



HAL
open science

Analyse des capacités modulatrices de la protéine THEMIS sur la signalisation et les fonctions biologiques du checkpoint immunitaire BTLA

Suzanne Melique

► **To cite this version:**

Suzanne Melique. Analyse des capacités modulatrices de la protéine THEMIS sur la signalisation et les fonctions biologiques du checkpoint immunitaire BTLA. Immunologie. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT : 2024TLSES079 . tel-04700372

HAL Id: tel-04700372

<https://theses.hal.science/tel-04700372v1>

Submitted on 17 Sep 2024

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.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Analyse des capacités modulatrices de la protéine THEMIS sur
la signalisation et les fonctions biologiques du checkpoint
immunitaire BTLA

Thèse présentée et soutenue, le 7 juin 2024 par

Suzanne MELIQUE

École doctorale

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité

IMMUNOLOGIE

Unité de recherche

INFINITY - Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires

Thèse dirigée par

Renaud LESOURNE

Composition du jury

Mme Laurence BATAILLE, Rapporteur, INSERM de Paris - Institut Curie

M. Daniel OLIVE, Rapporteur, Aix-Marseille Université

M. Remy BOSSELUT, Rapporteur, NIH - National Institutes of Health Bethesda - Etats-Unis

Mme Maha AYYOUB, Examinatrice, Université Toulouse - Paul Sabatier

M. Renaud LESOURNE, Directeur de thèse, INSERM de Toulouse - Infinity

Résumé

Les checkpoints immunitaires sont des récepteurs qui régulent négativement les réponses des lymphocytes T déclenchées par les récepteurs d'antigène (TCR) par les récepteurs de co-stimulations. Les thérapies basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux visant à bloquer ces récepteurs ont considérablement amélioré l'efficacité des thérapies contre le cancer. Le checkpoint immunitaire BTLA régule l'activation des lymphocytes T et la maintenance des lymphocytes T CD8+ en périphérie en inhibant la signalisation émanant du TCR par l'intermédiaire de la tyrosine-phosphatase à domaine SH2, SHP-1. BTLA est exprimé au sur les lymphocytes T en cours de développement dans le thymus au stade de la sélection positive mais on ignore ses fonctions biologiques dans ce contexte. THEMIS est une protéine de signalisation essentielle au développement des lymphocytes T et au maintien des lymphocytes T CD8+ dans les tissus périphériques. La délétion du gène codant pour THEMIS est associée à un défaut de la sélection positive des thymocytes et à une lymphopénie. THEMIS stimule la sélection positive et le maintien des lymphocytes T CD8+ en inhibant l'activité catalytique de SHP-1.

Nous avons émis l'hypothèse que THEMIS puisse stimuler la sélection positive et le maintien des lymphocytes T CD8+ en réprimant les fonctions inhibitrices de BTLA. Nous avons montré que la délétion du gène codant pour THEMIS dans des modèles de souris accroît la capacité de BTLA à inhiber l'activation et la différenciation des lymphocytes CD4+ et CD8+. THEMIS est recruté à BTLA et réprime l'activité phosphatase de SHP-1 en augmentant l'oxydation de sa cystéine catalytique. La déficience en THEMIS n'a cependant pas d'effet sur les fonctions inhibitrices du checkpoint immunitaire PD-1 qui dépend principalement de la tyrosine-phosphatase SHP-2. Nous montrons que la délétion du gène codant pour BTLA restaure la sélection positive dans les souris déficientes pour THEMIS, indiquant que THEMIS stimule la sélection positive en bloquant la signalisation inhibitrice de BTLA. THEMIS stimule aussi le maintien des lymphocytes T CD8+ périphériques en diminuant la capacité de BTLA à inhiber les signaux de survie déclenchés par les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15. Ces résultats suggèrent que les signaux inhibiteurs déclenchés par les checkpoints immunitaires dépendent des interactions avec leurs ligands mais sont aussi contraints par des protéines intracellulaires qui

modulent le seuil à partir duquel ces récepteurs sont capables d'inhiber les lymphocytes T. Ces résultats ont des conséquences dans la compréhension des mécanismes thérapeutiques impliqués dans le traitement du cancer et dans les mécanismes liés à l'émergence des maladies auto-immunes

Summary

Immune checkpoints are receptors that negatively regulate T lymphocyte responses triggered by antigen receptors (TCR) via co-stimulatory receptors. Therapies based on the use of monoclonal antibodies targeting these receptors have significantly improved the efficacy of cancer therapies. The immune checkpoint BTLA regulates T lymphocyte activation and maintenance of peripheral CD8⁺ T lymphocytes by inhibiting signaling emanating from the TCR through the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase, SHP-1. BTLA is expressed on T lymphocytes during development in the thymus at the positive selection stage, but its biological functions in this context are unknown. THEMIS is a signaling protein essential for T lymphocyte development and maintenance of CD8⁺ T lymphocytes in peripheral tissues. Deletion of the gene encoding THEMIS is associated with a defect in positive selection of thymocytes and lymphopenia. THEMIS promotes positive selection and maintenance of CD8⁺ T lymphocytes by inhibiting the catalytic activity of SHP-1.

We hypothesized that THEMIS may promote positive selection and maintenance of CD8⁺ T lymphocytes by repressing the inhibitory functions of BTLA. We have shown that deletion of the gene encoding THEMIS in mouse models increases BTLA's ability to inhibit activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. THEMIS is recruited to BTLA and represses SHP-1 phosphatase activity by increasing oxidation of its catalytic cysteine. Deficiency in THEMIS, however, has no effect on the inhibitory functions of the immune checkpoint PD-1, which primarily depends on the tyrosine phosphatase SHP-2. We show that deletion of the gene encoding BTLA restores positive selection in THEMIS-deficient mice, indicating that THEMIS promotes positive selection by blocking BTLA's inhibitory signaling. THEMIS also promotes maintenance of peripheral CD8⁺ T lymphocytes by reducing BTLA's ability to inhibit survival signals triggered by IL-2 and IL-15 receptors. These results suggest that inhibitory signals triggered by immune checkpoints depend on interactions with their ligands but are also constrained by intracellular proteins that modulate the threshold at which these receptors are able to inhibit T lymphocytes. These findings have implications for understanding the therapeutic mechanisms involved in cancer treatment and the mechanisms underlying the emergence of autoimmune diseases.

Table des matières

Liste des abréviations.....	9
I. Développement des lymphocytes T dans le thymus	13
A. Le récepteur des lymphocytes T (TCR).....	13
1. Les réarrangements du TCR	14
2. Les chaînes du CD3	15
B. La sélection positive	17
C. Lignage des lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺	19
1. Le modèle d'instruction.....	21
2. Le modèle stochastique	21
3. Le modèle cinétique	21
4. Le modèle intégratif	21
D. La sélection négative	24
II. Activation et différenciation des lymphocytes T	27
A. La différenciation des LT CD4 ⁺	27
1. Les sous-populations effectrices de lymphocytes Th1, Th2 et Th17.....	27
2. La plasticité des sous populations effectrices	32
3. Les lymphocytes T régulateurs	33
4. Les lymphocytes T helper folliculaires.....	35
B. La différenciation des LT CD8 ⁺	36
III. Le devenir des lymphocytes T : maintien naïf et mémoire	37
A. Les lymphocytes T mémoires	37
B. Maintien homéostatique des lymphocytes T.....	39
C. Epuisement des lymphocytes T	44
IV. Signalisation du TCR	48
A. Signalisation TCR proximale	48
1. La SRC kinase Lck	49
2. ZAP-70 et LAT	50
3. SLP-76	51
B. Signalisation TCR distale.....	52
1. La voie calcique	52
2. La voie Ras/MAPK.....	53
3. La voie PKC θ -NF κ B.....	53

4. Les voie JNK et p38.....	55
C. Régulation de la signalisation du TCR : SHP-1 et SHP-2	56
V. Co-récepteurs inhibiteurs	60
A. Régulation de la signalisation TCR par les récepteurs co-modulateurs.....	60
B. Le récepteur BTLA	63
1. La structure de BTLA.....	63
2. BTLA dans les réponses physiologiques et pathologiques.....	63
3. Les ligands de BTLA : HVEM	65
C. Le récepteur PD-1.....	67
VI. THEMIS	69
A. THEMIS dans le développement thymique.....	71
B. THEMIS : Sélection positive ou négative ?	72
C. Rôle de THEMIS à la périphérie	74
Objectif : Analyser les effets de THEMIS sur la signalisation inhibitrice de BTLA et PD-1	78
Résultats	79
Discussion	102
I. Relevance physiologique de l'axe THEMIS-BTLA	103
A. L'axe THEMIS-BTLA dans le développement thymique	103
B. L'axe THEMIS-BTLA dans le contrôle de l'homéostasie des lymphocytes T périphériques	106
1. THEMIS favorise-t-il le maintien des lymphocytes T CD8 ⁺ en stimulant la signalisation du TCR et celle induite par l'IL-2 et l'IL-15 ?	106
2. BTLA, un récepteur inhibiteur impliqué dans le contrôle de l'homéostasie des lymphocytes T CD8 ⁺	108
II. Mécanisme moléculaire	109
A. THEMIS et Grb2 dans le signalosome LAT.....	109
B. Mécanisme du recrutement de THEMIS à BTLA	110
C. THEMIS et SHP-1.....	112
III. Transposition des résultats à d'autres contextes physiologiques et physiopathologiques et à d'autres récepteurs inhibiteurs	115
A. Contexte physiopathologique	115
B. Au-delà de BTLA : réguler les récepteurs inhibiteurs.....	119
C. THEMIS-BTLA dans les lymphocytes B	121
D. THEMIS-BTLA chez l'Homme	122
Conclusion et perspectives	124

Portfolio.....	126
Remerciements	128
Bibliographie.....	131
Annexes	159

Liste des abréviations

AIRE: Auto-immune Regulator
AP-1: Activator Protein 1
BTLA: B and T Lymphocyte Attenuator
CD: Cluster of Differentiation
CDR: Complementarity-determining region
CFA : Complete Freund Adjuvant
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA: Cellule présentatrice d'antigène
CCL: Ligand de Chimiokine C-C
CCR: Récepteur de Chimiokine C-C
CSK: Non-receptor tyrosine-protein kinase
cTEC: Cortical Thymic Epithelial Cell
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CXCR : C-X-C Chemokine Receptor
DC: Dendritic Cell
DN: Double négatif
DP: Double Positif
EAE : Experimental Auto-immune Encephalomyelitis
EOMES : Eomesodermin
EpCAM: Epithelial Cellular Adhesion Molecule
ER : Réticulum Endoplasmique
ERK: Extracellular signal-regulated kinases
Foxp3: Forkhead Box P3
GATA3: GATA3 binding protein
GC : Centre Germinatif
Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2
HVEM: Herpes Virus Entry Mediator
IBD: Inflammatory Bowel Disease
ICOS: Inducible costimulator

IFN γ : interferon gamma

IL : Interleukine

IP₃ : Inositol triphosphate

ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

ITSM: Immunoreceptor tyrosine-based switch motif

JNK: Jun N-terminal Kinase

KLRG1: Killer cell Lectin-like Receptor G1

LAG-3: Lymphocyte-activation gene 3

LAT: Linker for Activation of T cells

LB: Lymphocyte B

Lck: Lymphocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase

LCMV: Lymphocytic Choriomeningitis Virus

LIGHT: Lymphotoxin-like, exhibits Inducible expression and competes with HSV Glycoprotein D for binding to Herpesvirus entry mediator

LIP: Lymphopenia Induced Proliferation

LT: Lymphocyte T

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MEK: Mitogen-activated Extracellular signal-regulated Kinase

MOG: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

mTEC: Medullary Thymic Epithelial Cell

NF κ B: Nuclear factor kappa B

NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells

NK: Natural Killer

Nur77/NR4A1: Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 1

PD-1: Programmed cell Death protein 1

PD-L1: Programmed cell Death Ligand 1

PLC γ 1: Phospholipase C gamma 1

PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate

PTK: Protein Tyrosine Kinases

PTP: Protein Tyrosine Phosphatase

RANK: Receptor Activator of Nuclear factor- κ B

Ras: Rat Sarcoma

ROR γ T: RAR-related orphan receptor gamma

ROS: Reactive Oxygen Species

RUNX: Runt-related transcription factor

SLP-76: SRC homology 2 (SH2)-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa

SOS1: Son of Sevenless homolog 1

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

T-bet: T-box expressed in T cells

TCF1: T-cell Factor 1

T_{CM}: Lymphocyte T central mémoire

TCR: T-cell Receptor

T_{EM}: Lymphocyte T effecteur mémoire

T_{EX}: Lymphocyte T épuisé

Tfh: Lymphocyte T Helper Folliculaire

TGF β : Transforming growth factor beta

Th: Lymphocyte T Helper

ThPOK: T-helper-inducing POZ/Krueppel-like factor

TIGIT: T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

TIM-3: T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3

TNC: Thymic Nurse Cell

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TOX: Thymocyte selection-associated HMG BOX

TRA: Tissue Restricted Antigen

Treg: Lymphocyte T régulateur

T_{RM}: Lymphocyte T résident mémoire

TSSP: Thymus-Specific Serine Peptidase

VAV1: Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1

ZAP-70: Zeta-associated protein 70

Introduction

I. Développement des lymphocytes T dans le thymus

Avant d'être opérationnels, les lymphocytes T doivent suivre une série de processus de développement et de maturation dans le thymus, dont les différentes étapes sont caractérisées par l'expression de marqueurs de surface cellulaire tels que CD4, CD8, et les marqueurs d'activation CD44 et CD25. Les progéniteurs venant de la moelle osseuse n'expriment ni CD4, ni CD8, et sont désignés comme double négatifs (DN). Ils migrent vers la jonction cortico-médullaire (JCM) thymique, puis se déplacent vers le cortex pour devenir des thymocytes DN1 (CD44⁺/CD25⁻) et DN2 (CD44⁺/CD25⁺). Les thymocytes entre les stades DN1 et DN2 sont capable de se différencier en cellules Natural killer (NK) et en cellule dendritic (DC). Ils migrent ensuite vers la zone subcapsulaire durant la phase DN3 (CD44⁻/CD25⁺) et DN4 (CD44⁻/CD25⁻). À ce stade se produisent des réarrangements des chaînes du récepteur des lymphocytes T (TCR) : β , γ et δ déterminant la formation du lignage des lymphocytes T α/β et γ/δ . Ils se dirigent ensuite vers la zone corticale du thymus et se différencient en cellules doubles positives (DP) exprimant les récepteurs CD4 et CD8 (CD44⁻/CD25⁻). C'est à ce stade que se déroulent les réarrangements du locus α du TCR, ainsi que des processus de sélection positive et négative basés sur une force du signal TCR dépendante de l'affinité du TCR pour les peptides du soi présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules épithéliales thymiques. Ces signaux permettent la survie des thymocytes à l'issue de la reconnaissance d'un peptide du soi par un TCR d'affinité suffisante durant la sélection positive. Une sélection négative visant à éliminer les cellules auto-réactives se poursuit dans la zone médullaire. Parmi ces cellules, moins de 5% sont sélectionnées pour devenir simple positives (SP) CD4⁺ ou CD8⁺.

