, Taghon T, Rothenberg EV.** 2007. Molecular dissection of prethymic progenitor entry into the T lymphocyte developmental pathway. *J Immunol* **179**:421-438.
226. **Li L, Zhang JA, Dose M, Kueh HY, Mosadeghi R, Gounari F, Rothenberg EV.** 2013. A far downstream enhancer for murine Bcl11b controls its T-cell specific expression. *Blood* **122**:902-911.
227. **Kueh HY, Yui MA, Ng KK, Pease SS, Zhang JA, Damle SS, Freedman G, Siu S, Bernstein ID, Elowitz MB, Rothenberg EV.** 2016. Asynchronous combinatorial action of four regulatory factors activates Bcl11b for T cell commitment. *Nat Immunol* **17**:956-965.
228. **Zhao JY, Osipovich O, Koues OI, Majumder K, Oltz EM.** 2017. Activation of Mouse. *J Immunol* **199**:1131-1141.
229. **Kim WY, Sieweke M, Ogawa E, Wee HJ, Englmeier U, Graf T, Ito Y.** 1999. Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *EMBO J* **18**:1609-1620.

230. **Seo W, Muroi S, Akiyama K, Taniuchi I.** 2017. Distinct requirement of Runx complexes for TCR $\beta$  enhancer activation at distinct developmental stages. *Sci Rep* **7**:41351.
231. **Wang X, Xiao G, Zhang Y, Wen X, Gao X, Okada S, Liu X.** 2008. Regulation of Tcrb recombination ordering by c-Fos-dependent RAG deposition. *Nat Immunol* **9**:794-801.
232. **Fehling HJ, Krotkova A, Saint-Ruf C, von Boehmer H.** 1995. Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* **375**:795-798.
233. **Reizis B, Leder P.** 2002. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev* **16**:295-300.
234. **Takeuchi A, Yamasaki S, Takase K, Nakatsu F, Arase H, Onodera M, Saito T.** 2001. E2A and HEB activate the pre-TCR alpha promoter during immature T cell development. *J Immunol* **167**:2157-2163.
235. **Fehling HJ, Laplace C, Mattei MG, Saint-Ruf C, von Boehmer H.** 1995. Genomic structure and chromosomal location of the mouse pre-T-cell receptor alpha gene. *Immunogenetics* **42**:275-281.
236. **Del Porto P, Bruno L, Mattei MG, von Boehmer H, Saint-Ruf C.** 1995. Cloning and comparative analysis of the human pre-T-cell receptor alpha-chain gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:12105-12109.
237. **Malissen M, Gillet A, Ardouin L, Bouvier G, Trucy J, Ferrier P, Vivier E, Malissen B.** 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J* **14**:4641-4653.
238. **Anderson SJ, Levin SD, Perlmutter RM.** 1993. Protein tyrosine kinase p56lck controls allelic exclusion of T-cell receptor beta-chain genes. *Nature* **365**:552-554.
239. **Groves T, Smiley P, Cooke MP, Forbush K, Perlmutter RM, Guidos CJ.** 1996. Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development. *Immunity* **5**:417-428.
240. **Chiang YJ, Hodes RJ.** 2016. T-cell development is regulated by the coordinated function of proximal and distal Lck promoters active at different developmental stages. *Eur J Immunol* **46**:2401-2408.
241. **Shen S, Zhu M, Lau J, Chuck M, Zhang W.** 2009. The essential role of LAT in thymocyte development during transition from the double-positive to single-positive stage. *J Immunol* **182**:5596-5604.
242. **Nuñez-Cruz S, Aguado E, Richelme S, Chetaille B, Mura AM, Richelme M, Pouyet L, Jouvin-Marche E, Xerri L, Malissen B, Malissen M.** 2003. LAT regulates gammadelta T cell homeostasis and differentiation. *Nat Immunol* **4**:999-1008.
243. **Cheng AM, Negishi I, Anderson SJ, Chan AC, Bolen J, Loh DY, Pawson T.** 1997. The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9797-9801.
244. **Radtke D, Lacher SM, Szumilas N, Sandrock L, Ackermann J, Nitschke L, Zinser E.** 2016. Grb2 Is Important for T Cell Development, Th Cell Differentiation, and Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* **196**:2995-3005.
245. **Fujikawa K, Miletic AV, Alt FW, Faccio R, Brown T, Hoog J, Fredericks J, Nishi S, Mildiner S, Moores SL, Brugge J, Rosen FS, Swat W.** 2003. Vav1/2/3-null mice

- define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *J Exp Med* **198**:1595-1608.
246. **Kumar L, Pivniouk V, de la Fuente MA, Laouini D, Geha RS.** 2002. Differential role of SLP-76 domains in T cell development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:884-889.
  247. **Fu G, Yu M, Chen Y, Zheng Y, Zhu W, Newman DK, Wang D, Wen R.** 2017. Phospholipase C $\gamma$ 1 is required for pre-TCR signal transduction and pre-T cell development. *Eur J Immunol* **47**:74-83.
  248. **Aifantis I, Gounari F, Scorrano L, Borowski C, von Boehmer H.** 2001. Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca<sup>2+</sup> mobilization and activation of NF-kappaB and NFAT. *Nat Immunol* **2**:403-409.
  249. **Irving BA, Alt FW, Killeen N.** 1998. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* **280**:905-908.
  250. **Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Ogata K, Sakata-Sogawa K, Hiroshima M, Wiest DL, Tokunaga M, Saito T.** 2006. Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat Immunol* **7**:67-75.
  251. **Mallis RJ, Bai K, Arthanari H, Hussey RE, Handley M, Li Z, Chingozha L, Duke-Cohan JS, Lu H, Wang JH, Zhu C, Wagner G, Reinherz EL.** 2015. Pre-TCR ligand binding impacts thymocyte development before  $\alpha\beta$ TCR expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:8373-8378.
  252. **Mallis RJ, Arthanari H, Lang MJ, Reinherz EL, Wagner G.** 2018. NMR-directed design of pre-TCR $\beta$  and pMHC molecules implies a distinct geometry for pre-TCR relative to  $\alpha\beta$ TCR recognition of pMHC. *J Biol Chem* **293**:754-766.
  253. **Navarro MN, Nusspaumer G, Fuentes P, González-García S, Alcain J, Toribio ML.** 2007. Identification of CMS as a cytosolic adaptor of the human pTalpha chain involved in pre-TCR function. *Blood* **110**:4331-4340.
  254. **Panigada M, Porcellini S, Barbier E, Hoeflinger S, Cazenave PA, Gu H, Band H, von Boehmer H, Grassi F.** 2002. Constitutive endocytosis and degradation of the pre-T cell receptor. *J Exp Med* **195**:1585-1597.
  255. **Carrasco YR, Ramiro AR, Trigueros C, de Yébenes VG, García-Peydró M, Toribio ML.** 2001. An endoplasmic reticulum retention function for the cytoplasmic tail of the human pre-T cell receptor (TCR) alpha chain: potential role in the regulation of cell surface pre-TCR expression levels. *J Exp Med* **193**:1045-1058.
  256. **Carrasco YR, Navarro MN, Toribio ML.** 2003. A role for the cytoplasmic tail of the pre-T cell receptor (TCR) alpha chain in promoting constitutive internalization and degradation of the pre-TCR. *J Biol Chem* **278**:14507-14513.
  257. **Huang CY, Kanagawa O.** 2004. Impact of early expression of TCR alpha chain on thymocyte development. *Eur J Immunol* **34**:1532-1541.
  258. **Borowski C, Li X, Aifantis I, Gounari F, von Boehmer H.** 2004. Pre-TCRalpha and TCRalpha are not interchangeable partners of TCRbeta during T lymphocyte development. *J Exp Med* **199**:607-615.
  259. **Trigueros C, Hozumi K, Silva-Santos B, Bruno L, Hayday AC, Owen MJ, Pennington DJ.** 2003. Pre-TCR signaling regulates IL-7 receptor alpha expression promoting

- thymocyte survival at the transition from the double-negative to double-positive stage. *Eur J Immunol* **33**:1968-1977.
260. **Dzhagalov I, Dunkle A, He YW.** 2008. The anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 promotes T lymphocyte survival at multiple stages. *J Immunol* **181**:521-528.
261. **Patra AK, Avots A, Zahedi RP, Schüler T, Sickmann A, Bommhardt U, Serfling E.** 2013. An alternative NFAT-activation pathway mediated by IL-7 is critical for early thymocyte development. *Nat Immunol* **14**:127-135.
262. **Boudil A, Matei IR, Shih HY, Bogdanoski G, Yuan JS, Chang SG, Montpellier B, Kowalski PE, Voisin V, Bashir S, Bader GD, Krangel MS, Gidos CJ.** 2015. IL-7 coordinates proliferation, differentiation and Tcra recombination during thymocyte  $\beta$ -selection. *Nat Immunol* **16**:397-405.
263. **Mandal M, Borowski C, Palomero T, Ferrando AA, Oberdoerffer P, Meng F, Ruiz-Vela A, Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC, Screpanti I, Look AT, Korsmeyer SJ, Rajewsky K, von Boehmer H, Aifantis I.** 2005. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J Exp Med* **201**:603-614.
264. **Mandal M, Crusio KM, Meng F, Liu S, Kinsella M, Clark MR, Takeuchi O, Aifantis I.** 2008. Regulation of lymphocyte progenitor survival by the proapoptotic activities of Bim and Bid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:20840-20845.
265. **Mao C, Tili EG, Dose M, Haks MC, Bear SE, Maroulakou I, Horie K, Gaitanaris GA, Fidanza V, Ludwig T, Wiest DL, Gounari F, Tsichlis PN.** 2007. Unequal contribution of Akt isoforms in the double-negative to double-positive thymocyte transition. *J Immunol* **178**:5443-5453.
266. **Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC.** 2005. Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat Immunol* **6**:881-888.
267. **Brekelmans P, van Soest P, Leenen PJ, van Ewijk W.** 1994. Inhibition of proliferation and differentiation during early T cell development by anti-transferrin receptor antibody. *Eur J Immunol* **24**:2896-2902.
268. **Tramont PC, Zhang L, Giles AJ, Walk SF, Gu JJ, Pendergast AM, Ravichandran KS.** 2015. ShcA regulates thymocyte proliferation through specific transcription factors and a c-Abl-dependent signaling axis. *Mol Cell Biol* **35**:1462-1476.
269. **Dang CV.** 2012. MYC on the path to cancer. *Cell* **149**:22-35.
270. **Douglas NC, Jacobs H, Bothwell AL, Hayday AC.** 2001. Defining the specific physiological requirements for c-Myc in T cell development. *Nat Immunol* **2**:307-315.
271. **Dose M, Khan I, Guo Z, Kovalovsky D, Krueger A, von Boehmer H, Khazaie K, Gounari F.** 2006. c-Myc mediates pre-TCR-induced proliferation but not developmental progression. *Blood* **108**:2669-2677.
272. **Pham K, Shimoni R, Charnley M, Ludford-Menting MJ, Hawkins ED, Ramsbottom K, Oliaro J, Izon D, Ting SB, Reynolds J, Lythe G, Molina-Paris C, Melichar H, Robey E, Humbert PO, Gu M, Russell SM.** 2015. Asymmetric cell division during T cell development controls downstream fate. *J Cell Biol* **210**:933-950.
273. **Aifantis I, Pivniouk VI, Gärtner F, Feinberg J, Swat W, Alt FW, von Boehmer H, Geha RS.** 1999. Allelic exclusion of the T cell receptor beta locus requires the SH2

- domain-containing leukocyte protein (SLP)-76 adaptor protein. *J Exp Med* **190**:1093-1102.
274. **Xiong J, Armato MA, Yankee TM.** 2011. Immature single-positive CD8<sup>+</sup> thymocytes represent the transition from Notch-dependent to Notch-independent T-cell development. *Int Immunol* **23**:55-64.
275. **Galy A, Verma S, Bárcena A, Spits H.** 1993. Precursors of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells in the human thymus are defined by expression of CD34. Delineation of early events in human thymic development. *J Exp Med* **178**:391-401.
276. **Harker N, Garefalaki A, Menzel U, Ktistaki E, Naito T, Georgopoulos K, Kioussis D.** 2011. Pre-TCR signaling and CD8 gene bivalent chromatin resolution during thymocyte development. *J Immunol* **186**:6368-6377.
277. **Bilic I, Koesters C, Unger B, Sekimata M, Hertweck A, Maschek R, Wilson CB, Ellmeier W.** 2006. Negative regulation of CD8 expression via Cd8 enhancer-mediated recruitment of the zinc finger protein MAZR. *Nat Immunol* **7**:392-400.
278. **Harker N, Naito T, Cortes M, Hostert A, Hirschberg S, Tolaini M, Roderick K, Georgopoulos K, Kioussis D.** 2002. The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins. *Mol Cell* **10**:1403-1415.
279. **Williams CJ, Naito T, Arco PG, Seavitt JR, Cashman SM, De Souza B, Qi X, Keables P, Von Andrian UH, Georgopoulos K.** 2004. The chromatin remodeler Mi-2beta is required for CD4 expression and T cell development. *Immunity* **20**:719-733.
280. **del Blanco B, García-Mariscal A, Wiest DL, Hernández-Munain C.** 2012. Tcra enhancer activation by inducible transcription factors downstream of pre-TCR signaling. *J Immunol* **188**:3278-3293.
281. **Collins B, Clambey ET, Scott-Browne J, White J, Marrack P, Hagman J, Kappler JW.** 2013. Ikaros promotes rearrangement of TCR  $\alpha$  genes in an Ikaros null thymoma cell line. *Eur J Immunol* **43**:521-532.
282. **del Blanco B, Angulo Ú, Krangel MS, Hernández-Munain C.** 2015. T-cell receptor  $\alpha$  enhancer is inactivated in  $\alpha\beta$  T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:E1744-1753.
283. **Trop S, Rhodes M, Wiest DL, Hugo P, Zúñiga-Pflücker JC.** 2000. Competitive displacement of pT alpha by TCR-alpha during TCR assembly prevents surface coexpression of pre-TCR and alpha beta TCR. *J Immunol* **165**:5566-5572.
284. **Chari S, Winandy S.** 2008. Ikaros regulates Notch target gene expression in developing thymocytes. *J Immunol* **181**:6265-6274.
285. **Merkenschlager M, Graf D, Lovatt M, Bommhardt U, Zamoyska R, Fisher AG.** 1997. How many thymocytes audition for selection? *J Exp Med* **186**:1149-1158.
286. **Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P.** 2013. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* **31**:443-473.
287. **Murata S, Takahama Y, Tanaka K.** 2008. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr Opin Immunol* **20**:192-196.
288. **Honey K, Nakagawa T, Peters C, Rudensky A.** 2002. Cathepsin L regulates CD4<sup>+</sup> T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J Exp Med* **195**:1349-1358.

289. **Gommeaux J, Grégoire C, Nguessan P, Richelme M, Malissen M, Guerder S, Malissen B, Carrier A.** 2009. Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4<sup>+</sup> thymocytes. *Eur J Immunol* **39**:956-964.
290. **Linette GP, Grusby MJ, Hedrick SM, Hansen TH, Glimcher LH, Korsmeyer SJ.** 1994. Bcl-2 is upregulated at the CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control points. *Immunity* **1**:197-205.
291. **Yuan J, Crittenden RB, Bender TP.** 2010. c-Myb promotes the survival of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive thymocytes through upregulation of Bcl-xL. *J Immunol* **184**:2793-2804.
292. **Grillot DA, Merino R, Núñez G.** 1995. Bcl-XL displays restricted distribution during T cell development and inhibits multiple forms of apoptosis but not clonal deletion in transgenic mice. *J Exp Med* **182**:1973-1983.
293. **Ma A, Pena JC, Chang B, Margosian E, Davidson L, Alt FW, Thompson CB.** 1995. Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:4763-4767.
294. **Moore NC, Anderson G, Williams GT, Owen JJ, Jenkinson EJ.** 1994. Developmental regulation of bcl-2 expression in the thymus. *Immunology* **81**:115-119.
295. **Lauritsen JP, Kurella S, Lee SY, Lefebvre JM, Rhodes M, Alberola-Ila J, Wiest DL.** 2008. Egr2 is required for Bcl-2 induction during positive selection. *J Immunol* **181**:7778-7785.
296. **Lawson VJ, Weston K, Maurice D.** 2010. Early growth response 2 regulates the survival of thymocytes during positive selection. *Eur J Immunol* **40**:232-241.
297. **Wang X, Zhang Y, Xiao G, Gao X, Liu X.** 2009. c-Fos enhances the survival of thymocytes during positive selection by upregulating Bcl-2. *Cell Res* **19**:340-347.
298. **Hu QN, Baldwin TA.** 2015. Differential roles for Bim and Nur77 in thymocyte clonal deletion induced by ubiquitous self-antigen. *J Immunol* **194**:2643-2653.
299. **Singer A, Adoro S, Park JH.** 2008. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4<sup>-</sup> versus CD8<sup>-</sup> lineage choice. *Nat Rev Immunol* **8**:788-801.
300. **Germain RN.** 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**:309-322.
301. **Bommhardt U, Basson MA, Krummrei U, Zamoyska R.** 1999. Activation of the extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus. *J Immunol* **163**:715-722.
302. **Bommhardt U, Cole MS, Tso JY, Zamoyska R.** 1997. Signals through CD8 or CD4 can induce commitment to the CD4 lineage in the thymus. *Eur J Immunol* **27**:1152-1163.
303. **Gascoigne NR.** 2010. CD8<sup>+</sup> thymocyte differentiation: T cell two-step. *Nat Immunol* **11**:189-190.
304. **Park JH, Adoro S, Guintier T, Erman B, Alag AS, Catalfamo M, Kimura MY, Cui Y, Lucas PJ, Gress RE, Kubo M, Hennighausen L, Feigenbaum L, Singer A.** 2010. Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat Immunol* **11**:257-264.