A. Le récepteur des lymphocytes T (TCR)

Les TCR sont localisés à la surface des lymphocytes T et reconnaissent les antigènes peptidiques associés au CMH-peptide à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Les TCR sont formés de deux chaînes alpha et beta, ou gamma et delta. Les TCR comprenant les chaînes alpha et beta sont appelés TCR α/β et sont exprimés à la surface Les TCR comprenant les chaînes gamma et delta sont ainsi appelés TCR γ/δ et sont exprimés à la surface des lymphocytes T γ/δ , des lymphocytes T non-conventionnels différents des

lymphocytes T exprimant des TCR α/β . Les chaînes α , β , γ et δ sont divisées en régions constantes, variables, charnières et d'une courte chaîne transmembranaires (Figure 1A)¹. Dans le cas des TCR α/β , la maturation des lymphocytes double négatifs $CD4^-CD8^-$ en double positifs $CD4^+CD8^+$ dans le thymus est déterminée par des réarrangements de la chaîne β , formant un complexe pré-TCR. Le réarrangement de la chaîne α , plus tardif, résulte en un complexe TCR et promeut la maturation des lymphocytes en simple positifs $CD4^+$ ou $CD8^+$. Ces complexes induisent un signal d'activation cellulaire après reconnaissance d'un antigène du soi, et modulent les processus de sélection positive et négative.

1. *Les réarrangements du TCR*

Les exons codant pour les régions variables du TCR sont assemblés à partir de segments V (variable), D (diversity) et J (joining). Le réarrangement V(D)J est essentiel au développement d'un répertoire diversifié de TCR, ayant des affinités variables pour différents complexes CMH-peptide. Ils sont régulés selon le stade de développement des thymocytes. Les exons de la zone variable des chaînes β et δ sont assemblés à partir des segments V, D et J tandis que les exons de la zone variable des chaînes α et γ sont assemblés à partir des segments V et J. La recombinaison V(D) J se produit entre des segments appariés à des séquences conservées RS (recombination signal). Les lymphocytes DN sont capables de produire des cellules exprimant des TCR γ/δ ou des TCR α/β , constituant la plupart (environ 95%) des thymocytes rencontrés dans le thymus ². Lorsque les thymocytes entrent dans la phase DN3, l'expression de gènes *RAG* (Recombination activating gene) produisant les protéines RAG1 et RAG2 est augmentée, provoquant une recombinaison des gènes formant la chaîne β ³⁴ par des nucléases. Il y a d'abord formation des segments $D\beta$ $J\beta$ avant que ceux-ci s'assemblent avec le segment $V\beta$. Chez l'Homme, le TCR β comprend ainsi 42 segments de gènes $V\beta$, 2 segments de gènes $D\beta$ et 12 segments $J\beta$ tandis que chez la souris, il existe 35 segments $V\beta$, 2 segments $D\beta$ et 12 segments $J\beta$ ⁵. Au sein du segment de gènes V, il y a trois « Complementarity-determining region » (CDR) assurant la diversité clonale des TCR. CDR1 et CDR2 sont issues du réarrangement des segments V, tandis que CDR3 résulte de l'assemblage des segments V, D et J, ainsi que de l'ajout de nucléotides aux jonctions entre les segments VDJ par les TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) ^{6,7} (Figure 1B). Ces régions CDR3 correspondent au site de reconnaissance des complexes CMH-peptide, et jouent donc un rôle essentiel dans la

détermination de la diversité clonale des TCR. Suite à ces réarrangements, l'expression de RAG diminue et les chaînes β sont associées à un précurseur invariant du TCR α (pTCR α) ainsi qu'à un complexe CD3/ ζ . Cette association conduit à la formation d'un pré-TCR, qui est capable d'induire des indépendamment de l'interaction avec des ligands CMH-peptide. Ces signaux permettent aux cellules de survivre jusqu'au stade DN4, et d'exprimer à leur surface consécutivement les co-récepteurs CD8 et CD4. Au stade DP il y a de nouveau une augmentation de l'expression des protéines RAG, permettant le réarrangement de gènes ciblant le locus de la chaîne α , plus précisément $V\alpha$ et $J\alpha$. Une fois la chaîne α assemblée et exprimée à la surface des thymocytes, le pTCR α cesse d'être exprimé, résultant en un TCR fonctionnel $\alpha\beta^{\text{low}}$. Cette grande diversité de TCR peut atteindre 10^{12} - 10^{15} différents clones. Les sélections positives et négatives réduisent ensuite ce nombre à environ 2×10^6 TCRs différents chez la souris pour 2×10^7 chez l'Homme. Cependant, chaque cellule n'exprime qu'un unique clone de son TCR. L'absence de diversité dans l'expression du TCR à la surface est provoquée par un phénomène exclusion allélique. La régulation de l'expression des clones fonctionne de différentes manières dans le cas du TCR β ou du TCR α mais lorsqu'un premier clone est exprimé, il y a une boucle de rétrocontrôle inhibant l'expression des autres allèles ⁸.

2. Les chaînes du CD3

Les chaînes du TCR sont associées de manière non covalente à plusieurs groupes de chaînes CD3 : les dimères CD3 $\epsilon\delta$, CD3 $\epsilon\gamma$, et CD3 $\zeta\zeta$. Cette association forme le complexe TCR-CD3. Ces chaînes du CD3 contiennent, contrairement aux chaînes du TCR, de larges régions cytoplasmiques comprenant des motifs de transduction du signal, initiant la signalisation du TCR après sa reconnaissance d'un complexe CMH-peptide. Parmi ces motifs se trouvent les ITAM (Motifs d'activation des immunorécepteurs basé sur des tyrosines), présents sur chaque chaîne de CD3 (Figure 1A). Les chaînes α et β ne contiennent pas de motifs de transduction du signal, et sont consacrées à la reconnaissance du CMH-peptide. À l'inverse, les chaînes CD3 ϵ , δ et γ contiennent chacune un motif ITAM, et les chaînes CD3 ζ en contiennent trois, formant un total de dix ITAM sur le complexe TCR-CD3 (Figure 1A). La transduction du signal est assurée par la phosphorylation de ces motifs ITAM. Cette phosphorylation est provoquée par des protéines de la signalisation proximale du TCR¹.

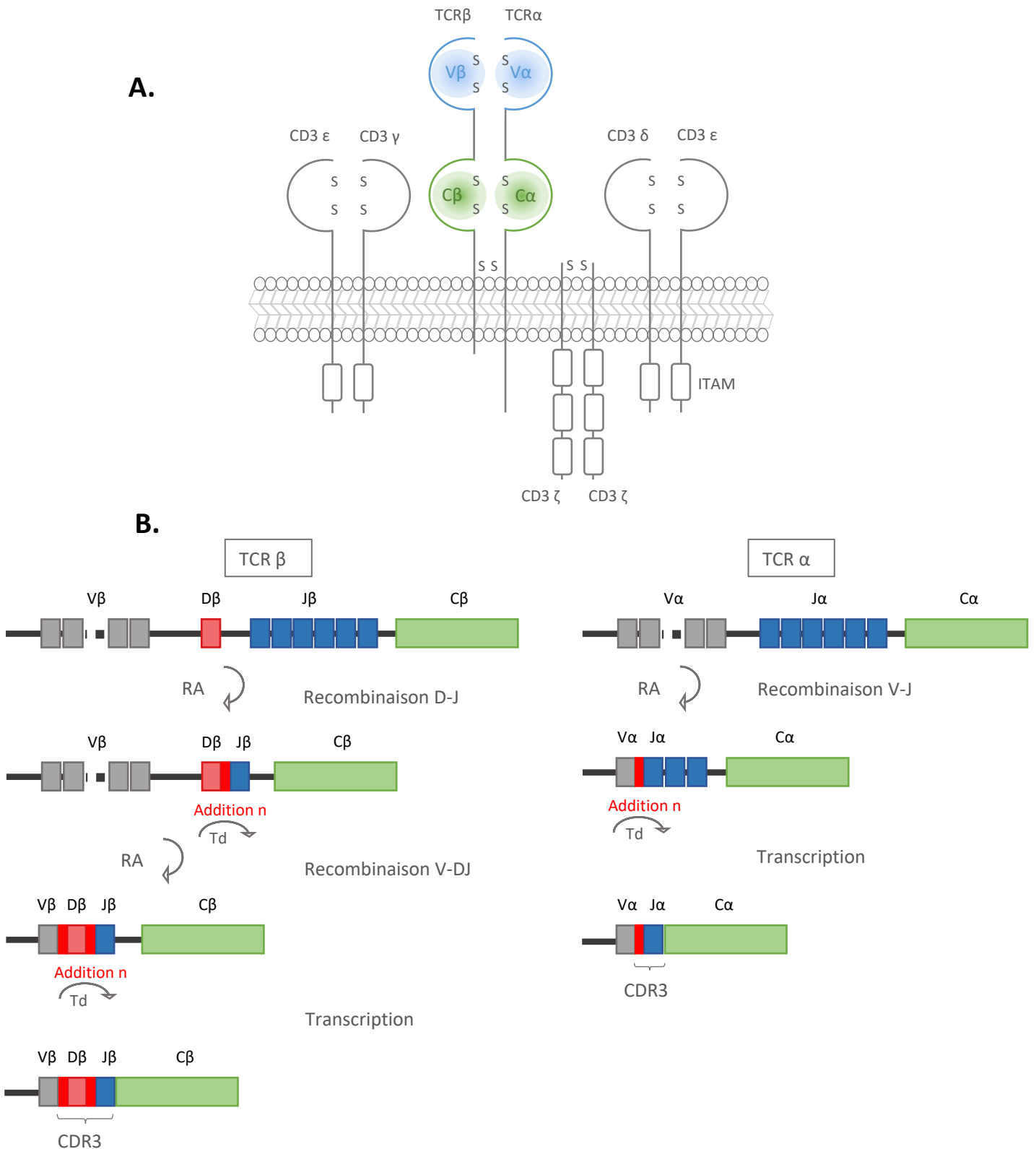


Figure 1. Formation du TCR (A.) Structure des chaînes du TCR et du complexe CD3, composé de deux chaînes ϵ , deux chaînes ζ , une chaîne δ et une chaîne γ . Les chaînes du TCR β et α sont organisées en deux régions constantes et deux régions variables connectées entre elles par des ponts disulfures (B.) Réarrangement des TCR β/α par recombinaison des segments V(D)J.

La diversité des ITAM et leur présence sur toutes les chaînes CD3 est essentiel à la signalisation du TCR, et ils partagent une séquence homologue (YxxL/ I-X6-8-YXXL/I). Chaque ITAM est cependant formé d'une séquence d'acides aminés distincte, leur permettant de s'associer aux protéines de la signalisation du TCR à des degrés différents⁹. Les ITAM ne sont pas les seuls motifs exprimés sur la région intracellulaire des chaînes CD3. Par exemple, la chaîne CD3 ϵ contient un motif BRS (Basic Rich Stretch) dont une partie permet l'association de résidus phosphoinositides nécessaire à la signalisation du TCR¹⁰. Un motif à la fonction similaire se trouve sur la chaîne CD3 ζ , permettant l'accumulation des CD3 ζ à la synapse immunologique¹¹.

B. La sélection positive

Un système immunitaire fonctionnel nécessite que les lymphocytes T expriment des TCR capables de reconnaître les complexes CMH-peptide du soi avec une affinité suffisamment faible pour ne pas induire le développement de pathologies auto-immunes. Ces lymphocytes doivent cependant pouvoir reconnaître des peptides du non-soi pour permettre la protection de l'organisme contre les pathogènes. La reconnaissance par les cellules DP des complexes CMH-peptide exprimés par les cTEC peut, si elle est suffisamment faible, induire un signal de survie qui permet aux thymocytes de continuer leur développement. La sélection positive, se déroulant dans le cortex, vise à sélectionner les cellules à TCR de faible affinité. Les cellules non sélectionnées à ce stade, faute de remaniements génétiques inopérant et d'un signal TCR insuffisant, meurent par négligence. Environ 90% des thymocytes DP ne franchissent pas la sélection positive et meurent par négligence^{12 13}. Dans le cas des 10% restants, les cellules interagissent avec un antigène du soi présenté par le CMH des cTEC (Figure 2). La signalisation induite par les chaînes CD3 est indispensable pour la sélection thymique. En effet, des souris exprimant une version tronquée, n'exprimant qu'une séquence de l'ITAM de chacune des chaînes CD3, présentent un défaut de développement thymique avec une augmentation du nombre de cellules DN et une diminution de celui des cellules DP et SP¹⁴. Chez les SP CD4⁺ de ces souris, la modification des ITAM de la plupart des chaînes CD3 est associée à une diminution de l'expression du TCR, ainsi que du signal TCR, représenté par l'expression de Nur77. Chez les SP CD8⁺, l'expression de Nur77 est diminuée chez les souris avec des ITAM mutés sur les chaînes ϵ , δ et γ , mais pas les ITAM des chaînes ζ . L'expression du récepteur

nucléaire Nur77 dans les thymocytes et plus généralement dans les lymphocytes T et B, est directement liée à la force du signal TCR ou BCR et concorde également avec l'expression du marqueur d'activation CD69. Son expression augmente après stimulation des cellules par un antigène spécifique¹⁵. Ceci suggère que chaque unité CD3 est nécessaire pour la maturation des thymocytes, mais que ces chaînes ont des rôles différents. Il a été montré que la chaîne CD3 ζ occupe également un rôle prépondérant dans la sélection positive. L'absence de ses motifs activateurs cytoplasmiques ITAM entraîne une baisse de développement de CD4⁺ et CD8⁺, visible dans le thymus et à la périphérie¹⁶. Cependant, d'autres études montrent à l'inverse qu'une mutation invalidant la fonction des ITAM de la chaîne CD3 ζ n'a pas d'impact sur l'activation des thymocytes, et des fonctions effectrices associées aux lymphocytes T CD8⁺ matures¹⁷. CD3 ϵ promeut l'activation de ZAP-70 et ERK, deux éléments essentiels de la signalisation TCR¹⁸. L'association de la membrane plasmique avec la queue cytoplasmique de la chaîne CD3 ϵ est capitale pour la sélection positive : la mutation de la région cytoplasmique de CD3 ϵ , empêchant son association à la membrane, chez les thymocytes entraîne un défaut de SP CD4⁺ et CD8⁺. Ces thymocytes présentent une expression affaiblie du TCR et ne peuvent pas devenir des thymocytes matures. L'absence de CD3 δ mène à un défaut de développement des lymphocytes T α/β , particulièrement durant le passage du stade DP au stade SP¹⁹. Les deux chaînes CD3 γ et δ jouent un rôle dans la régulation de l'expression du TCR à la surface²⁰.