305. **Barthlott T, Kohler H, Pircher H, Eichmann K.** 1997. Differentiation of CD4(high)CD8(low) coreceptor-skewed thymocytes into mature CD8 single-positive cells independent of MHC class I recognition. *Eur J Immunol* **27**:2024-2032.
306. **Lieu YK, Kumar A, Pajeroski AG, Rogers TJ, Reddy EP.** 2004. Requirement of c-myb in T cell development and in mature T cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:14853-14858.
307. **Wang L, Wildt KF, Zhu J, Zhang X, Feigenbaum L, Tessarollo L, Paul WE, Fowlkes BJ, Bosselut R.** 2008. Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4(+) T cells. *Nat Immunol* **9**:1122-1130.
308. **Aliahmad P, Kadavallore A, de la Torre B, Kappes D, Kaye J.** 2011. TOX is required for development of the CD4 T cell lineage gene program. *J Immunol* **187**:5931-5940.
309. **Taniuchi I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T, Ito Y, Littman DR.** 2002. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* **111**:621-633.
310. **Sato T, Ohno S, Hayashi T, Sato C, Kohu K, Satake M, Habu S.** 2005. Dual functions of Runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes. *Immunity* **22**:317-328.
311. **He X, Park K, Wang H, Zhang Y, Hua X, Li Y, Kappes DJ.** 2008. CD4-CD8 lineage commitment is regulated by a silencer element at the ThPOK transcription-factor locus. *Immunity* **28**:346-358.
312. **Luckey MA, Kimura MY, Waickman AT, Feigenbaum L, Singer A, Park JH.** 2014. The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4(+) lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling. *Nat Immunol* **15**:638-645.
313. **He X, Dave VP, Zhang Y, Hua X, Nicolas E, Xu W, Roe BA, Kappes DJ.** 2005. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature* **433**:826-833.
314. **Yin X, Ladi E, Chan SW, Li O, Killeen N, Kappes DJ, Robey EA.** 2007. CCR7 expression in developing thymocytes is linked to the CD4 versus CD8 lineage decision. *J Immunol* **179**:7358-7364.
315. **Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Boyd RL, Takahama Y.** 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* **200**:493-505.
316. **Kwan J, Killeen N.** 2004. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J Immunol* **172**:3999-4007.
317. **Lkhagvasuren E, Sakata M, Ohigashi I, Takahama Y.** 2013. Lymphotoxin  $\beta$  receptor regulates the development of CCL21-expressing subset of postnatal medullary thymic epithelial cells. *J Immunol* **190**:5110-5117.
318. **Anderson MS, Venzani ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D.** 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**:1395-1401.
319. **Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, Danks L, Nitta T, Komatsu N, Kodama T, Takayanagi H.** 2015. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* **163**:975-987.
320. **Irla M, Hollander G, Reith W.** 2010. Control of central self-tolerance induction by autoreactive CD4+ thymocytes. *Trends Immunol* **31**:71-79.



321. **Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N.** 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* **17**:393-398.
322. **Sansom SN, Shikama-Dorn N, Zhanybekova S, Nusspaumer G, Macaulay IC, Deadman ME, Heger A, Ponting CP, Holländer GA.** 2014. Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res* **24**:1918-1931.
323. **Ohnmacht C, Pullner A, King SB, Drexler I, Meier S, Brocker T, Voehringer D.** 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* **206**:549-559.
324. **Hadeiba H, Lahl K, Edalati A, Oderup C, Habtezion A, Pachynski R, Nguyen L, Ghodsi A, Adler S, Butcher EC.** 2012. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* **36**:438-450.
325. **Cédile O, Løbner M, Toft-Hansen H, Frank I, Wlodarczyk A, Irla M, Owens T.** 2014. Thymic CCL2 influences induction of T-cell tolerance. *J Autoimmun* **55**:73-85.
326. **Lopes N, Charaix J, Cédile O, Sergé A, Irla M.** 2018. Lymphotoxin  $\alpha$  fine-tunes T cell clonal deletion by regulating thymic entry of antigen-presenting cells. *Nat Commun* **9**:1262.
327. **Fassett MS, Jiang W, D'Alise AM, Mathis D, Benoist C.** 2012. Nuclear receptor Nr4a1 modulates both regulatory T-cell (Treg) differentiation and clonal deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:3891-3896.
328. **Hu QN, Suen AYW, Henao Caviedes LM, Baldwin TA.** 2017. Nur77 Regulates Nondeletional Mechanisms of Tolerance in T Cells. *J Immunol* **199**:3147-3157.
329. **Suen AY, Baldwin TA.** 2012. Proapoptotic protein Bim is differentially required during thymic clonal deletion to ubiquitous versus tissue-restricted antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:893-898.
330. **Wang J, He N, Zhang N, Quan D, Zhang S, Zhang C, Yu RT, Atkins AR, Zhu R, Yang C, Cui Y, Liddle C, Downes M, Xiao H, Zheng Y, Auwerx J, Evans RM, Leng Q.** 2017. NCoR1 restrains thymic negative selection by repressing Bim expression to spare thymocytes undergoing positive selection. *Nat Commun* **8**:959.
331. **Li MO, Rudensky AY.** 2016. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol* **16**:220-233.
332. **Malchow S, Leventhal DS, Lee V, Nishi S, Socci ND, Savage PA.** 2016. Aire Enforces Immune Tolerance by Directing Autoreactive T Cells into the Regulatory T Cell Lineage. *Immunity* **44**:1102-1113.
333. **Apert C, Romagnoli P, van Meerwijk JPM.** 2018. IL-2 and IL-15 dependent thymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes. *Protein Cell* **9**:322-332.
334. **Zachariah MA, Cyster JG.** 2010. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science* **328**:1129-1135.
335. **Carlson CM, Endrizzi BT, Wu J, Ding X, Weinreich MA, Walsh ER, Wani MA, Lingrel JB, Hogquist KA, Jameson SC.** 2006. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* **442**:299-302.