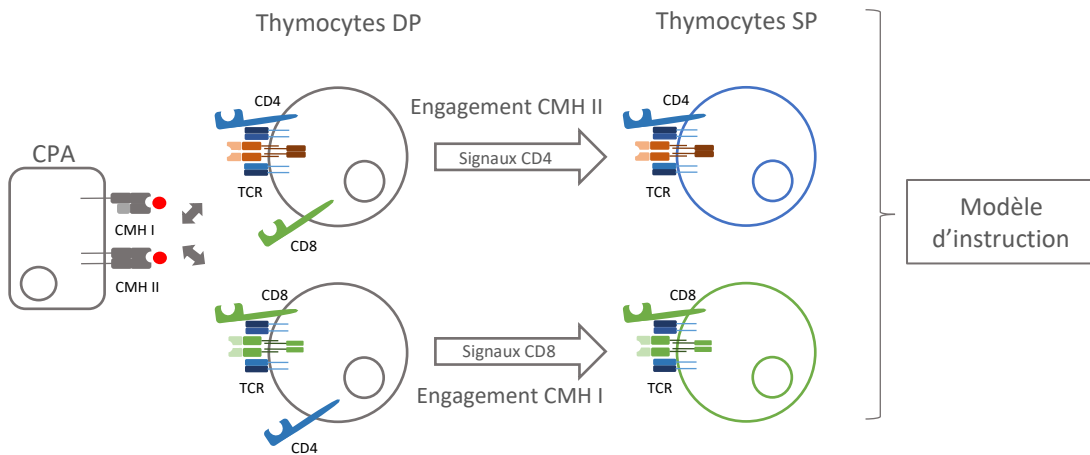
Les cTEC sont identifiables par l'expression de la Cytokératine 8, EpCAM, Ly51, CD205, ainsi que les CMH de classe I et II. Ils sont organisés en complexes multicellulaires réticulaires appelés « nurse-cells » du thymus (TNC), pouvant interagir avec plus de 20 thymocytes simultanément. La spécificité des cTEC à présenter des ligands de faible affinité est en partie dû à un mécanisme de présentation d'antigène particulier^{21 22}. En effet, comme pour la plupart des antigènes présentés dans le thymus, ceux présentés par les cTEC résultent de macro-autophagie, et subissent un processus de lyse par le protéasome avant d'être associés aux CMH I et II. Ce protéasome contient généralement 14 sous-unités α et 14 sous-unités β . Dans le cas des peptides présentés par le CMH I, les cTEC expriment une sous unité catalytique, β 5t (ou PSMB11) dans le protéasome, de manière alternative aux autres formes de cette sous unité présente dans les cellules immunitaires comme la β 5i, créant ce qu'on appelle un thymoprotéasome²³. Un thymoprotéasome non fonctionnel chez la souris entraîne une déficience du développement des CD8. La force du signal TCR peut être évaluée en étudiant

l'expression du co-récepteur CD5, à l'instar de Nur77. CD5 est un récepteur membranaire dont l'expression augmente dans les thymocytes au cours de la sélection positive. Il induit la diminution d'acteurs importants de la signalisation TCR comme ERK, SLP-76 ou le flux calcique. Le niveau d'intensité du signal TCR influence son expression, particulièrement l'activité des motifs activateurs ITAM de la chaîne ζ . Comme Nur77, CD5 est induit plus fortement chez les cellules présentant un TCR spécifique^{24,25}. Une déficience en $\beta 5t$ chez la souris entraîne une augmentation de cellules exprimant de forts niveaux de CD5 et Nur77 comparé aux souris sauvages. Les peptides générés par le thymoprotéasome des cTEC semblent donc promouvoir la sélection de cellules CD5^{low} associées à un faible signal TCR²⁶. Ces travaux suggèrent que la sélection de cellules exprimant des TCR de faible affinité pour les complexes du soi CMH-peptide contribue à former une population clonale de TCR diversifiée réduisant les risques de développement de réactions auto-immunes. Dans le cas d'une présentation par le CMH II, les cTEC expriment plusieurs protéases dont la Cathepsine L1, et la TSSP, dont la déficience entraîne un défaut de développement des LT CD4²⁷.

C. Lignage des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺

Les thymocytes DP issus de la sélection positive sont dirigés vers une différenciation en cellules exprimant uniquement les co-récepteurs CD4⁺ ou CD8⁺ reconnaissant respectivement des CMH de classe II et CMH de classe I. Le CMH I est généralement associé au mécanisme de défense visant des infections intracellulaires tandis que le CMH II est associé au mécanisme de défense ciblant les infections extracellulaires²⁸. La coopération entre le TCR et les co-récepteurs CD4 ou CD8 joue un rôle déterminant dans la signalisation TCR. À l'issue de la reconnaissance de l'antigène par le TCR, il y a un recrutement de la tyrosine kinase spécifique des LT (Lck) au groupe CD3, ainsi qu'une association avec la queue cytoplasmique du CD4 ou du CD8²⁹. Lck phosphoryle les motifs ITAMs de CD3 ζ , permettant le recrutement de ZAP70 à la chaîne ζ et aux ITAM de CD3, qui est ensuite activé par Lck. L'activation de ZAP-70 conduit au déclenchement de voies de signalisation, tels que flux calcique Ca²⁺ menant à la translocation du facteur NFAT dans le noyau et la voie des MAPK, permettant la maturation du thymocyte³⁰. Le mécanisme responsable du choix de lignage CD4 ou CD8 a fait l'objet de nombreuses théories, et les recherches ont dégagé plusieurs modèles, dont les modèles d'instruction et modèle stochastique.

A.



B.

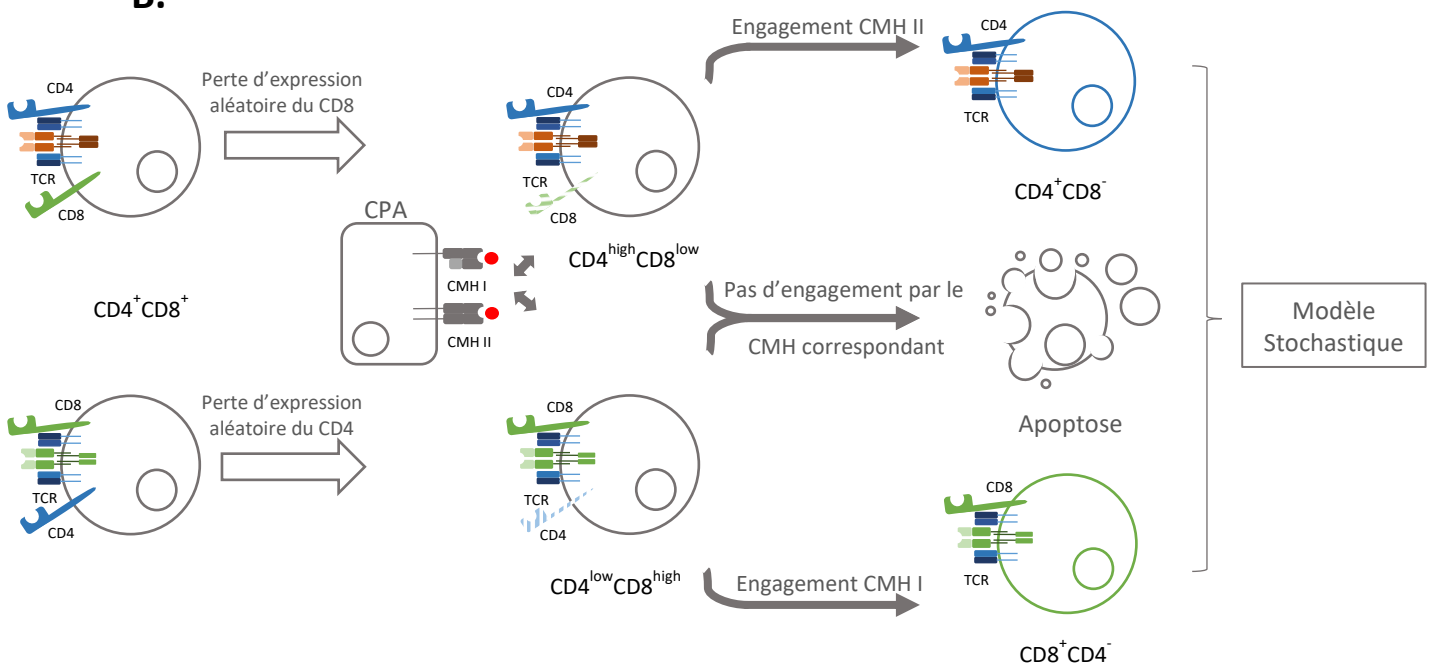


Figure 2. Lignage des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (A.) Modèle d'instruction : L'interaction du co-récepteur CD4 ou CD8 avec le CMH correspondant induit des signaux menant à l'expression simple positive du CD4 ou du CD8 (B.) Modèle stochastique : Perte d'expression aléatoire du CD4 ou du CD8. Le thymocyte nécessite alors un engagement avec le CMH correspondant afin d'induire des signaux de survie

1. *Le modèle d'instruction*

Le modèle d'instruction indique que la reconnaissance des CMH de classe I ou II par les TCR et les co-récepteurs correspondant mène à une signalisation bloquant l'expression des co-récepteurs CD4 ou CD8 respectivement (Figure 2A).

2. *Le modèle stochastique*

Le modèle stochastique quant à lui décrit une délétion aléatoire de l'un ou l'autre co-récepteur. La cellule est ensuite sélectionnée et seule l'association conjointe d'un co-récepteur et d'un TCR ayant une spécificité au CMH présentant l'antigène permet à la cellule de se différencier dans le lignage correspondant à la restriction des TCR pour le CMH de type I ou II ²⁸ (Figure 2B). Différents résultats ont corroboré l'un ou l'autre modèle. Par exemple, une étude phénotypique dévoile une perte graduelle d'expression de CD4 et de CD8 au lieu d'une perte drastique d'expression de co-récepteur, décrivant des populations intermédiaires CD4^{int}CD8^{high} qui se différencient en SP CD8⁺ même en absence de CMH de classe I, et de même concernant les thymocytes CD4^{high}CD8^{int} en absence de CMH de classe II ³¹.

3. *Le modèle cinétique*

Un autre modèle expliquant le choix de lignage CD4/CD8 est appelé le modèle cinétique. Ce modèle est basé sur la durée du signal TCR, qui serait détectée par des cytokine à chaîne γ comme l'IL-7 ³². Une étape de la sélection a été observée avec des thymocytes exprimant un CD4 mais pas de CD8, peu importe le type de CMH présenté au TCR. Ces thymocytes peuvent ensuite malgré tout être différenciés en CD8⁺ avec l'ajout d'IL-7. La transcription du CD4 est alors interrompue au profit de celle du CD8. Cependant cette inversion de co-récepteur peut être empêchée par une nouvelle stimulation TCR ³³. Il s'avère donc que la capacité du TCR à induire un signal persistant en absence du CD8 détermine si le thymocyte continue sa différenciation en CD4⁺, ou subit une inversion et se différencie à la place en CD8⁺.