336. **Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL.** 2004. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem* **279**:15396-15401.
337. **Johnson AL, Aravind L, Shulzhenko N, Morgun A, Choi SY, Crockford TL, Lambe T, Domaschenz H, Kucharska EM, Zheng L, Vinuesa CG, Lenardo MJ, Goodnow CC, Cornall RJ, Schwartz RH.** 2009. Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat Immunol* **10**:831-839.
338. **Fu G, Vallée S, Rybakin V, McGuire MV, Ampudia J, Brockmeyer C, Salek M, Fallen PR, Hoerter JA, Munshi A, Huang YH, Hu J, Fox HS, Sauer K, Acuto O, Gascoigne NR.** 2009. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat Immunol* **10**:848-856.
339. **Lesourne R, Uehara S, Lee J, Song KD, Li L, Pinkhasov J, Zhang Y, Weng NP, Wildt KF, Wang L, Bosselut R, Love PE.** 2009. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol* **10**:840-847.
340. **Kakugawa K, Yasuda T, Miura I, Kobayashi A, Fukiage H, Satoh R, Matsuda M, Koseki H, Wakana S, Kawamoto H, Yoshida H.** 2009. A novel gene essential for the development of single positive thymocytes. *Mol Cell Biol* **29**:5128-5135.
341. **Duguet F, Locard-Paulet M, Marcellin M, Chaoui K, Bernard I, Andreoletti O, Lesourne R, Burlet-Schiltz O, Gonzalez de Peredo A, Saoudi A.** 2017. Proteomic Analysis of Regulatory T Cells Reveals the Importance of Themis1 in the Control of Their Suppressive Function. *Mol Cell Proteomics* **16**:1416-1432.
342. **Pedros C, Gaud G, Bernard I, Kassem S, Chabod M, Lagrange D, Andréoletti O, Dejean AS, Lesourne R, Fournié GJ, Saoudi A.** 2015. An Epistatic Interaction between Themis1 and Vav1 Modulates Regulatory T Cell Function and Inflammatory Bowel Disease Development. *J Immunol* **195**:1608-1616.
343. **Lesourne R, Zvezdova E, Song KD, El-Khoury D, Uehara S, Barr VA, Samelson LE, Love PE.** 2012. Interchangeability of Themis1 and Themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J Immunol* **189**:1154-1161.
344. **Cheng D, Deobagkar-Lele M, Zvezdova E, Choi S, Uehara S, Baup D, Bennett SC, Bull KR, Crockford TL, Ferry H, Warzecha C, Marcellin M, de Peredo AG, Lesourne R, Anzilotti C, Love PE, Cornall RJ.** 2016. Themis2 lowers the threshold for B cell activation during positive selection. *Nat Immunol*.
345. **Brockmeyer C, Paster W, Pepper D, Tan CP, Trudgian DC, McGowan S, Fu G, Gascoigne NR, Acuto O, Salek M.** 2011. T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *J Biol Chem* **286**:7535-7547.
346. **Fu G, Casas J, Rigaud S, Rybakin V, Lambolez F, Brzostek J, Hoerter JA, Paster W, Acuto O, Cheroutre H, Sauer K, Gascoigne NR.** 2013. Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* **504**:441-445.
347. **Zvezdova E, Mikolajczak J, Garreau A, Marcellin M, Rigal L, Lee J, Choi S, Blaize G, Argenty J, Familiades J, Li L, Gonzalez de Peredo A, Burlet-Schiltz O, Love PE,**

- Lesourne R.** 2016. Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Sci Signal* **9**:ra51.
348. **Plas DR, Williams CB, Kersh GJ, White LS, White JM, Paust S, Ulyanova T, Allen PM, Thomas ML.** 1999. Cutting edge: the tyrosine phosphatase SHP-1 regulates thymocyte positive selection. *J Immunol* **162**:5680-5684.
349. **Choi S, Warzecha C, Zvezdova E, Lee J, Argenty J, Lesourne R, Aravind L, Love PE.** 2017. THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1. *Nat Immunol*.
350. **Garreau A, Blaize G, Argenty J, Rouquié N, Tourdès A, Wood SA, Saudi A, Lesourne R.** 2017. Grb2-Mediated Recruitment of USP9X to LAT Enhances Themis Stability following Thymic Selection. *J Immunol* **199**:2758-2766.
351. **Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH.** 1993. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* **364**:717-721.
352. **Xiang X, Osmani AH, Osmani SA, Xin M, Morris NR.** 1995. NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol Biol Cell* **6**:297-310.
353. **Willins DA, Liu B, Xiang X, Morris NR.** 1997. Mutations in the heavy chain of cytoplasmic dynein suppress the nudF nuclear migration mutation of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **255**:194-200.
354. **Bruno DL, Anderlid BM, Lindstrand A, van Ravenswaaij-Arts C, Ganesamoorthy D, Lundin J, Martin CL, Douglas J, Nowak C, Adam MP, Kooy RF, Van der Aa N, Reyniers E, Vandeweyer G, Stolte-Dijkstra I, Dijkhuizen T, Yeung A, Delatycki M, Borgström B, Thelin L, Cardoso C, van Bon B, Pfundt R, de Vries BB, Wallin A, Amor DJ, James PA, Slater HR, Schoumans J.** 2010. Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes. *J Med Genet* **47**:299-311.
355. **Classen S, Goecke T, Drechsler M, Betz B, Nickel N, Beier M, Schaper J, Karenfort M, Royer-Pokora B.** 2013. A novel inverted 17p13.3 microduplication disrupting PAFAH1B1 (LIS1) in a girl with syndromic lissencephaly. *Am J Med Genet A* **161A**:1453-1458.
356. **Avela K, Aktan-Collan K, Horelli-Kuitunen N, Knuutila S, Somer M.** 2011. A microduplication on chromosome 17p13.1p13.3 including the PAFAH1B1 (LIS1) gene. *Am J Med Genet A* **155A**:875-879.
357. **Bi W, Sapir T, Shchelochkov OA, Zhang F, Withers MA, Hunter JV, Levy T, Shinder V, Peiffer DA, Gunderson KL, Nezarati MM, Shotts VA, Amato SS, Savage SK, Harris DJ, Day-Salvatore DL, Horner M, Lu XY, Sahoo T, Yanagawa Y, Beaudet AL, Cheung SW, Martinez S, Lupski JR, Reiner O.** 2009. Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nat Genet* **41**:168-177.
358. **Saillour Y, Carion N, Quelin C, Leger PL, Boddaert N, Elie C, Toutain A, Mercier S, Barthez MA, Milh M, Joriot S, des Portes V, Philip N, Broglin D, Roubertie A, Pitelet G, Moutard ML, Pinard JM, Cances C, Kaminska A, Chelly J, Beldjord C, Bahi-Buisson N.** 2009. LIS1-related isolated lissencephaly: spectrum of mutations and relationships with malformation severity. *Arch Neurol* **66**:1007-1015.

359. **de Wit MC, de Rijk-van Andel J, Halley DJ, Poddighe PJ, Arts WF, de Coo IF, Mancini GM.** 2011. Long-term follow-up of type 1 lissencephaly: survival is related to neuroimaging abnormalities. *Dev Med Child Neurol* **53**:417-421.
360. **Philbert M, Maillard C, Cavallin M, Goldenberg A, Masson C, Boddaert N, El Morjani A, Steffann J, Chelly J, Gerard X, Bahi-Buisson N.** 2017. A novel recurrent LIS1 splice site mutation in classic lissencephaly. *Am J Med Genet A* **173**:561-564.
361. **Poirier K, Lebrun N, Broix L, Tian G, Saillour Y, Boscheron C, Parrini E, Valence S, Pierre BS, Oger M, Lacombe D, Geneviève D, Fontana E, Darra F, Cances C, Barth M, Bonneau D, Bernadina BD, N'guyen S, Gitiaux C, Parent P, des Portes V, Pedespan JM, Legrez V, Castelnau-Ptakine L, Nitschke P, Hieu T, Masson C, Zelenika D, Andrieux A, Francis F, Guerrini R, Cowan NJ, Bahi-Buisson N, Chelly J.** 2013. Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat Genet* **45**:639-647.
362. **Hoff C, Seranski P, Mollenhauer J, Korn B, Detzel T, Reinhardt R, Ramser J, Poustka A.** 2000. Physical and transcriptional mapping of the 17p13.3 region that is frequently deleted in human cancer. *Genomics* **70**:26-33.
363. **Phillips NJ, Ziegler MR, Radford DM, Fair KL, Steinbrueck T, Xynos FP, Donis-Keller H.** 1996. Allelic deletion on chromosome 17p13.3 in early ovarian cancer. *Cancer Res* **56**:606-611.
364. **Sarkar C, Chattopadhyay P, Ralte AM, Mahapatra AK, Sinha S.** 2003. Loss of heterozygosity of a locus in the chromosomal region 17p13.3 is associated with increased cell proliferation in astrocytic tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **144**:156-164.
365. **Koch A, Tonn J, Kraus JA, Sorensen N, Albrecht NS, Wiestler OD, Pietsch T.** 1996. Molecular analysis of the lissencephaly gene 1 (LIS-1) in medulloblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* **22**:233-242.
366. **Xing Z, Tang X, Gao Y, Da L, Song H, Wang S, Tiollais P, Li T, Zhao M.** 2011. The human LIS1 is downregulated in hepatocellular carcinoma and plays a tumor suppressor function. *Biochem Biophys Res Commun* **409**:193-199.
367. **Cao S, Lu X, Wang L, Qian X, Jin G, Ma H.** 2017. The functional polymorphisms of LIS1 are associated with acute myeloid leukemia risk in a Han Chinese population. *Leuk Res* **54**:7-11.
368. **Krawinkel MB, Ernst M, Feller A, Flad HD, Mueller-Hermelink HK, Ulmer AJ, Schaub J.** 1989. Lissencephaly, abnormal lymph nodes, and T-cell deficiency in one patient. *Am J Med Genet* **33**:436-443.
369. **Ahn C, Morris NR.** 2001. Nudf, a fungal homolog of the human LIS1 protein, functions as a dimer in vivo. *J Biol Chem* **276**:9903-9909.
370. **Cahana A, Escamez T, Nowakowski RS, Hayes NL, Giacobini M, von Holst A, Shmueli O, Sapir T, McConnell SK, Wurst W, Martinez S, Reiner O.** 2001. Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6429-6434.
371. **Reiner O, Bar-Am I, Sapir T, Shmueli O, Carrozzo R, Lindsay EA, Baldini A, Ledbetter DH, Cahana A.** 1995. LIS2, gene and pseudogene, homologous to LIS1 (lissencephaly 1), located on the short and long arms of chromosome 2. *Genomics* **30**:251-256.

372. **Tarricone C, Perrina F, Monzani S, Massimiliano L, Kim MH, Derewenda ZS, Knapp S, Tsai LH, Musacchio A.** 2004. Coupling PAF signaling to dynein regulation: structure of LIS1 in complex with PAF-acetylhydrolase. *Neuron* **44**:809-821.
373. **Feng Y, Olson EC, Stukenberg PT, Flanagan LA, Kirschner MW, Walsh CA.** 2000. LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome. *Neuron* **28**:665-679.
374. **Markus SM, Plevock KM, St Germain BJ, Punch JJ, Meaden CW, Lee WL.** 2011. Quantitative analysis of Pac1/LIS1-mediated dynein targeting: Implications for regulation of dynein activity in budding yeast. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**:157-174.
375. **Gao X, Chen Z, Zhang J, Li X, Chen G, Wu C.** 2012. OsLIS-L1 encoding a lissencephaly type-1-like protein with WD40 repeats is required for plant height and male gametophyte formation in rice. *Planta* **235**:713-727.
376. **Pałgan K, Bartuzi Z.** 2015. Platelet activating factor in allergies. *Int J Immunopathol Pharmacol* **28**:584-589.
377. **Hammond JW, Lu SM, Gelbard HA.** 2015. Platelet Activating Factor Enhances Synaptic Vesicle Exocytosis Via PKC, Elevated Intracellular Calcium, and Modulation of Synapsin 1 Dynamics and Phosphorylation. *Front Cell Neurosci* **9**:505.
378. **Manya H, Aoki J, Kato H, Ishii J, Hino S, Arai H, Inoue K.** 1999. Biochemical characterization of various catalytic complexes of the brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **274**:31827-31832.
379. **DeWitt MA, Cypranowska CA, Cleary FB, Belyy V, Yildiz A.** 2015. The AAA3 domain of cytoplasmic dynein acts as a switch to facilitate microtubule release. *Nat Struct Mol Biol* **22**:73-80.
380. **Cianfrocco MA, DeSantis ME, Leschziner AE, Reck-Peterson SL.** 2015. Mechanism and regulation of cytoplasmic dynein. *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**:83-108.
381. **Redwine WB, DeSantis ME, Hollyer I, Htet ZM, Tran PT, Swanson SK, Florens L, Washburn MP, Reck-Peterson SL.** 2017. The human cytoplasmic dynein interactome reveals novel activators of motility. *Elife* **6**.
382. **Gama JB, Pereira C, Simões PA, Celestino R, Reis RM, Barbosa DJ, Pires HR, Carvalho C, Amorim J, Carvalho AX, Cheerambathur DK, Gassmann R.** 2017. Molecular mechanism of dynein recruitment to kinetochores by the Rod-Zw10-Zwilch complex and Spindly. *J Cell Biol* **216**:943-960.
383. **Schroeder CM, Vale RD.** 2016. Assembly and activation of dynein-dynactin by the cargo adaptor protein Hook3. *J Cell Biol* **214**:309-318.
384. **Horgan CP, Hanscom SR, Jolly RS, Futter CE, McCaffrey MW.** 2010. Rab11-FIP3 links the Rab11 GTPase and cytoplasmic dynein to mediate transport to the endosomal-recycling compartment. *J Cell Sci* **123**:181-191.
385. **Ham H, Huynh W, Schoon RA, Vale RD, Billadeau DD.** 2015. HkRP3 is a microtubule-binding protein regulating lytic granule clustering and NK cell killing. *J Immunol* **194**:3984-3996.
386. **Loss O, Stephenson FA.** 2017. Developmental changes in trak-mediated mitochondrial transport in neurons. *Mol Cell Neurosci* **80**:134-147.
387. **Sladewski TE, Billington N, Ali MY, Bookwalter CS, Lu H, Kremontsova EB, Schroer TA, Trybus KM.** 2018. Recruitment of two dyneins to an mRNA-dependent Bicaudal D transport complex. *Elife* **7**.

388. **Wang S, Ketcham SA, Schön A, Goodman B, Wang Y, Yates J, Freire E, Schroer TA, Zheng Y.** 2013. Nudel/NudE and Lis1 promote dynein and dynactin interaction in the context of spindle morphogenesis. *Mol Biol Cell* **24**:3522-3533.
389. **Huang J, Roberts AJ, Leschziner AE, Reck-Peterson SL.** 2012. Lis1 acts as a "clutch" between the ATPase and microtubule-binding domains of the dynein motor. *Cell* **150**:975-986.
390. **Egan MJ, Tan K, Reck-Peterson SL.** 2012. Lis1 is an initiation factor for dynein-driven organelle transport. *J Cell Biol* **197**:971-982.
391. **McKenney RJ, Weil SJ, Scherer J, Vallee RB.** 2011. Mutually exclusive cytoplasmic dynein regulation by NudE-Lis1 and dynactin. *J Biol Chem* **286**:39615-39622.
392. **Lenz JH, Schuchardt I, Straube A, Steinberg G.** 2006. A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**:2275-2286.
393. **Efimov VP, Zhang J, Xiang X.** 2006. CLIP-170 homologue and NUDE play overlapping roles in NUDF localization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **17**:2021-2034.
394. **Coquelle FM, Caspi M, Cordelières FP, Dompierre JP, Dujardin DL, Koifman C, Martin P, Hoogenraad CC, Akhmanova A, Galjart N, De Mey JR, Reiner O.** 2002. LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol Cell Biol* **22**:3089-3102.
395. **Kholmanskikh SS, Koeller HB, Wynshaw-Boris A, Gomez T, Letourneau PC, Ross ME.** 2006. Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nat Neurosci* **9**:50-57.
396. **Tai CY, Dujardin DL, Faulkner NE, Vallee RB.** 2002. Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J Cell Biol* **156**:959-968.
397. **Faulkner NE, Dujardin DL, Tai CY, Vaughan KT, O'Connell CB, Wang Y, Vallee RB.** 2000. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* **2**:784-791.
398. **Xiang X.** 2003. LIS1 at the microtubule plus end and its role in dynein-mediated nuclear migration. *J Cell Biol* **160**:289-290.
399. **Klinman E, Holzbaur EL.** 2015. Stress-Induced CDK5 Activation Disrupts Axonal Transport via Lis1/Ndel1/Dynein. *Cell Rep* **12**:462-473.
400. **Yi JY, Ori-McKenney KM, McKenney RJ, Vershinin M, Gross SP, Vallee RB.** 2011. High-resolution imaging reveals indirect coordination of opposite motors and a role for LIS1 in high-load axonal transport. *J Cell Biol* **195**:193-201.
401. **Reddy BJ, Mattson M, Wynne CL, Vadpey O, Durra A, Chapman D, Vallee RB, Gross SP.** 2016. Load-induced enhancement of Dynein force production by LIS1-NudE in vivo and in vitro. *Nat Commun* **7**:12259.
402. **DeSantis ME, Cianfrocco MA, Htet ZM, Tran PT, Reck-Peterson SL, Leschziner AE.** 2017. Lis1 Has Two Opposing Modes of Regulating Cytoplasmic Dynein. *Cell* **170**:1197-1208.e1112.
403. **Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A, Clark GD, Ledbetter DH, McBain CJ, Wynshaw-Boris A.** 1998. Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet* **19**:333-339.
404. **Escamez T, Bahamonde O, Tabares-Seisdedos R, Vieta E, Martinez S, Echevarria D.** 2012. Developmental dynamics of PFAH1B subunits during mouse brain development. *J Comp Neurol* **520**:3877-3894.