4. *Le modèle intégratif*

Des recherches plus récentes étudiant les populations en temps réel au cours du développement T suggèrent un dernier modèle dit par « défaut » indiquant qu'en absence de signal TCR, les DP se différencient d'abord en CD4 par défaut, puis la présence d'un CMH de

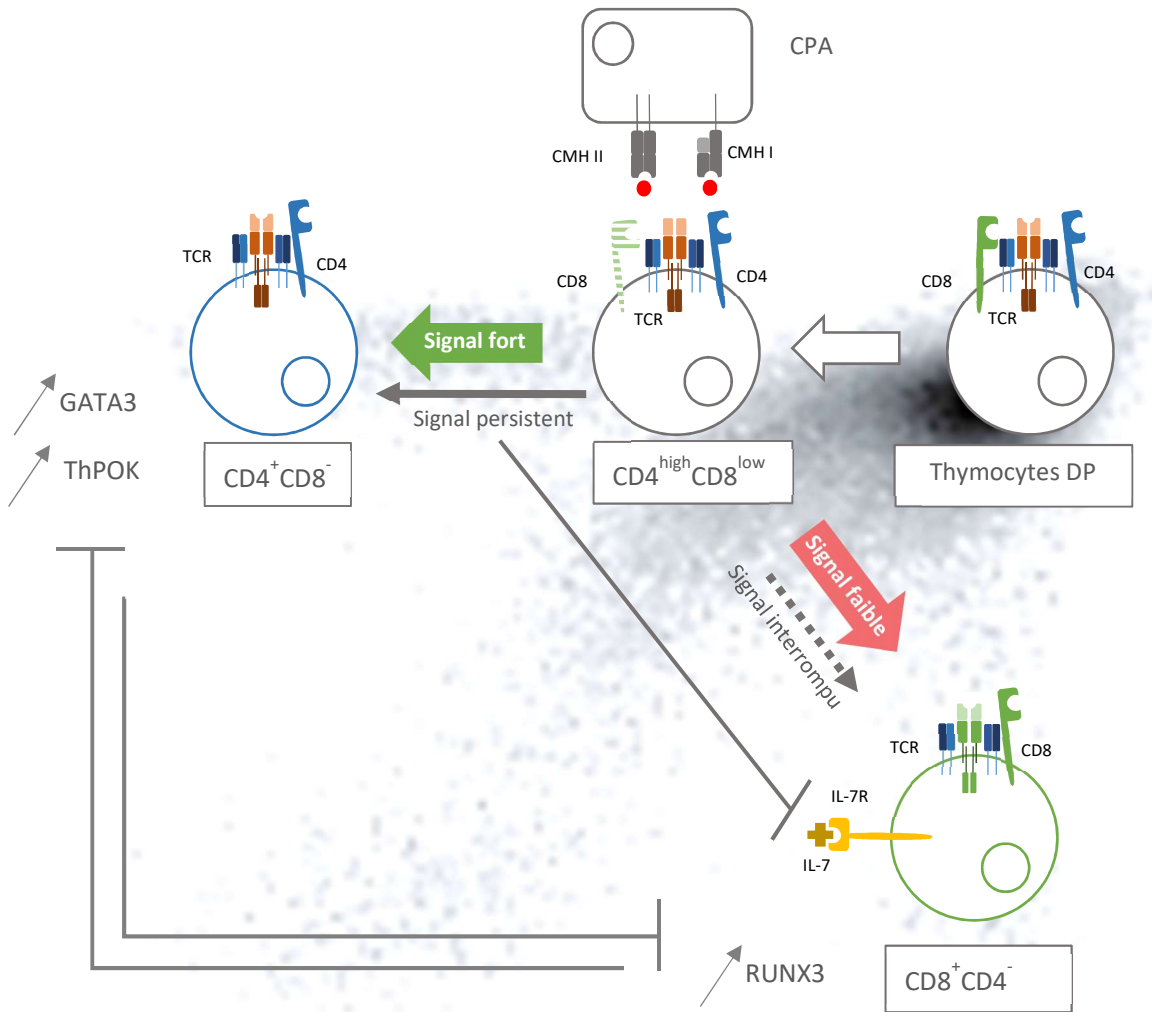


Figure 3. Lignage des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ basé sur la durée du signal TCR. Un signal faible et interrompu induit une différenciation en LT CD8⁺. Cette différenciation est favorisée par des signaux issus du récepteur à l'IL-7. Des signaux du TCR forts et persistants induisent une différenciation en LT CD4⁺ et ces signaux inhibent l'induction de signaux IL-7. Ces différenciations sont associées à l'expression de facteurs de transcription, RUNX3 dans les LT CD8⁺ et GATA3 et ThPOK dans les LT CD4⁺, réprimant mutuellement leur expression (*Adapté de Singer et al. 2008*).

classe I permet un lignage CD8⁺. Il a également été montré que les DP passe par une phase de perte d'expression des deux co-récepteurs, puis réexpriment progressivement d'abord CD4 puis CD8, menant à des sous population CD4^{int}CD8^{int}, de manière indépendante à la spécificité au CMH I ou CMH II^{34,35}. Ces découvertes s'accordent avec le modèle plus complexe désormais principalement retenu, basé la durée du signal issu de la reconnaissance de l'antigène par le TCR et les co-récepteurs. Il semble que ces signaux ont un rôle prédominant comparé à la spécificité du TCR au CMH I ou CMH II. Différents degrés de stimulation de thymocytes DP pré-sélection, ont mené sélectivement à la différenciation en cellule SP CD4 ou SP CD8. Des signaux forts associés à une longue durée de stimulation aboutissent à un lignage CD4 tandis que des signaux faibles et brefs aboutissent à un lignage CD8. Des expériences indiquent que la co-agrégation du TCR avec un co-récepteur CD4 produit des signaux forts, un fort recrutement de Lck et une différenciation des cellules DP en cellules SP-CD4. En revanche, l'agrégation de deux TCR induit des signaux plus faibles avec un recrutement de Lck moindre, et mène à une différenciation en SP CD8³⁶. De plus un plus fort recrutement de Lck a été observé chez les CD4 comparé aux CD8, et un thymocyte est capable de se différencier en SP CD4 en cas de forte stimulation issue de l'association d'un CD8³⁷. Des résultats similaires ont été observés en exposant pendant différentes durées des ligands à des thymocytes possédant des TCR transgéniques spécifiques. Une longue durée de stimulation favorise un lignage CD4 et une courte durée à un lignage CD8³⁸ (Figure 3).

Ces signaux sont associés à des voies de signalisation spécifiques. La voie MAPK semble déterminante pour la décision du lignage CD4/CD8. Un transgène de *Mapk1* favorise un lignage CD4, et à l'inverse un blocage de la protéine MAPK1 favorise un lignage CD8. Il est également suggéré que MAPK1 prolonge le signal TCR en retardant l'activité inhibitrice de SHP-1, permettant une différenciation en SP CD4, au lieu de la différenciation « par défaut » en SP CD8 se déroulant dès que le signal est suffisamment fort pour outrepasser la sélection positive^{39,40}. Comme abordé précédemment, l'IL-7 peut avoir un rôle de senseur de la durée du signal TCR. Un signal TCR fort et persistant induit une inhibition de la signalisation des récepteurs de l'IL-7 (IL-7R) et il est admis que l'IL-7 joue un rôle dans la survie des cellules en absence de signal TCR. En plus d'induire un lignage CD8 en inhibant la transcription du gène associé à CD4 (le blocage de l'interaction entre l'IL-7R et l'IL-7 restaure un lignage CD4), l'IL-7 induit l'expression du récepteur de glucose GLUT1, qui n'est exprimé qu'à la surface des SP

CD8 chez les thymocytes ^{32,41}. D'autre part plusieurs facteurs de transcription jouent un rôle important dans le lignage CD4/CD8. L'expression du facteur GATA3 ainsi que celle de ThPOK, exprimé principalement dans les CD4, est induite lors d'une signalisation forte et persistante d'un TCR spécifique du CMH II menant à l'inhibition du lignage CD8, empêchant l'inhibition de l'expression du gène *Cd4* et favorisant un lignage CD4 chez les sous populations intermédiaires CD4⁺CD8^{low} ⁴². À l'inverse, en cas de TCR spécifique du CMH I chez les CD4⁺CD8^{low}, il y a une diminution de l'expression de GATA3 et de ThPOK. Le signal TCR est bref, permettant une signalisation issue de l'IL-7R. Enfin, le facteur RUNX3 est nécessaire au développement et la fonction des LT CD8⁺, et des souris RUNX3 KO présentent un défaut de SP-CD8 dans le thymus et la rate. Les SP-CD8 issus de ces souris sont moins cytotoxiques et forment moins de conjugués avec des cellules cibles. Les signaux issus de l'IL-7R induisent une augmentation du facteur de transcription RUNX3, qui agit en bloquant l'expression de ThPOK ainsi que celle du CD4. La présence d'IL-7 mène ainsi à une différenciation en SP-CD8 ⁴³.

D. La sélection négative

Le processus de sélection négative se déroule principalement après migration des cellules dans la zone médullaire thymique où sont localisées cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC). Cette migration nécessite l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR7 à la surface des thymocytes et l'expression à la surface des mTEC des ligands de CCR7 : CCL19 et CCL21 ⁴⁴. Les mTEC sont identifiables par l'expression à leur surface de la Cytokératine 5, CD326, CD80 et le CMH II. La population peut être séparée en deux catégories mTEC^{high} et mTEC^{low} selon les niveaux d'expression des récepteurs CD80 et CMH II ⁴⁵. Le signal induisant une sélection négative est induit par des TCR de forte affinité pour les complexes soi-CMH conduisant à l'activation des voies Grb2/SOS1. Par exemple, la protéine VAV1 nécessaire pour la transduction du signal TCR est fortement impliquée dans le processus de sélection négative. Elle régule plusieurs acteurs de la signalisation comme PLCγ1 et sa présence est requise pour la sélection positive et négative. En effet, en absence de VAV1, la délétion des thymocytes CMH-peptide spécifiques est diminuée. VAV1 active les voies JNK ainsi que le flux calcique ⁴⁶, il y a ainsi après présentation des peptides du soi CMH-peptide une stimulation courte et forte de ERK, de même que JNK et p38. Les cellules CD4⁺ et CD8⁺ interagissent avec les antigènes présentés par les mTECs, ainsi que les cellules dendritiques locales. Les mTEC expriment de nombreux antigènes spécifiques des tissus (TRA : Tissue Restricted Antigen), qui peuvent être

capturés et présentés à leur tour par les cellules dendritiques dans le thymus. Un large panel de TRA est présenté aux thymocytes et permet une élimination des lymphocytes auto-réactifs⁴⁷ (Figure 2). L'expression des TRAs dans les mTECs est associée à la diversité des tissus dans lesquels ils sont exprimés, ainsi des TRAs provenant d'un nombre de tissus restreint seront moins exprimés dans les mTECs que ceux exprimés de manière plus large dans l'organisme⁴⁸. D'autre part, les TRAs dont l'expression est associée physiologiquement à celles d'autres peptides seront également conjointement exprimés dans le thymus, les TRAs individuels n'étant exprimés que dans 1-3% des mTECs chacun¹³. L'expression TRAs est régulée positivement par les facteurs de transcription AIRE et FEZF2. AIRE régule l'expression des TRAs mais aussi des ligands CCL19 et CCL21. Une étude montre que la diversité du répertoire des TRA exprimé par les cTEC est diminuée dans les souris déficientes en AIRE⁴⁹. Ceci est associé au développement de signes spontanés de maladies auto-immunes. L'expression du gène Aire est régulée via la voie NFκB par RANK et CD40, dont les ligands sont exprimés à la surface des LT CD4⁺⁵⁰. FEZF2 induit l'expression de TRAs différents de ceux induit par AIRE, et son expression dépend de mécanismes indépendants de ceux régulant l'expression de AIRE, impliquant la protéine TRAF6 ainsi que la protéine LTβR^{51,52}. L'absence de l'une ou l'autre de ces protéines entraînent une baisse d'expression de FEZF2²¹. Une partie des thymocytes subit également une sélection négative dans le cortex, avant leur migration dans la zone médullaire, et certaines études montrent même que le nombre de cellules concernées dépasse celui des thymocytes subissant une sélection négative dans la zone médullaire⁵³. Ce type de sélection négative est principalement basée sur la présentation de peptides ubiquitaires présentés par les cTEC, et par les DCs thymiques, pourtant peu présentes dans le cortex thymique. Les lymphocytes T CD4⁺ auto-réactifs sont aussi susceptibles de se différencier en une sous population de lymphocytes T régulateur (Treg) exprimant le facteur de transcription Foxp3. Ces cellules sont essentielles à la tolérance au soi et le contrôle immunitaire, limitant l'inflammation en cas d'infection⁵⁴. Il s'agit de la sélection agoniste. Ces cellules Tregs différenciées dans le thymus sont appelées tTreg et constituent la majeure partie des Tregs présente dans les organes lymphoïdes secondaires, assurant la tolérance immunitaire. Les Tregs dérivés de cellules périphériques sont eux nommés pTregs, et contrôlent l'immunité sur le site infectieux.

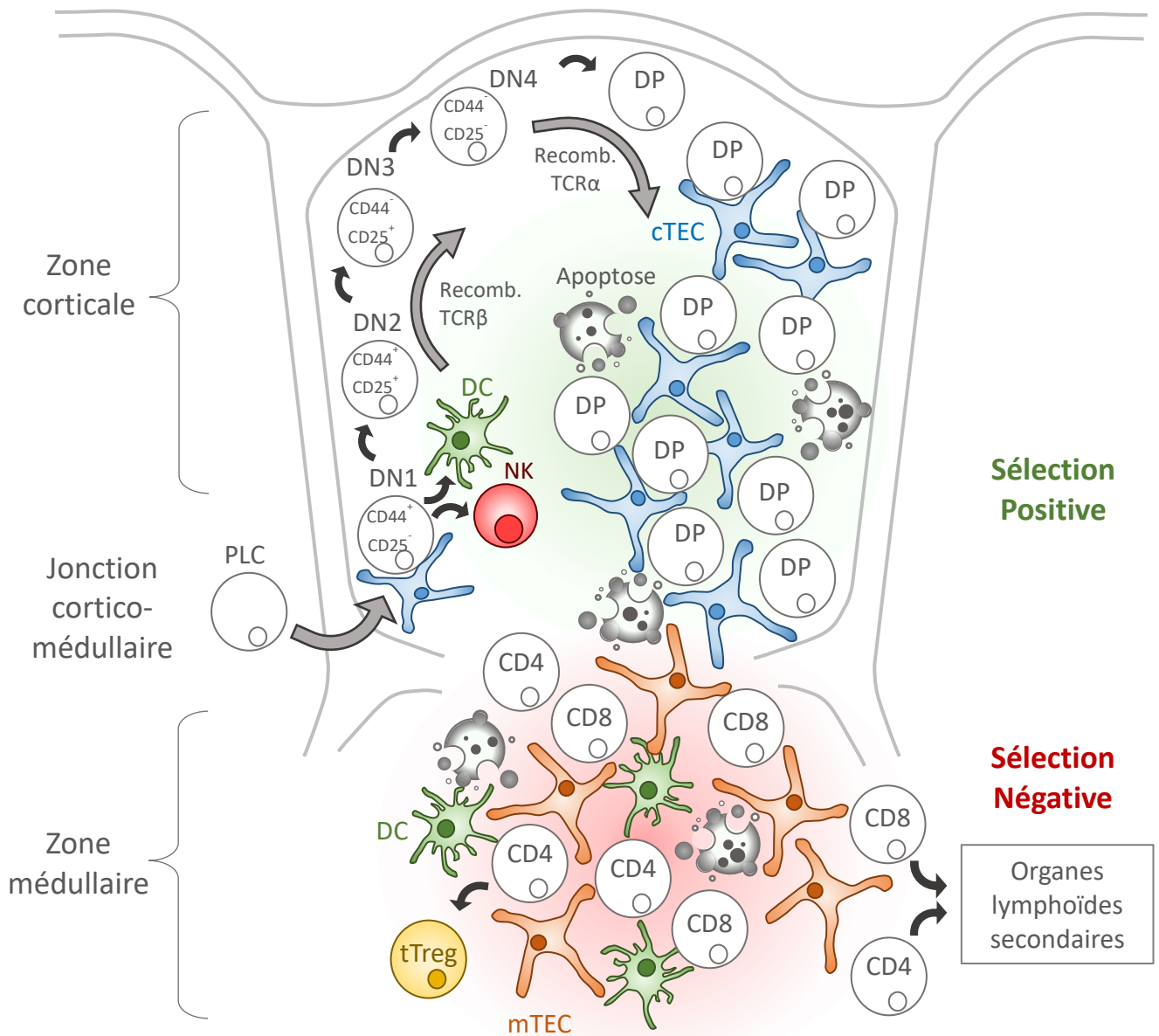


Figure 4. Résumé du développement thymique. Les progéniteurs lymphoïdes entrent dans la zone corticale du thymus et passent par plusieurs stades de développement de DN à DP durant lesquels ils subissent des réarrangements du TCR α/β . Les DP obtenus traversent une phase de sélection positive induite par une interaction avec les antigènes du soi présentés par les cTEC. Les thymocytes dont les TCR induisent des signaux suffisants pour la survie traversent la jonction cortico-médullaire vers la zone médullaire. Ils subissent alors une sélection négative induite cette fois par les mTEC. Les thymocytes SP matures migrent enfin vers les organes lymphoïdes secondaires