405. **Katayama KI, Hayashi K, Inoue S, Sakaguchi K, Nakajima K.** 2017. Enhanced expression of Pafah1b1 causes over-migration of cerebral cortical neurons into the marginal zone. *Brain Struct Funct* **222**:4283-4291.
406. **Jheng GW, Hur SS, Chang CM, Wu CC, Cheng JS, Lee HH, Chung BC, Wang YK, Lin KH, Del Álamo JC, Chien S, Tsai JW.** 2018. Lis1 dysfunction leads to traction force reduction and cytoskeletal disorganization during cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* **497**:869-875.
407. **Mayor R, Etienne-Manneville S.** 2016. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**:97-109.
408. **Kholmanskikh SS, Dobrin JS, Wynshaw-Boris A, Letourneau PC, Ross ME.** 2003. Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons. *J Neurosci* **23**:8673-8681.
409. **Chen S, Kaneko S, Ma X, Chen X, Ip YT, Xu L, Xie T.** 2010. Lissencephaly-1 controls germline stem cell self-renewal through modulating bone morphogenetic protein signaling and niche adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:19939-19944.
410. **Hebbar S, Guillotte AM, Mesngon MT, Zhou Q, Wynshaw-Boris A, Smith DS.** 2008. Genetic enhancement of the Lis1<sup>+/-</sup> phenotype by a heterozygous mutation in the adenomatous polyposis coli gene. *Dev Neurosci* **30**:157-170.
411. **Preitner N, Quan J, Nowakowski DW, Hancock ML, Shi J, Tcherkezian J, Young-Pearse TL, Flanagan JG.** 2014. APC is an RNA-binding protein, and its interactome provides a link to neural development and microtubule assembly. *Cell* **158**:368-382.
412. **Juanes MA, Bouguenina H, Eskin JA, Jaiswal R, Badache A, Goode BL.** 2017. Adenomatous polyposis coli nucleates actin assembly to drive cell migration and microtubule-induced focal adhesion turnover. *J Cell Biol* **216**:2859-2875.
413. **Graham DM, Andersen T, Sharek L, Uzer G, Rothenberg K, Hoffman BD, Rubin J, Balland M, Bear JE, Burridge K.** 2018. Enucleated cells reveal differential roles of the nucleus in cell migration, polarity, and mechanotransduction. *J Cell Biol* **217**:895-914.
414. **Fruleux A, Hawkins RJ.** 2016. Physical role for the nucleus in cell migration. *J Phys Condens Matter* **28**:363002.
415. **Yadav S, Puri S, Linstedt AD.** 2009. A primary role for Golgi positioning in directed secretion, cell polarity, and wound healing. *Mol Biol Cell* **20**:1728-1736.
416. **Tanaka T, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Gleeson JG.** 2004. Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol* **165**:709-721.
417. **Umeshima H, Hirano T, Kengaku M.** 2007. Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16182-16187.
418. **Rehberg M, Kleylein-Sohn J, Faix J, Ho TH, Schulz I, Gräf R.** 2005. Dictyostelium LIS1 is a centrosomal protein required for microtubule/cell cortex interactions, nucleus/centrosome linkage, and actin dynamics. *Mol Biol Cell* **16**:2759-2771.
419. **Dujardin DL, Barnhart LE, Stehman SA, Gomes ER, Gundersen GG, Vallee RB.** 2003. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J Cell Biol* **163**:1205-1211.
420. **Swanton C.** 2004. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol* **5**:27-36.

421. **Nigg EA, Holland AJ.** 2018. Once and only once: mechanisms of centriole duplication and their deregulation in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**:297-312.
422. **Agircan FG, Schiebel E, Mardin BR.** 2014. Separate to operate: control of centrosome positioning and separation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**.
423. **Musacchio A.** 2015. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr Biol* **25**:R1002-1018.
424. **Jordan MA, Thrower D, Wilson L.** 1992. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci* **102 ( Pt 3)**:401-416.
425. **Tsai JW, Chen Y, Kriegstein AR, Vallee RB.** 2005. LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *J Cell Biol* **170**:935-945.
426. **Liu Z, Steward R, Luo L.** 2000. Drosophila Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nat Cell Biol* **2**:776-783.
427. **Cahana A, Jin XL, Reiner O, Wynshaw-Boris A, O'Neill C.** 2003. A study of the nature of embryonic lethality in LIS1<sup>-/-</sup> mice. *Mol Reprod Dev* **66**:134-142.
428. **Yingling J, Youn YH, Darling D, Toyo-Oka K, Pramparo T, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A.** 2008. Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell* **132**:474-486.
429. **Zimdahl B, Ito T, Blevins A, Bajaj J, Konuma T, Weeks J, Koechlein CS, Kwon HY, Arami O, Rizzieri D, Broome HE, Chuah C, Oehler VG, Sasik R, Hardiman G, Reya T.** 2014. Lis1 regulates asymmetric division in hematopoietic stem cells and in leukemia. *Nat Genet* **46**:245-252.
430. **Cockell MM, Baumer K, Gönczy P.** 2004. lis-1 is required for dynein-dependent cell division processes in *C. elegans* embryos. *J Cell Sci* **117**:4571-4582.
431. **Arquint C, Nigg EA.** 2016. The PLK4-STIL-SAS-6 module at the core of centriole duplication. *Biochem Soc Trans* **44**:1253-1263.
432. **Karki M, Keyhaninejad N, Shuster CB.** 2017. Precocious centriole disengagement and centrosome fragmentation induced by mitotic delay. *Nat Commun* **8**:15803.
433. **Izumi H, Matsumoto Y, Ikeuchi T, Saya H, Kajii T, Matsuura S.** 2009. BubR1 localizes to centrosomes and suppresses centrosome amplification via regulating Plk1 activity in interphase cells. *Oncogene* **28**:2806-2820.
434. **Cosenza MR, Krämer A.** 2016. Centrosome amplification, chromosomal instability and cancer: mechanistic, clinical and therapeutic issues. *Chromosome Res* **24**:105-126.
435. **Kim J, Lee K, Rhee K.** 2015. PLK1 regulation of PCNT cleavage ensures fidelity of centriole separation during mitotic exit. *Nat Commun* **6**:10076.
436. **Moon HM, Youn YH, Pemble H, Yingling J, Wittmann T, Wynshaw-Boris A.** 2014. LIS1 controls mitosis and mitotic spindle organization via the LIS1-NDEL1-dynein complex. *Hum Mol Genet* **23**:449-466.
437. **Sharif SR, Islam A, Moon IS.** 2016. N-Acetyl-D-Glucosamine Kinase Interacts with Dynein-Lis1-NudE1 Complex and Regulates Cell Division. *Mol Cells* **39**:669-679.
438. **McHugh T, Welburn JP.** 2017. Dynein at kinetochores: Making the connection. *J Cell Biol* **216**:855-857.



439. **Gatlin JC, Matov A, Groen AC, Needleman DJ, Maresca TJ, Danuser G, Mitchison TJ, Salmon ED.** 2009. Spindle fusion requires dynein-mediated sliding of oppositely oriented microtubules. *Curr Biol* **19**:287-296.
440. **Florian S, Mayer TU.** 2012. The functional antagonism between Eg5 and dynein in spindle bipolarization is not compatible with a simple push-pull model. *Cell Rep* **1**:408-416.
441. **Ferez NP, Paul R, Fagerstrom C, Mogilner A, Wadsworth P.** 2009. Dynein antagonizes eg5 by crosslinking and sliding antiparallel microtubules. *Curr Biol* **19**:1833-1838.
442. **Tanenbaum ME, Macûrek L, Galjart N, Medema RH.** 2008. Dynein, Lis1 and CLIP-170 counteract Eg5-dependent centrosome separation during bipolar spindle assembly. *EMBO J* **27**:3235-3245.
443. **Vergnolle MA, Taylor SS.** 2007. Cenp-F links kinetochores to Ndel1/Nde1/Lis1/dynein microtubule motor complexes. *Curr Biol* **17**:1173-1179.
444. **Griffis ER, Stuurman N, Vale RD.** 2007. Spindly, a novel protein essential for silencing the spindle assembly checkpoint, recruits dynein to the kinetochore. *J Cell Biol* **177**:1005-1015.
445. **Vagnoni A, Hoffmann PC, Bullock SL.** 2016. Reducing Lissencephaly-1 levels augments mitochondrial transport and has a protective effect in adult *Drosophila* neurons. *J Cell Sci* **129**:178-190.
446. **Shao CY, Zhu J, Xie YJ, Wang Z, Wang YN, Wang Y, Su LD, Zhou L, Zhou TH, Shen Y.** 2013. Distinct functions of nuclear distribution proteins LIS1, Ndel1 and NudCL in regulating axonal mitochondrial transport. *Traffic* **14**:785-797.
447. **Pandey JP, Smith DS.** 2011. A Cdk5-dependent switch regulates Lis1/Ndel1/dynein-driven organelle transport in adult axons. *J Neurosci* **31**:17207-17219.
448. **Holt CE, Bullock SL.** 2009. Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* **326**:1212-1216.
449. **Dix CI, Soundararajan HC, Dzhindzhev NS, Begum F, Suter B, Ohkura H, Stephens E, Bullock SL.** 2013. Lissencephaly-1 promotes the recruitment of dynein and dynactin to transported mRNAs. *J Cell Biol* **202**:479-494.
450. **Yamada M, Toba S, Yoshida Y, Haratani K, Mori D, Yano Y, Mimori-Kiyosue Y, Nakamura T, Itoh K, Fushiki S, Setou M, Wynshaw-Boris A, Torisawa T, Toyoshima YY, Hirotsune S.** 2008. LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *EMBO J* **27**:2471-2483.
451. **Lanctot AA, Peng CY, Pawlisz AS, Joksimovic M, Feng Y.** 2013. Spatially dependent dynamic MAPK modulation by the Nde1-Lis1-Brap complex patterns mammalian CNS. *Dev Cell* **25**:241-255.
452. **Plestant C, Anton ES.** 2013. Scaling the MAPK signaling threshold during CNS patterning. *Dev Cell* **25**:221-222.
453. **Liu L, Lu J, Li X, Wu A, Wu Q, Zhao M, Tang N, Song H.** 2018. The LIS1/NDE1 Complex Is Essential for FGF Signaling by Regulating FGF Receptor Intracellular Trafficking. *Cell Rep* **22**:3277-3291.
454. **Silver DL, Watkins-Chow DE, Schreck KC, Pierfelice TJ, Larson DM, Burnett AJ, Liaw HJ, Myung K, Walsh CA, Gaiano N, Pavan WJ.** 2010. The exon junction

- complex component Magoh controls brain size by regulating neural stem cell division. *Nat Neurosci* **13**:551-558.
455. **Huang Y, Jiang J, Zheng G, Chen J, Lu H, Guo H, Wu C.** 2014. miR-139-5p modulates cortical neuronal migration by targeting Lis1 in a rat model of focal cortical dysplasia. *Int J Mol Med* **33**:1407-1414.
456. **Sapir T, Cahana A, Seger R, Nekhai S, Reiner O.** 1999. LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. *Eur J Biochem* **265**:181-188.
457. **Bradshaw NJ, Soares DC, Carlyle BC, Ogawa F, Davidson-Smith H, Christie S, Mackie S, Thomson PA, Porteous DJ, Millar JK.** 2011. PKA phosphorylation of NDE1 is DISC1/PDE4 dependent and modulates its interaction with LIS1 and NDEL1. *J Neurosci* **31**:9043-9054.
458. **Hebbar S, Mesngon MT, Guillotte AM, Desai B, Ayala R, Smith DS.** 2008. Lis1 and Ndel1 influence the timing of nuclear envelope breakdown in neural stem cells. *J Cell Biol* **182**:1063-1071.
459. **Alonso A, D'Silva S, Rahman M, Meluh PB, Keeling J, Meednu N, Hoops HJ, Miller RK.** 2012. The yeast homologue of the microtubule-associated protein Lis1 interacts with the sumoylation machinery and a SUMO-targeted ubiquitin ligase. *Mol Biol Cell* **23**:4552-4566.
460. **Yamaguchi N, Koizumi H, Aoki J, Natori Y, Nishikawa K, Takanezawa Y, Arai H.** 2007. Type I platelet-activating factor acetylhydrolase catalytic subunits over-expression induces pleiomorphic nuclei and centrosome amplification. *Genes Cells* **12**:1153-1161.
461. **Assadi AH, Zhang G, Beffert U, McNeil RS, Renfro AL, Niu S, Quattrocchi CC, Antalffy BA, Sheldon M, Armstrong DD, Wynshaw-Boris A, Herz J, D'Arcangelo G, Clark GD.** 2003. Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat Genet* **35**:270-276.
462. **Aumais JP, Tunstead JR, McNeil RS, Schaar BT, McConnell SK, Lin SH, Clark GD, Yu-Lee LY.** 2001. NudC associates with Lis1 and the dynein motor at the leading pole of neurons. *J Neurosci* **21**:RC187.
463. **Zhu XJ, Liu X, Jin Q, Cai Y, Yang Y, Zhou T.** 2010. The L279P mutation of nuclear distribution gene C (NudC) influences its chaperone activity and lissencephaly protein 1 (LIS1) stability. *J Biol Chem* **285**:29903-29910.
464. **Zhang J, Li S, Fischer R, Xiang X.** 2003. Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. *Mol Biol Cell* **14**:1479-1488.
465. **Morris SM, Albrecht U, Reiner O, Eichele G, Yu-Lee LY.** 1998. The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC. *Curr Biol* **8**:603-606.
466. **Yamada M, Toba S, Takitoh T, Yoshida Y, Mori D, Nakamura T, Iwane AH, Yanagida T, Imai H, Yu-Lee LY, Schroer T, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S.** 2010. mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1. *EMBO J* **29**:517-531.
467. **Yamada M, Kumamoto K, Mikuni S, Arai Y, Kinjo M, Nagai T, Tsukasaki Y, Watanabe TM, Fukui M, Jin M, Toba S, Hirotsune S.** 2013. Rab6a releases LIS1 from

- a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement. *Nat Commun* **4**:2033.
468. **Sitaram P, Anderson MA, Jodoin JN, Lee E, Lee LA.** 2012. Regulation of dynein localization and centrosome positioning by Lis-1 and asunder during *Drosophila* spermatogenesis. *Development* **139**:2945-2954.
469. **Villarin JM, McCurdy EP, Martínez JC, Hengst U.** 2016. Local synthesis of dynein cofactors matches retrograde transport to acutely changing demands. *Nat Commun* **7**:13865.
470. **Chen X, Zhang J, Zhao J, Liu H, Sun X, Zhao M, Liu X.** 2014. Lis1 is required for the expansion of hematopoietic stem cells in the fetal liver. *Cell Res* **24**:1013-1016.
471. **Chen J, Cai Z, Zhang L, Yin Y, Chen X, Chen C, Zhang Y, Zhai S, Long X, Liu X, Wang X.** 2017. Lis1 Regulates Germinal Center B Cell Antigen Acquisition and Affinity Maturation. *J Immunol* **198**:4304-4311.
472. **Ngoi SM, Lopez JM, Chang JT.** 2016. The Microtubule-Associated Protein Lis1 Regulates T Lymphocyte Homeostasis and Differentiation. *J Immunol* **196**:4237-4245.
473. **Nath S, Christian L, Tan SY, Ki S, Ehrlich LI, Poenie M.** 2016. Dynein Separately Partners with NDE1 and Dynactin To Orchestrate T Cell Focused Secretion. *J Immunol* **197**:2090-2101.
474. **Zhumabekov T, Corbella P, Tolaini M, Kioussis D.** 1995. Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *J Immunol Methods* **185**:133-140.
475. **de Boer J, Williams A, Skavdis G, Harker N, Coles M, Tolaini M, Norton T, Williams K, Roderick K, Potocnik AJ, Kioussis D.** 2003. Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol* **33**:314-325.
476. **Shimshek DR, Kim J, Hübner MR, Spergel DJ, Buchholz F, Casanova E, Stewart AF, Seeburg PH, Sprengel R.** 2002. Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis* **32**:19-26.
477. **Sawada S, Scarborough JD, Killeen N, Littman DR.** 1994. A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development. *Cell* **77**:917-929.
478. **Zhang X, Dong X, Wang H, Li J, Yang B, Zhang J, Hua ZC.** 2014. FADD regulates thymocyte development at the  $\beta$ -selection checkpoint by modulating Notch signaling. *Cell Death Dis* **5**:e1273.
479. **Levine MS, Bakker B, Boeckx B, Moyett J, Lu J, Vitre B, Spierings DC, Lansdorp PM, Cleveland DW, Lambrechts D, Foijer F, Holland AJ.** 2017. Centrosome Amplification Is Sufficient to Promote Spontaneous Tumorigenesis in Mammals. *Dev Cell* **40**:313-322.e315.
480. **Hinchcliffe EH.** 2014. Centrosomes and the art of mitotic spindle maintenance. *Int Rev Cell Mol Biol* **313**:179-217.
481. **Conduit PT, Wainman A, Raff JW.** 2015. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**:611-624.
482. **Lanni JS, Jacks T.** 1998. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol* **18**:1055-1064.