II. Activation et différenciation des lymphocytes T

A. La différenciation des LT CD4⁺

Lorsque les lymphocytes T, qualifiés de « naïfs », migrent dans les organes lymphoïdes secondaires, ils sont susceptibles de reconnaître des antigènes présentés par les CPA par l'intermédiaire de leur TCR. Cette reconnaissance peut conduire à l'activation des lymphocytes T et à leur différenciation en plusieurs sous populations effectrices ayant chacune un profil phénotypique et une fonction spécifique dépendants des cytokines et des signaux co-modulateurs présents dans leur environnement. Les LT CD8⁺ se différencient en CD8 cytotoxiques en se dotant de la machinerie lytique nécessaire pour tuer les cellules cibles infectées ou cancéreuses. Les LT CD4⁺ sont définis comme des auxiliaires, ou helper, et jouent un rôle important pour mobiliser et activer les cellules du système immunitaire produisant un vaste panel de cytokines et de chemokines. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ naïfs sont soumis à un processus d'activation ou « priming » dépendant de plusieurs signaux qui intègrent les signaux du TCR, ainsi que ceux transmis par les récepteurs co-stimulateurs. La différenciation des lymphocytes CD4⁺ est, elle, très dépendante de la composition en cytokines du milieu extracellulaire dans lequel se situe des cellules.

Je commencerai par présenter certaines sous populations LT CD4⁺ effectrices pro-inflammatoires, leur mode de différenciation et leur rôle, avant de décrire comment ces populations peuvent parfois acquérir des caractéristiques d'autres sous populations. Puis je décrirai une population de CD4⁺ effectrice anti-inflammatoire : les LT régulateurs, avant d'aborder une population de LT impliquée dans le développement des lymphocytes B dans les centres germinatifs.

1. *Les sous-populations effectrices de lymphocytes Th1, Th2 et Th17*

Chaque population cellulaire possède des caractéristiques précises la différenciant des autres, ainsi la séparation des différentes sous-populations est déterminées par plusieurs facteurs. Chaque population sécrète une cytokine spécifique : IFN γ , IL-4, IL-17, IL-9, et IL-22 pour les populations respectives Th1, Th2, Th17, Th9 et Th22. Chaque sous-population est également déterminée par des facteurs de transcriptions spécifiques, induisant l'expression de leurs cytokines. T-bet est associé aux Th1, le facteur GATA3 est exprimé chez les Th2, et ROR γ T chez

les Th17⁵⁵. Des recherches plus récentes ont identifié le facteur PU.1 dans la production d'IL-9 chez les Teff, ainsi que le facteur Foxo1, nécessaire au développement des Th9⁵⁶, et le récepteur aryl-hydrocarbène (AhR) est associé à la régulation de l'expression de l'IL-22. Enfin, d'autres facteurs de transcription contribuant à stimuler la transcription de gènes en se fixant aux sites ADN « enhancers » peuvent également jouer un rôle spécifique dans la détermination des sous-populations effectrices, et sont associés aux STATs : STAT4 pour les Th1, STAT6 pour les Th2 et STAT3 pour les Th17. Il est montré en étudiant l'association de gènes à p300, une protéine activant les enhancers dans les Th2, que 77% des sites de liaison à p300 qui activent les enhancers sont dépendants de STAT6. Dans les Th1, l'absence de STAT4 entraîne une diminution des sites de fixation de p300 dans les Th1, mais pas l'absence de T-bet⁵⁷. Les récepteurs aux chemokines constituent une autre manière d'identifier les populations effectrices, et chaque sous-population a un profil spécifique basé sur quelques récepteurs clés : Th1 (CXCR3⁺CCR4⁻CCR6⁻), Th2 (CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁻), Th17 (CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁺), Th22 (CXCR3⁻CCR4⁺CCR10⁺). Ces récepteurs peuvent caractériser un profil migratoire spécifique de certains tissus. Par exemple, CCR10 est un récepteur exprimé à la surface des cellules migrant dans la peau, où son ligand CCL27 est exprimé dans les couches supérieures de l'épithélium⁵⁵. Une autre population exprime GM-CSF de manière spécifique. GM-CSF a été montré comme plus exprimé par les populations Th1 que Th2 ou Th17, mais une population spécifique a été identifiée possédant un profil particulier différent des Th1 : CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁻ et CCR10⁺⁵⁸. La localisation des lymphocytes CCR10⁺ dans la peau est corrélée à une forte expression de CCL27⁵⁹. En absence de CCL27, il y a un défaut de migration des lymphocytes exprimant CCR10 dans ce tissu ce qui conduit à un dérèglement homéostatique associé à une augmentation des LT CCR10⁺ produisant de l'IL-17, et à une forte inflammation⁶⁰. Ceci montre que ce profil migratoire, déterminé par les récepteurs aux chemokines, est essentiel pour induire la localisation de sous-population spécifique, et ainsi maintenir l'équilibre homéostatique des tissus. Après leur migration sur le site infectieux, les cellules sont activées par la reconnaissance de l'antigène présenté par une CPA. Cependant, certaines cellules peuvent être activées de manière indépendantes de la reconnaissance spécifique d'un CMHII-peptide, et dépendent plutôt de la force du signal TCR. Ainsi, par exemple chez les Th17, une entérotoxine peut modifier la fixation du complexe TCR-CMH pour induire un signal TCR plus fort, générant une plus forte expression d'IL-17. Chez les Th17 au repos par exemple, l'IL-10 est très peu exprimée, et son expression augmente avec un signal TCR persistant.

Toutes ces populations effectrices ont plusieurs rôles dans la défense de l'organisme : les cellules $\text{IFN}\gamma^+$, $\text{TNF}\alpha^+$, IL-17^+ sont associées à l'élimination des pathogènes, avec un profil dit inflammatoire. Les cellules $\text{TGF}\beta^+$ et IL-10^+ ont à l'inverse pour rôle de limiter l'inflammation, et d'empêcher un « choc cytokinique », tandis que les cellules IL-22^+ sont associées à la réparation des dégâts causés aux tissus (Figure 5).

Cependant, ces sous-populations peuvent également sous certaines conditions promouvoir le développement de pathologies. Les Th17 sont connus pour être pathogènes dans un contexte d'auto-immunité. En effet, les cellules productrices d'IL-17 ont été montrées comme très impliquées par exemple, dans le développement de l'EAE, ou l'arthrite. En effet, le transfert adoptif de Th17 conduit au développement d'une EAE sévère contrairement au transfert de Th1. Il a été montré que c'est l'IL-17 qui provoque principalement le développement de la maladie, par opposition à l'IFN γ et la présence de Th17 produisant de l'IL-17 dépend de la présence d'IL-23^{61,62}. La pathogénicité des Th17 dans un contexte d'auto-immunité est induite par l'activité de STAT3, et dans un modèle d'EAE, l'absence de STAT3 provoque une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, du nombre de Th17 suite à l'immunisation, et une diminution globale du score clinique⁶³. Pourtant, les Th1 sont également souvent présentés comme allant de pair avec les Th17 dans le développement de maladies auto-immunes et plusieurs travaux indiquent que les Th1 sont également capables d'induire une inflammation menant au développement d'EAE, si d'une manière moins sévère que les Th17. Particulièrement, les Th1 polarisés *in vitro* induisent une EAE comparable à celle induite par les Th17 polarisés *in vitro*⁶⁴. Cependant le rôle de l'IFN γ dans l'EAE est ambigu. Bien que généralement décrit comme pro-inflammatoire, le blocage de l'IFN γ induit une augmentation de l'EAE, et certains travaux observent que l'IFN γ peut promouvoir l'induction de LT régulateurs⁶⁵. Enfin, une population de Th2 est décrite comme particulièrement pathogénique, produisant de fortes doses d'IL-5 et IL-13 et induisant des inflammations allergiques comme l'asthme ou la dermatite atopique. Dans l'asthme, les Th2 induisent par exemple l'infiltration d'éosinophiles dans les voies respiratoires, et le développement de mucus⁶⁶.

Plusieurs facteurs modulent la différenciation des LT naïfs en différents sous-populations effectrices. Parmi eux se trouvent le profil cytokinique de leur environnement, pouvant induire l'expression de facteurs de transcription clés. Les Th1 peuvent être induits par le

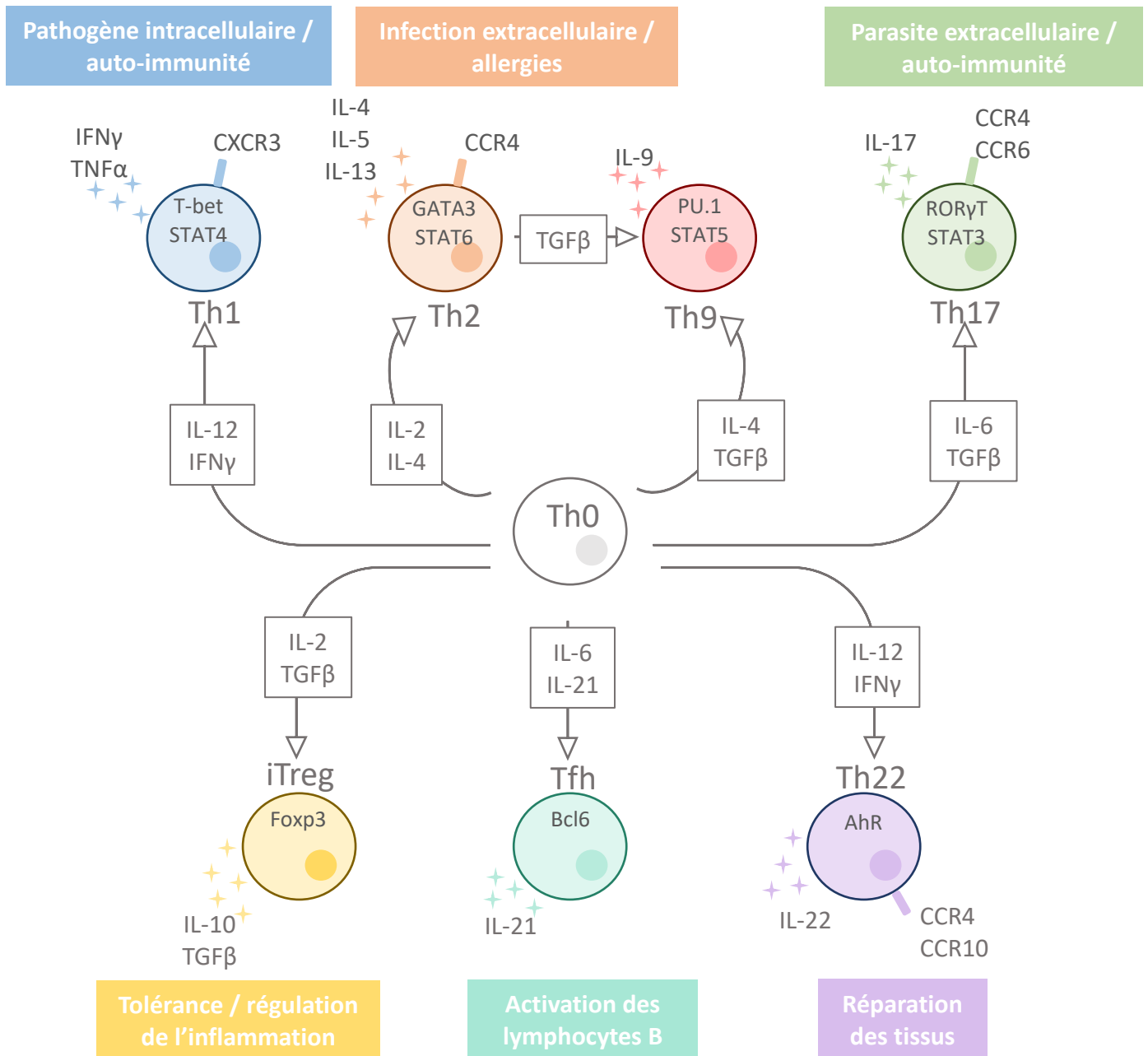


Figure 5. Les sous-populations effectrices des LT CD4⁺. L'interaction des lymphocytes naïfs avec le CMH-peptide induit une différenciation en effecteur spécifique modulée par les signaux issus des cytokines présentes dans leur environnement. Chaque sous-population dépend de facteurs de transcription spécifiques et produit un panel de cytokines caractéristiques de leurs différentes fonctions. (Adapté de Zhou et al. 2009)

facteur EOMES, particulièrement exprimé dans les LT CD8 mais également lié à T-bet et provoque chez les LT CD4 l'expression de GM-CSF et d'IFN γ . En absence de T-bet, EOMES peut induire l'expression de cytokines de type 2 comme IL-5 et IL-13. Cependant, l'absence de T-bet provoque plus généralement une augmentation de l'expression de cytokines associées à Th17 et Th22 ⁶⁷. Les Th2 sont induits par la présence d'IL-4 mais aussi régulés par le facteur de transcription GATA3 ainsi que DKK1, son rôle est centré sur la protection contre les parasites et infections extracellulaires. La population Th9 a été identifiée en tant que sous-groupe dérivé des Th2 n'exprimant pas de cytokines de type 2. Les Th9 se différencient en présence de signaux TGF β et IL-4 à la fois chez les cellules naïves dans les nœuds lymphatiques, et les cellules effectrices déjà différenciées. Le facteur BATF est nécessaire à la production d'IL-9, en plus de Foxo1 et PU.1. La différenciation des Th17 est contrôlée par le facteur de transcription ROR γ T. Chez la souris, leur différenciation est liée à l'IL-6, l'IL-23 et le TGF β , tandis que chez l'Homme, ils peuvent être différenciés en Th17 pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. Ces sont associés à différents marqueurs : IL-1 β pour les Th17 pathogènes pro-inflammatoires, co-exprimant IL-17 et IFN γ , ainsi que CCR6⁺ et CXCR3⁺. Les Th17 anti-inflammatoires expriment IL-10, n'expriment pas CXCR3 et sont indépendants de l'IL-1 β . Chez les Th9 polarisées *in vitro*, l'IL-2 est capable de bloquer la production de cytokines associées à Th17, ainsi que d'induire la production d'IL-9, et ces cytokines sont moins exprimées en absence d'interaction IL-2/CD25. L'absence d'IL-2 chez les Th9 provoque une expression d'IL-17 non associée à STAT3, provoquée par l'activité de ROR γ T ⁶⁸.

Historiquement, les premières études ont d'abord identifié les deux sous-populations Th1 et Th2 comme mutuellement antagonistes. Il a été montré que des symptômes liés à l'allergie sont réduits lorsque les Th2 sont trans-différenciés en cellules au profil Th1, et à l'inverse, l'induction de cytokines associées à la sous-population Th2 induit une diminution de l'autoimmunité. Le nombre de ces sous-populations s'est étendu avec la découverte des Th17 exprimant l'IL-17, puis les populations Th9, impliquée dans la défense contre les pathogènes extracellulaires et Th22 exprimant les cytokines correspondantes IL-9 et IL-22 ⁶⁷.

En plus de signaux cytokiniques qui jouent un rôle déterminant la différenciation en sous-population effectrices, les voies de signalisation déclenchée par le signal TCR et leur intensité peuvent également influencer la différenciation des LT CD4⁺ en T effecteur (Teff), ou en T helper folliculaire (Tfh) jouant un rôle d'activateur des lymphocytes B. Par exemple, des signaux TCR de faible intensité engendrent l'expression de Bcl6, et le récepteur aux

chemokines CXCR5, associés aux Tfh, tandis qu'un signal TCR fort promeut plutôt une différenciation en T_{eff} exprimant BLIMP1, CD25 (IL2R α), STAT5, T-bet et CXCR3.

Les Th1 connus pour exprimer fortement la cytokine pro-inflammatoire IFN γ , ne l'expriment cependant pas dans les nœuds lymphatiques, mais plutôt directement sur le site infectieux, et il semblerait que son expression nécessite la reconnaissance continue du CMHII-peptide. Lors de cette reconnaissance, la cellule cesse de migrer, et a une poussée d'expression d'IFN γ avant de reprendre son processus migratoire. Cela concorde avec un modèle de différenciation dépendant du contexte inflammatoire présent sur le site d'immunisation. D'autre part, les Th2 sécrètent des cytokines de type 2 comme l'IL-4, IL-5, IL-13. Elles se différencient dans les organes lymphoïdes secondaires, et sont différenciées plus précisément après leur migration sur site⁶⁹. Une étude sur les DCs provenant de la peau (dDC) montre que les dDC CD301b⁺ migrent dans les nœuds lymphatiques et jouent un rôle capital dans l'activation des cellules naïves en Th2. Suite à la reconnaissance d'un allergène, leur entrée dans les nœuds lymphatiques est médiée par le récepteur CCR8, dont le ligand (CCL8) est exprimé par les macrophages des nœuds lymphatiques. En absence de CD301b dans les dDCs, il y a une baisse du nombre de CD4 CD69⁺ dans les nœuds lymphatiques drainants, ainsi qu'une diminution de la prolifération des cellules GATA3⁺, le facteur de transcription associé à la différenciation en Th2⁷⁰.

Enfin, les LT naïfs peuvent également se différencier en LT régulateurs, exprimant l'IL-10, dont le rôle est de limiter l'activation des cellules immunitaires et d'éviter une surproduction de cytokine.

2. *La plasticité des sous populations effectrices*

Bien que les sous-populations soient catégorisées en fonction de l'expression de leurs marqueurs, ceux-ci ne sont pas vraiment spécifiques de leur population associée. En effet, dès les premières études sur les Th1 et les Th2, des populations cellulaires exprimant à la fois IFN γ et IL-4 ont été décrites. Certaines populations effectrices peuvent être différenciées à partir de populations déjà différenciées, comme les Th9 différenciés à partir de Th2. Des cellules CD4⁺ ont été modifiées avec un gène rapporteur IL-4 associé à la GFP et triées selon l'expression d'IL-4. Ces cellules présentant un profil Th2 ont été mises en culture avec un milieu prouvant la différenciation en Th1, Th2, et Th9. Dans ces conditions de polarisation Th1, les cellules ne

se différencient pas en Th1. Par contre, en présence de TGF β , il y a une perte de l'expression des cytokines associées aux Th2 au profit de l'IL-9. Ainsi le TGF β 1 est capable de reprogrammer les Th2 pour leur faire exprimer l'IL-9⁷¹. Des populations de Th1 et Th2 expriment leurs cytokines respectives, mais également de l'IL-17. Les cellules IL-17⁺IFN γ ⁺ sont généralement associées au développement de réponses pathogéniques dans l'auto-immunité tandis que les cellules IL-17⁺IFN γ ⁻ sont plutôt décrites comme anti-inflammatoires. De même, les facteurs de transcription spécifiques de chaque population sont aussi exprimés dans d'autres T effecteurs, comme Foxp3, associé aux T régulateurs⁵⁵. Dans le cas des Th2, suite à l'expression de l'IL-33 il y a induction de l'expression de l'IL-13. Les Th2 sur site peuvent présenter un profil similaire aux ILC2, des cellules effectrices de l'immunité innée⁶⁷. De plus, les Th2 sont capables de se différencier en une population spécifique présentant une faible capacité à être reprogrammée. Cette population produit de fortes dose d'IL-5 en absence d'IL-4. Cette expression d'IL-5 nécessite de nombreux cycles de différenciation, contrairement à GATA3 induit dès les premiers cycles. Ces cellules IL-5⁺ expriment moins de CD27, un marqueur dont l'expression diminue après différenciation, montrant qu'il s'agit de population très différenciées et dont la plasticité, la capacité à être reprogrammée, est diminuée⁷². L'expression de ces cytokines, bien que correspondant à des sous-populations, se chevauche en réalité entre plusieurs populations de T effecteurs. Ceci remet en question l'idée de sous-populations au profil défini, et suggèrent plutôt un modèle ressemblant à un spectre d'expression de marqueurs et des profils cellulaires plus complexes⁷³.

3. *Les lymphocytes T régulateurs*

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont essentiels au maintien d'un équilibre inflammatoire, et leur absence provoque une réponse générale immunitaire accrue contre les antigènes du soi, menant au développement de maladies auto-immunes ou de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI ou IBD). À l'inverse, une forte présence de population CD25⁺CD4⁺ est corrélée avec une diminution d'allergie. Le développement et les fonctions effectrices des Treg sont régulées par le facteurs de transcription Foxp3, globalement exprimé dans les populations CD25⁺⁵⁴. L'induction de Foxp3 dans les cellules CD25⁻ mène à l'expression de CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2, ainsi qu'à la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ , l'IL-2 ou l'IL-4. Ces cellules sont capables de

réprimer la prolifération de LT CD4⁺ *in vitro* et diminue les symptômes de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) *in vivo*, avec une diminution du score de colite chez la souris ⁷⁴. La surexpression de Foxp3 chez la souris augmente également le nombre de cellules CD4⁺ CD25⁺ dans les nœuds lymphatiques. L'expression de Foxp3 est associée à celle de récepteurs inhibiteurs comme PD-1 et GITR, ainsi que la diminution de l'expression de l'IL-2, IL-4 et IFN γ ⁷⁵. Il semble que l'inhibition de l'IL-2 par Foxp3 passe par son association avec l'unité de transcription NFAT, empêchant la formation du complexe AP-1, ainsi qu'avec Runx1. En absence de ces associations, l'expression d'IL-2 n'est plus inhibée. Foxp3 cible cependant de nombreux gènes de manière directe, dont les gènes codants pour ZAP-70, l'IL-2, CD25, et CTLA-4. La majeure partie des Treg présents dans les organes lymphoïdes secondaires se différencient au cours de la sélection négative des thymocytes dans le thymus. Ces cellules sont capables de reconnaître des antigènes du soi et sont désignées thymic Treg (tTreg). Cependant, certains Tregs peuvent aussi être différenciés à partir de LT périphériques, les induced Treg (iTregs). Chez la souris, l'IL-6 couplé avec l'IL-2 et le TGF β permet une différenciation de CD4 naïfs en T régulateurs, *in vitro*, l'IL-6 couplée avec le TGF β seul provoquant une différenciation en Th17. Chez l'Homme, l'expression de Foxp3 est généralement augmentée après activation cellulaire, même si les Tregs sont ceux qui l'expriment le plus intensément. L'induction de iTregs humains *in vitro* passe par d'autres voies et nécessite la présence d'IL-10, ainsi qu'une stimulation antigénique. Le facteur IFITM3 semble important pour la régulation des fonctions des Treg, particulièrement dans un contexte tumoral. Dans un modèle de carcinome de l'œsophage, l'expression du facteur de transcription IFITM3 est associée au nombre de Treg infiltrant la tumeur et en absence de IFITM3, il y a une augmentation de la réponse antitumorale, du nombre de cytokines pro-inflammatoires, et du nombre de LT effecteurs infiltrant la tumeur. IFITM3 réprime l'activité de STAT1, limitant la production de cytokine pro-inflammatoire au profit d'une activité régulatrice de la réponse immunitaire ⁷⁶. Il existe également une sous-population de LT CD8⁺Foxp3⁺ ayant également un rôle de régulation de l'inflammation. La localisation des Tregs est variée et dépend des marqueurs de migration exprimés à leur surface. Par exemple, les Tregs localisés dans les nœuds lymphatiques expriment le marqueur CCR7, et certaines de ces cellules expriment CD103, promouvant la migration vers les cellules épithéliales où se trouve son ligand, la cadhérine E.

4. Les lymphocytes T helper folliculaires

La différenciation des LT CD4 peut mener alternativement à une autres sous-population nommée les LT helper folliculaires (Tfh). Les Tfh sont des cellules résidant dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les nœuds lymphatiques et la rate. Leur rôle est d'activer les lymphocytes B, et d'induire leurs fonctions effectrices. Leur différenciation est provoquée par différents types de signaux, dont l'IL-6, et l'interaction entre le récepteur ICOS et son ligand ICOS-L. Une faible force de signal TCR a cependant été décrite comme essentielle dans le choix de différenciation vers les Tfh, plutôt que vers les T effecteurs. Ainsi, le signal TCR lié à la reconnaissance d'antigène présenté par les DC n'est pas suffisant, et s'ajoute à la présence d'IL-6 sécrété par les monocytes et par certains lymphocytes B. La différenciation en Tfh est régulée négativement par la présence d'IL-2, induisant l'expression du facteur Blimp1 et l'activité de STAT5. Bcl6 agit sur la différenciation en bloquant l'expression de Blimp1, et est induit entre autres par le facteur de transcription TCF1. Lors d'expériences d'induction de Tfh *in vitro* chez la souris, l'IL-6 se révèle un facteur essentiel à la différenciation, ainsi qu'à l'expression d'IL-21, cytokine principale exprimée par les Tfh.

Cependant, chez l'Homme, le rôle de l'IL-6 est moins évident, et les facteurs de différenciations décrits sont plutôt l'IL-12 et le TGF β ⁷⁷. L'induction de Tfh humains semble aussi pouvoir être déclenchée par l'activin A qui engendre *in vitro* des cellules ayant un phénotype similaire aux Tfh⁷⁸. Suite à leur priming, les Tfh expriment Bcl6, induisant l'expression du facteur de migration CXCR5 et inhibant celle de CCR7. Ce profil de migration, ainsi que les signaux causés par ICOS permettent aux Tfh de migrer vers la frontière T-B des organes lymphoïdes secondaires, et d'activer les LB. Suite à cette activation se forment les centres germinatifs (GC) dans lesquels les LB subissent leur processus de sélection positive et négative. La migration des Tfh vers les GC est modulée par l'expression de plusieurs intégrines ainsi que du récepteur SLAM. Sans une activation par les Tfh, les LB ne survivent pas plus de 24 heures et sont incapables de proliférer. Ils ont besoin d'IL-21 et de CD40L pour leur maintenance et leur différenciation, ainsi que dans une moindre mesure, d'IL-4 et de CXCL13. Les LB sont en compétition pour l'interaction avec les Tfh, basé sur la quantité de CMH II-peptide exprimé à leur surface. Cette interaction se déroule dans la zone claire des centres germinatifs, et les LB sélectionnés se multiplient ensuite dans la zone sombre, et migrent ensuite vers le site infectieux.