483. **de la Calle C, Joubert PE, Law HK, Hasan M, Albert ML.** 2011. Simultaneous assessment of autophagy and apoptosis using multispectral imaging cytometry. *Autophagy* **7**:1045-1051.
484. **Lau CI, Barbarulo A, Solanki A, Saldaña JI, Crompton T.** 2017. The kinesin motor protein Kif7 is required for T-cell development and normal MHC expression on thymic epithelial cells (TEC) in the thymus. *Oncotarget* **8**:24163-24176.
485. **Tramont PC, Tosello-Tramont AC, Shen Y, Duley AK, Sutherland AE, Bender TP, Littman DR, Ravichandran KS.** 2010. CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nat Immunol* **11**:162-170.
486. **Nishino T, Matsunaga R, Konishi H.** 2015. Functional relationship between CABIT, SAM and 14-3-3 binding domains of GAREM1 that play a role in its subcellular localization. *Biochem Biophys Res Commun* **464**:616-621.
487. **Taya S, Shinoda T, Tsuboi D, Asaki J, Nagai K, Hikita T, Kuroda S, Kuroda K, Shimizu M, Hirotsune S, Iwamatsu A, Kaibuchi K.** 2007. DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1. *J Neurosci* **27**:15-26.
488. **Wynshaw-Boris A.** 2007. Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clin Genet* **72**:296-304.
489. **Reiner O.** 2013. LIS1 and DCX: Implications for Brain Development and Human Disease in Relation to Microtubules. *Scientifica (Cairo)* **2013**:393975.
490. **Reiner O, Sapoznik S, Sapir T.** 2006. Lissencephaly 1 linking to multiple diseases: mental retardation, neurodegeneration, schizophrenia, male sterility, and more. *Neuromolecular Med* **8**:547-565.
491. **Basu R, Huse M.** 2017. Mechanical Communication at the Immunological Synapse. *Trends Cell Biol* **27**:241-254.
492. **Delon J.** 2000. The immunological synapse. *Curr Biol* **10**:R214.
493. **Bahi-Buisson N, Guerrini R.** 2013. Diffuse malformations of cortical development. *Handb Clin Neurol* **111**:653-665.
494. **Jodoin JN, Shboul M, Sitaram P, Zein-Sabatto H, Reversade B, Lee E, Lee LA.** 2012. Human Asunder promotes dynein recruitment and centrosomal tethering to the nucleus at mitotic entry. *Mol Biol Cell* **23**:4713-4724.
495. **Uhlmann F, Lottspeich F, Nasmyth K.** 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* **400**:37-42.
496. **Yanagida M.** 2000. Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes Cells* **5**:1-8.
497. **Leidel S, Delattre M, Cerutti L, Baumer K, Gönczy P.** 2005. SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in *C. elegans* and in human cells. *Nat Cell Biol* **7**:115-125.
498. **Peel N, Stevens NR, Basto R, Raff JW.** 2007. Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation. *Curr Biol* **17**:834-843.
499. **Marteil G, Guerrero A, Vieira AF, de Almeida BP, Machado P, Mendonça S, Mesquita M, Villarreal B, Fonseca I, Francia ME, Dores K, Martins NP, Jana SC, Tranfield EM, Barbosa-Morais NL, Paredes J, Pellman D, Godinho SA, Bettencourt-**

- Dias M.** 2018. Over-elongation of centrioles in cancer promotes centriole amplification and chromosome missegregation. *Nat Commun* **9**:1258.
500. **Malik S, Saito H, Takaoka M, Miki Y, Nakanishi A.** 2016. BRCA2 mediates centrosome cohesion via an interaction with cytoplasmic dynein. *Cell Cycle* **15**:2145-2156.
501. **Tutt A, Gabriel A, Bertwistle D, Connor F, Paterson H, Peacock J, Ross G, Ashworth A.** 1999. Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr Biol* **9**:1107-1110.
502. **Meigs TE, Kaplan DD.** 2008. Isolation of centrosomes from cultured Mammalian cells. *CSH Protoc* **2008**:pdb.prot5039.
503. **Gully CP, Velazquez-Torres G, Shin JH, Fuentes-Mattei E, Wang E, Carlock C, Chen J, Rothenberg D, Adams HP, Choi HH, Guma S, Phan L, Chou PC, Su CH, Zhang F, Chen JS, Yang TY, Yeung SC, Lee MH.** 2012. Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:E1513-1522.
504. **Liu X, Zheng H, Li X, Wang S, Meyerson HJ, Yang W, Neel BG, Qu CK.** 2016. Gain-of-function mutations of Ptpn11 (Shp2) cause aberrant mitosis and increase susceptibility to DNA damage-induced malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:984-989.
505. **Sankar M, Tanaka K, Kumaravel TS, Arif M, Shintani T, Yagi S, Kyo T, Dohy H, Kamada N.** 1998. Identification of a commonly deleted region at 17p13.3 in leukemia and lymphoma associated with 17p abnormality. *Leukemia* **12**:510-516.
506. **Kobayashi M, Kawashima A, Mai M, Ooi A.** 1996. Analysis of chromosome 17p13 (p53 locus) alterations in gastric carcinoma cells by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* **149**:1575-1584.
507. **Olivier M, Hollstein M, Hainaut P.** 2010. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**:a001008.









Jérémy ARGENTY

## **Rôles dans les lymphocytes T de la protéine Lis1, un régulateur de la dynamique des microtubules dépendante de la dynéine**

Directeur de thèse : Dr. Abdelhadi SAOUDI  
Codirecteur de thèse : Dr. Renaud LESOURNE

Thèse soutenue à Toulouse le mardi 25 septembre 2018

Les récepteurs d'antigènes des lymphocytes T (TCR) sont assemblés au cours du développement précoce de ces cellules dans le thymus suite à des recombinaisons complexes de gènes. Le réarrangement d'une chaîne  $\beta$  des TCR fonctionnelle (pré-TCR) déclenche des voies de signalisation intracellulaires qui entraînent la survie, l'expansion et la maturation des thymocytes. Par ailleurs, l'engagement des TCR à la surface des lymphocytes T (LT) matures par des antigènes conduit également à des cycles de prolifération qui permettent le développement de réponses immunitaires efficaces. Ces événements cellulaires s'accompagnent de remaniements importants du réseau de microtubules et une redistribution des moteurs moléculaires, tels que la dynéine, qui véhiculent les structures cellulaires sur ces réseaux. Les mécanismes moléculaires et les conséquences physiologiques de ces remaniements sont peu connus dans les LT. Dans ce travail, nous montrons que Lis1, un régulateur de la dynéine, joue un rôle essentiel dans le développement précoce des LT et dans l'homéostasie des LT matures. La prolifération des thymocytes ayant passé la  $\beta$ -sélection ou des LT matures dont le TCR a été engagé, est fortement impactée. L'analyse fine de la mitose indique que la déficience en Lis1 ralentit fortement le processus mitotique, contrarie les remaniements intracellulaires conduisant à la métaphase et entraîne la répartition asymétrique du matériel génétique dans les cellules filles. L'analyse des réseaux de microtubules montre que l'absence de Lis1 entraîne l'amplification du nombre de centrosomes et l'augmentation des cellules multipolaires au cours de la mitose. En conclusion, nous avons montré que Lis1 est importante dans la distribution du matériel génétique au cours de la prolifération des thymocytes doubles négatifs et des lymphocytes T périphériques.

*Mots clefs* : Lymphocytes T, Thymocytes, Lis1, prolifération, mitose, chromosomes, centrosomes

*Discipline* : Immunologie

Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan  
CHU PURPAN Place du Dr Baylac  
31024 Toulouse Cedex 3