B. La différenciation des LT CD8⁺

Le rôle principal des LT CD8⁺ activés, est l'élimination de cellules pathogéniques, par leur activité cytotoxique. Suite à une infection, les CPAs interagissent avec les LT CD8⁺ naïfs, et provoquent leur priming. Il y a un cross talk entre les DC exprimant le récepteur XCR1, et les LT CD8⁺ exprimant son ligand XCL1. Cet échange est nécessaire pour l'activation et la prolifération précoce des LT CD8⁺. Leur différenciation est ensuite provoquée par des signaux pro-inflammatoires comme l'IL-12, provoquant l'induction du facteur T-bet. La cytokine IL-2 semble aussi être importante pour les fonctions effectrices. Chez les souris déficientes pour le récepteur CD25 (IL-2R α), il y a une baisse d'expression de Granzyme B et de Perforine, menant à une diminution de la capacité à tuer les cellules cibles. Dans un modèle d'infection de Chorioméningite lymphocytaire (LCMV), les LT CD8⁺ CD25⁺ présente une forte expression de KLRG1 et de Granzyme B, ainsi qu'une faible expression d'IL-2 et de CD62L. Ils ont également une faible capacité de prolifération. Ces cellules sont appelées « Short lived effector cells » (SLEC), elles ont un profil phénotypique CD127^{low}KLRG1^{high}. La faible expression d'IL-2 est aussi due à une répression par Blimp1, facteur exprimé par les SLEC, et dont l'expression diminue dans les cellules CD62L⁺ exhibant un phénotype mémoire. Blimp1 induit l'expression de marqueurs de fonction effectrice comme Tbx21 et Id2, et réprime celle de marqueurs de phénotype mémoire : TCF1, Bcl6 et EOMES ⁷⁹.

Si les LT CD8 cytotoxiques constituent la part la plus importante, ils se divisent cependant en plusieurs sous-populations de cellules différenciées. Parmi elles, les Tc1 sont considérées comme les cellules effectrices cytotoxiques. Elles expriment la perforine, le granzyme B, IFN γ et TNF α . Leur différenciation est modulée à partir de CD8 naïfs par certaines cytokines comme l'IL-12, mais aussi des facteurs de transcription comme STAT4 et EOMES. Les Tc1 ont une grande capacité à infiltrer les tumeurs dans de nombreux modèles chez la souris, ainsi que des fonctions de « killing » de cellules tumorales ou de cellules infectées. En plus des voies cytotoxiques classiques, les Tc1 tuent par des voies alternatives passant par les signaux Fas et Fas-L menant aux processus nécrotiques de ferroptose et pyroptose ⁸⁰.

Les différentes sous-populations de LT CD8 sont généralement associées à des phénotypes similaires à leurs homologues chez les LT CD4. Ainsi, les Tc2 expriment des cytokines associées aux Th2, et leur expression augmente également lors d'inflammations comme l'asthme. Les Tc9 expriment l'IL-9, et comme les Th9, sont différenciées par l'IL-4 et le TGF β . Elles infiltreront

aussi les tumeurs et, contrairement aux Tc2, ont des fonctions antitumorales lors d'expériences de transfert cellulaire. Les Tc17 ont aussi un profil type Th17 et expriment IL-17, STAT3 et ROR γ T, mais aussi d'autres cytokines non associées à Th17 comme IL-22, GM-CSF et IL-13. Certaines Tc17 expriment T-bet, mais présentent un phénotype moins cytotoxique que les Tc1. Les Tc17 obtenus *in vitro* après transfert *in vivo* ne produisent plus d'IL-17, et obtiennent un phénotype de Tc1 exprimant IFN γ et Granzyme B. Cette différenciation serait due en partie au facteur de transcription EOMES, montrant que, à l'instar des LT CD4, les LT CD8 sont capables de plasticité et d'être reprogrammés en fonction du contexte environnemental. Cette plasticité peut cependant être amoindrie par l'expression de récepteurs inhibiteurs comme PD-1 et CTLA-4.

Les LT CD8 peuvent être des LT régulateurs. Certains expriment Foxp3 comme les Treg CD4⁺, avec un profil de transcription similaire. Ces cellules régulent l'inflammation lors de greffes, et en absence de Treg CD4⁺, elles sont capables de diminuer l'inflammation due au syndrome de « Graft versus host disease » (GVHD). Certains Treg CD8⁺ sont restreints à un peptide du CMH de classe I nommé Qa-1. Ils expriment chez la souris CD122 et Ly49, et leur activité suppressive passe par la cytokine IL-15. Ils répriment les fonctions effectrices des Tfh Qa-1⁺ ainsi que les LT CD4 auto réactifs dans des modèles d'EAE. Chez l'Homme, il existe une sous-population exprimant le marqueur KIR, très exprimée lors du développement de maladie auto-immunes ainsi que dans des cas d'infection virale.

III. Le devenir des lymphocytes T : maintien naïf et mémoire

A. Les lymphocytes T mémoires

À l'issue de la réaction contre les pathogènes, certains lymphocytes T sont maintenus, en circulation dans les organes lymphoïdes secondaires ou dans les tissus, et sont dotés de moyens de répondre plus efficacement à une deuxième infection par les mêmes pathogènes. Il s'agit des lymphocytes mémoires. Ceux-ci ont conservé certaines propriétés effectrices et migratoires des cellules dont ils sont issus. Dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules spécifiques d'un CMH peptide peuvent être mémoires ou naïves, les mémoires étant les plus nombreuses. Ces cellules interagissent avec les DC, menant à la reconnaissance du peptide présenté. Les LT mémoires CD4⁺ comme CD8⁺ sont divisés en plusieurs sous

population basées sur des marqueurs similaires⁸¹. Nous nous concentrons dans ce chapitre sur les LT CD8⁺ mémoires. Les fonctions effectrices des LT CD8⁺ mémoires ne semblent pas dépendre de la stabilité de l'interaction avec les DC⁸². Cependant, l'intensité du signal TCR, induit par l'affinité du TCR au CMH-peptide présenté par les DC, influe sur plusieurs réponses cellulaires. Une intensité de signal TCR forte mène à des réponses plus élevées, avec en parallèle une augmentation du pourcentage de LT en apoptose. Une interaction de faible affinité à l'inverse diminue les capacités de prolifération cellulaire, bien que tout de même associée à des LT CD8⁺ mémoires fonctionnels⁸³. Les mémoires CD8⁺ migrent sur le site infectieux grâce au facteur de migration CXCR3, et sont par nature plus rapide à répondre à une que les LT CD8⁺ naïves qui doivent être activées. Ils se découpent en plusieurs catégories comprenant les LT de la mémoire centrale (T_{CM}) se situant dans les tissus lymphoïdes, les LT effecteurs mémoires (T_{EM}) circulant, ou les LT résidents (T_{RM}) spécifiquement situés dans les tissus. Chaque population exprime des marqueurs à leur surface formant leur phénotype spécifique. Les T_{CM} expriment à la fois les marqueurs CD44, CD62L et CCR7 et sont capables d'exprimer des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2, IFN γ , et le TNF. Les T_{EM} expriment CD44 mais pas CD62L ni CCR7. Leur phénotype circulatoire leur permet de migrer vers les sites d'infection, où elles présentent des capacités cytotoxiques, produisant des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-5, IFN γ et le granzyme B. Enfin, les T_{RM}, expriment également fortement CD44 mais pas CD62L. Elles expriment toutefois faiblement CCR7, et présentent une très faible capacité de recirculation⁸⁴. Elles expriment à leur surface CD103, marqueur de cellules résidentes se liant à l'E-Cadhérine (Figure 6). Les T_{RM} détectent immédiatement les antigènes sur site, servant de protection rapidement mobilisable en cas d'inflammation comme en cas de développement tumoral. Ce désavantage est compensé par une grande capacité d'amplification sur site à l'aide d'autres types cellulaires résidents comme les NK, les DC et les cellules épithéliales. Les CD8⁺ arborant un phénotype T_{RM} sont ceux qui interviennent le plus tôt dans la réponse contre les pathogènes, puisqu'ils sont directement localisés sur les sites d'infection. Il existe cependant une sous population de T_{EM} CX3CR1^{int} qui est capable d'être relocalisée dans la circulation après localisation dans les tissus. Elles expriment alors les marqueurs CCR7 et CD62L⁸⁵. Une telle capacité à être relocalisées hors des tissus non-lymphoïdes dans la circulation permet une efficacité augmentée par rapport aux T_{EM} classiques.

Cependant, parmi les LT CD8⁺ non situés dans les tissus lymphoïdes, la majorité semble présenter un profil similaire aux T_{RM} plutôt qu'aux T_{EM} recirculants.⁵⁵ Les cellules circulantes disposent de facteurs de migration tels que S1PR1, interagissant avec S1P dans la circulation et nécessaire pour la sortie des LT des organes lymphoïdes secondaires. S1P est un facteur promouvant la migration des LT naïfs, mais inhibant celle des LT mémoires, CD4⁺ et CD8⁺. En effet, une expérience de transwell montre une migration spontanée des T_{CM} et T_{EM} diminuée en présence de S1P, contrairement à aux capacités migratoires des LT naïfs⁸⁶. L'expression de S1PR1 à la surface de la cellule dépend de l'expression du marqueur d'activation CD69. CD69 se lie à S1PR1 et empêche son interaction avec S1P. L'expression de S1PR1 est également diminuée dans les CD4/CD8 T_{RM}, ne nécessitant pas de facteur de migration⁸⁷. La différenciation des LT CD8⁺ en mémoire est essentiellement dépendante de l'IL-15 mais peut aussi être induite par l'IL-18 et l'IL-7. La surexpression de l'IL-7 permet par exemple d'engendrer des CD8⁺ mémoire même en absence d'IL-15 et vice versa⁸⁸. La différenciation des T_{RM} est assurée par les facteurs Blimp-1, Hobit, Nur77 et Runx3, tandis que celle des LT mémoires circulants par Eomes ou T-bet.

Les catégories de LT mémoires ne sont pas strictement déterminées. Par exemple, les T_{EM} contiennent en réalité plusieurs populations associées, et selon certaines classifications, les T_{RM} font partie intégrante des T_{EM}^{89,90}.

B. Maintien homéostatique des lymphocytes T

En absence de réponse immunitaire effective, les lymphocytes T matures doivent suivre un processus de maintien permettant de conserver un réservoir cellulaire suffisant pour une réponse secondaire efficace. Ce réservoir augmente considérablement après la réponse primaire, pourtant seuls 10% des LT ayant répondu à la première infection survivent pour se différencier en lymphocytes mémoires. Il contient, en plus des mémoires, des lymphocytes naïfs ayant une faible capacité de prolifération. Ces cellules nécessitent une interaction faible avec un CMH-peptide du soi pour leur survie. Cependant, des expériences de transfert dans des souris irradiées, dont le répertoire immunitaire est absent, montrent que les lymphocytes T naïfs sont capables de proliférer en conditions lymphopéniques. Ce processus est plus précisément appelé *Lymphopenia Induced Proliferation* (LIP) au lieu de l'appellation simplifiée

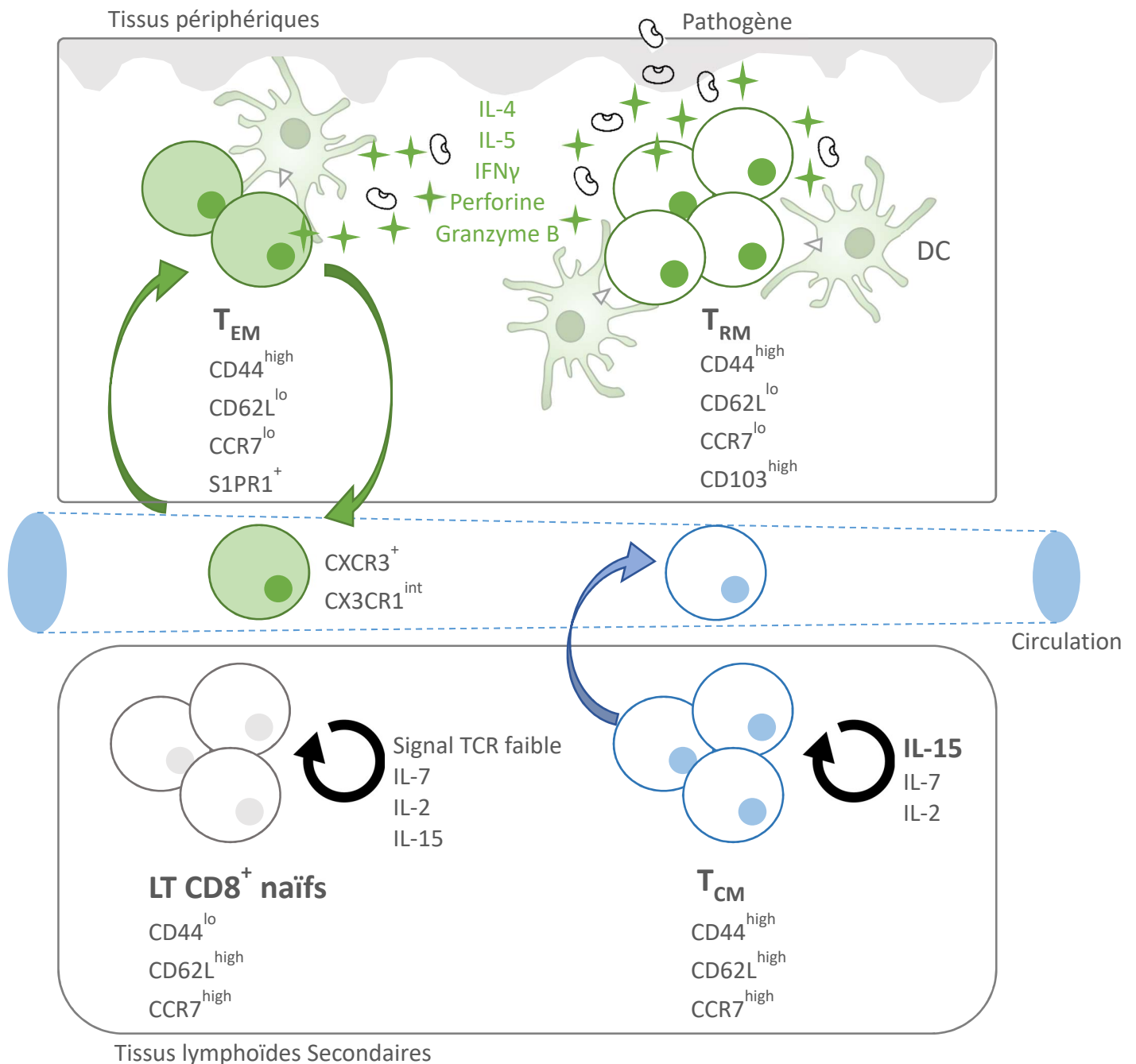


Figure 6. Population de lymphocytes T mémoires. Les T_{CM} migrent entre la circulation sanguine et les tissus lymphoïdes secondaires. Les T_{EM} sont recrutés vers les tissus infectés et présentent un phénotype de type effecteur, produisant des cytokines pro-inflammatoires. Les T_{RM} sont situées dans les tissus périphériques et possèdent de très faibles capacités migratoires. Leur prolifération est induite après activation par les DC.

La maintenance des cellules naïves dépend principalement des signaux dépendants des cytokines IL-2, IL-7 et d'un signal TCR déclenché par un peptide du soi de faible affinité. Chez les LT mémoires, la maintenance est assurée par les signaux dépendants de la cytokine IL-15, en ajout des cytokines IL-7 et IL-2.

de prolifération homéostatique⁹¹. La LIP est induite par des antigènes du soi qui stimulent les TCR. Les CD8⁺ en absence de ce signal ne subsistent que quelques jours, contre quelques mois dans le cas des CD4⁺. Cette stimulation entraîne une signalisation du TCR faible, induisant une phosphorylation partielle de la chaîne ζ du TCR. Cette signalisation dépend également de co-récepteurs CD4 et CD8, une déficience en CD4 entraîne une diminution de la prolifération homéostatique. La LIP est cependant principalement déclenchée par des signaux provenant des cytokines, et particulièrement les cytokines interagissant avec des récepteurs à chaîne γ , commune aux récepteurs IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R et IL-21R. En aval de ces récepteurs se trouve la kinase JAK3, menant à l'activation de Bcl-2⁹².

Parmi ces cytokines, l'IL-7 joue un rôle essentiel dans le maintien des LT CD8⁺ naïfs ainsi que la survie des LT de la mémoire centrale. En plus de l'IL-7, l'IL-2 et l'IL-15 sont les cytokines les plus importantes pour le maintien homéostatique des LT CD8⁺. Leurs récepteurs IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) et CD132 sont exprimés à la surface des LT CD8⁺. L'inhibition du signal de la chaîne γ commune à ces récepteurs abroge la survie et la prolifération des lymphocytes T après leur transfert dans des souris irradiées⁹³. L'IL-7 est produite principalement par les cellules FRC (Fibroblastic Reticular Cell), tandis que l'IL-15 est produite par les monocytes, les macrophages et les DC. Les souris déficientes pour l'IL-7 présentent un défaut d'homéostasie. Le nombre de LT CD4⁺ et CD8⁺ est diminué dans les organes lymphoïdes secondaires. Les LT CD4⁺ et CD8⁺ restant présentent une forte expression de CD44 et une faible expression de CD62L⁹⁴. Une déficience pour l'IL-7 mène à un défaut de prolifération en contexte de transfert cellulaire dans des souris irradiées. Il est aussi observé une diminution de LT CD8⁺ à partir du 40^e jour après immunisation dans des souris IL-7R^{-/-}, ainsi qu'une diminution de l'expression de Bcl-2 après une infection⁹⁵. Dans le cas d'une infection au LCMV, l'IL-7 permet une augmentation du nombre de cellules mémoires CD8⁺ dans la phase de contraction, ainsi que le nombre de cellules présentant un épitope spécifique de LCMV dans la rate. Ces cellules expriment également plus de Bcl-2⁹⁶. Un transgène induisant la surexpression de Bcl-2 peut compenser la perte d'IL-7 pour maintenir la survie, mais l'ajout l'IL-7 reste nécessaire pour induire une prolifération⁹³. Des expériences de stimulations par ces cytokines montre que *in vivo*, la survie cellulaire est assurée principalement par l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15, tandis que la prolifération nécessite l'ajout d'IL-4⁹⁷. Ceci implique que différentes voies privilégient alternativement la survie ou la prolifération cellulaire en fonctions des conditions. Certaines hypothèses prennent en compte la disponibilité en IL-7 dans l'environnement cellulaire, une

forte concentration menant à une augmentation de la prolifération cellulaire, tandis qu'une concentration en IL-7 plus faible induirait plutôt la survie. L'IL-7 dans les organes lymphoïdes secondaires est produite par les cellules fibroblastiques dans la zone des LT. La régulation de la production d'IL-7 se fait par le récepteur CD127 (IL7R α) qui en se liant à la chaîne γ forme le récepteur IL-7R. Une forte prolifération homéostatique ainsi qu'une concentration élevée d'IL-7 mène à une diminution de l'expression de CD127 chez les cellules naïves, tandis que l'absence d'IL-7 induit une augmentation de l'expression de CD127. L'association de CD127 à JAK1 et celle de la chaîne γ à JAK3 permet à ceux-ci d'interagir avec le facteur de transcription STAT5. Ces signaux empêchent l'apoptose mitochondriale par l'activation de Bcl-2 et de Mcl1⁹¹.

Les signaux IL-7 doivent être transitoires pour permettre la maintenance des LT CD8⁺. Une culture de lymphocytes T CD8⁺ naïfs en IL-7 de 14 jours entraîne la production d'IFN γ , et la diminution de la phosphorylation de STAT5, menant à la mort cellulaire. L'effet de l'IL-7 sur les lymphocytes T CD8⁺ est régulé négativement par une boucle de rétrocontrôle qui entraîne une diminution de l'expression du récepteur IL-7R. Un transgène de l'IL-7R dont l'expression est maintenue après stimulation par l'IL-7 stabilise la phosphorylation de STAT5, et entraîne une meilleure survie⁹⁸.

La prolifération de LT naïfs est diminuée après leur transfert dans des souris déficientes pour CD122, partie formant le récepteur à la fois de l'IL-2 et de l'IL-15. La capacité des LT naïfs à s'expandre dans les souris CD122^{-/-} IL-2^{-/-}, ou CD122^{-/-} IL-15^{-/-} est amoindrie en comparaison du cas des souris CD122^{-/-} seul. Ces résultats impliquent que les deux cytokines sont nécessaires à la prolifération des LT naïfs et que la présence de l'une ne semble pas compenser l'absence de l'autre. La prolifération induite par les signaux de l'IL-15 et l'IL-2 était bien plus élevée chez les CD8⁺ que chez les CD4⁺. Contrairement à l'IL-7, l'induction de la prolifération des LT naïfs par l'IL-2 et l'IL-15 ne dépend pas du signal TCR induit par la reconnaissance du CMHI-peptide. En effet, lors d'expériences de transfert, des LT CD8⁺ injectées à des souris déficientes pour le CMHI ont des capacités de prolifération similaires à celles injectées à des souris sauvages⁹⁹. L'IL-15 est particulièrement essentiel au maintien des LT CD8⁺ mémoires (figure 6). L'absence de l'IL-15 ou celle de son récepteur IL-15R α ne réduit pas la réponse immunitaire contre l'infection LCMV, mais réduit le nombre de LT CD8⁺ mémoires induits. Les LT CD8⁺ mémoires injectés dans des souris IL-15^{-/-} ont des réponses cellulaires similaires à celles injectées dans des souris IL-15^{+/-}, et sont activées en présence du clone viral de LCMV.

Ces cellules ne peuvent cependant pas proliférer. Ainsi l'IL-15 est nécessaire à la prolifération homéostatique des LT CD8⁺ mémoires mais pas à leurs fonctions effectrices¹⁰⁰.

Les molécules impliquées dans l'activation des lymphocytes T, ne sont pas toutes essentielles au maintien homéostatique, comme les récepteurs co-stimulateurs CD28, CD40, ou 4-1BB. Une déficience pour ces récepteurs ne modifie pas les capacités prolifératives de cellules naïves dans des expériences de transfert dans des souris irradiées, que cette déficience concerne les cellules transférées, ou les cellules de la souris hôte¹⁰¹. Cependant, la prolifération homéostatique peut être à l'inverse limitée par des co-récepteurs inhibiteurs. Une étude comparant l'effet de CD28 et de CTLA-4 sur l'activation et la LIP montre que CTLA-4 est capable de limiter la prolifération *in vivo* après un transfert de LT CD4⁺ naïfs dans des souris RAG^{-/-}¹⁰².

Des cellules présentant un phénotype mémoire sont capables d'émerger de populations LT naïves en expansion homéostatique. Les LT CD8⁺ naïfs en maintien homéostatiques possèdent des capacités cytotoxiques, comparables à celles des CD8⁺ mémoires et diminuées en comparaison des CD8⁺ effecteurs. Les LT CD8⁺ convertis en mémoires expriment des niveaux relativement élevés de CD44 et de l'IL-2R β , et ceci sans subir de passage à un stade de cellule effectrice. Au contraire des cellules naïves, les LT mémoires ne nécessitent pas de signalisation provoquée par un CMH-peptide pour leur survie. Elles sont également capables de proliférer en conditions lymphopéniques, de manière CMH indépendante. Ces signaux sont cependant nécessaires pour induire une réponse immunitaire efficace après une rencontre secondaire avec un antigène⁹².

La LIP peut être régulée par d'autres facteurs tels que GATA-3, induisant l'expression de cytokines de type 2 chez les CD8⁺ effecteurs, mais dont l'absence provoque aussi la diminution de la prolifération et de la réponse à la stimulation du TCR¹⁰³. Certaines populations cellulaires peuvent moduler la maintenance des LT CD8⁺ naïfs, comme les Treg, qui en plus de bloquer les fonctions effectrices des CD8⁺ activés, inhibent la prolifération homéostatique en limitant la libération d'IL-2. Ainsi, en absence de Treg, il y a augmentation de la concentration d'IL-2, et de l'expansion IL-2 dépendante des CD8⁺¹⁰⁴.

La maintenance des LT CD4⁺ dépend, comme les LT CD8⁺, également fortement de l'IL-7. Les LT CD4⁺ déficientes pour l'IL-7 ou transférées dans des souris déficientes pour l'IL-7 ont une faible survie. Des résultats similaires sont obtenus en cas de déficience pour le récepteur IL-7R¹⁰⁵. Ces signaux induits par l'IL-7 fonctionnent en synergie avec ceux induits par l'IL-2 pour

provoquer la prolifération des LT CD4⁺ naïfs et mémoires. Ces deux cytokines activent la voie de STAT5 menant à une survie de longue durée¹⁰⁶. Les LT CD4⁺, naïfs ou mémoires, ne dépendent cependant pas de l'IL-15 pour leur survie et prolifération. Le nombre de LT CD4⁺ dans les nœuds lymphatiques de souris IL-15Rα^{-/-}, contrairement à celui des LT CD8⁺ n'est pas diminué¹⁰⁷. De même, le pourcentage de LT CD4⁺ CD44⁺ est similaire après leur transfert dans des souris IL-15^{-/-} ou IL-15⁺, tandis que le pourcentage de LT CD8⁺ CD44⁺ ou CD122⁺ diminue après injection dans les souris IL-15^{-/-}. De plus, après injection dans des souris IL-15^{-/-} la proportion de LT CD4⁺ CD44⁺ par rapport aux LT CD8⁺ CD44⁺ est drastiquement plus élevée, comparé aux souris exprimant l'IL-15⁺¹⁰⁸.

C. Epuisement des lymphocytes T

Des stimulations successives ou prolongées des lymphocytes T mène à un état d'épuisement qualifié « d'exhaustion ». Ces cellules épuisées présentent une perte de fonctions effectrices, ainsi qu'une augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs. Les cellules épuisées ont principalement été décrites dans des modèles d'infection chroniques chez la souris comme celle due au virus LCMV et les études concernent en grande partie les CD8⁺ parmi lesquels a été observée une population spécifique du virus ne produisant pas les cytokines pro-inflammatoires associées à des CD8⁺ activés. Les premiers stades d'épuisement sont associés à une perte de production d'IL-2, de prolifération, et de capacité de destruction des cellules cibles. Il y a ensuite une baisse de production d'IFNγ, pour finir par une perte globale du nombre de CD8⁺ spécifiques du virus. L'épuisement est plus important si le nombre d'épitope viraux présentés au TCR est élevé, ou si l'infection est de longue durée. Les LT CD4⁺ présentent globalement un phénotype similaire avec une perte de fonctions. Néanmoins, il semble que ce phénotype n'est pas restreint aux cellules spécifiques du virus et qu'il s'agit plutôt d'une perte globale de production de cytokines au sein de la population CD4⁺¹⁰⁹. Il semble que le phénotype des LT épuisés peut être différent selon la sévérité de l'infection. Betts *et al.* ont montré que le phénotype de cellules épuisées provenant de patients atteints de HIV de différentes sévérités caractérisait des populations de LT CD8⁺ différentes¹¹⁰. Ainsi selon le contexte infectieux, différents types de cellules épuisées peuvent se former, et ces différents phénotypes de LT CD8⁺ ont permis dans cette étude de discriminer les patients ayant des formes sévères de l'infection. Il y a de plus chez les CD8⁺ épuisés une baisse d'expression de

récepteurs aux cytokines CD122 et CD127, associée à une perte de réponse à l'IL-7 et l'IL-15. Ces cellules ne sont pas capables de se redifférencier en effecteur ou en mémoire, même en absence de l'antigène étranger.

Les premiers marqueurs de cellules épuisées qui ont été décrits sont les récepteurs inhibiteurs régulant négativement l'activation des lymphocytes T, tels que PD-1 mais aussi CTLA-4, TIM-3, CD160 ou LAG-3. Le blocage de l'interaction entre PD-1 et PD-L1 entraîne une augmentation du nombre de lymphocytes spécifiques du virus capables de répondre aux antigènes viraux du LCMV. Les cytokines IL-10 et TGF β , provenant de population cellulaires inhibitrices comme les Treg, jouent également un rôle important dans l'induction de l'épuisement. Durant une infection LCMV, le TGF β entraîne une augmentation de la phosphorylation de Smad2. Un transgène du récepteur TGF β RII limitant la signalisation de TGF β à un niveau faible, mène à une augmentation de la survie cellulaire, une augmentation du nombre de CD8⁺ tétramère⁺, et un contrôle viral plus efficace¹¹¹. Les cytokines associées aux récepteurs à chaîne γ peuvent augmenter la capacité des LT épuisés à répondre aux antigènes. Un ajout exogène d'IL-2 ainsi qu'un traitement à base d'IL-7 augmente les capacités effectrices des lymphocytes épuisés dans un modèle d'infection chronique chez la souris. L'IL-21 produite par les LT CD4⁺ est également nécessaire pour la réponse soutenue des CD8⁺ en cas d'infection chronique.

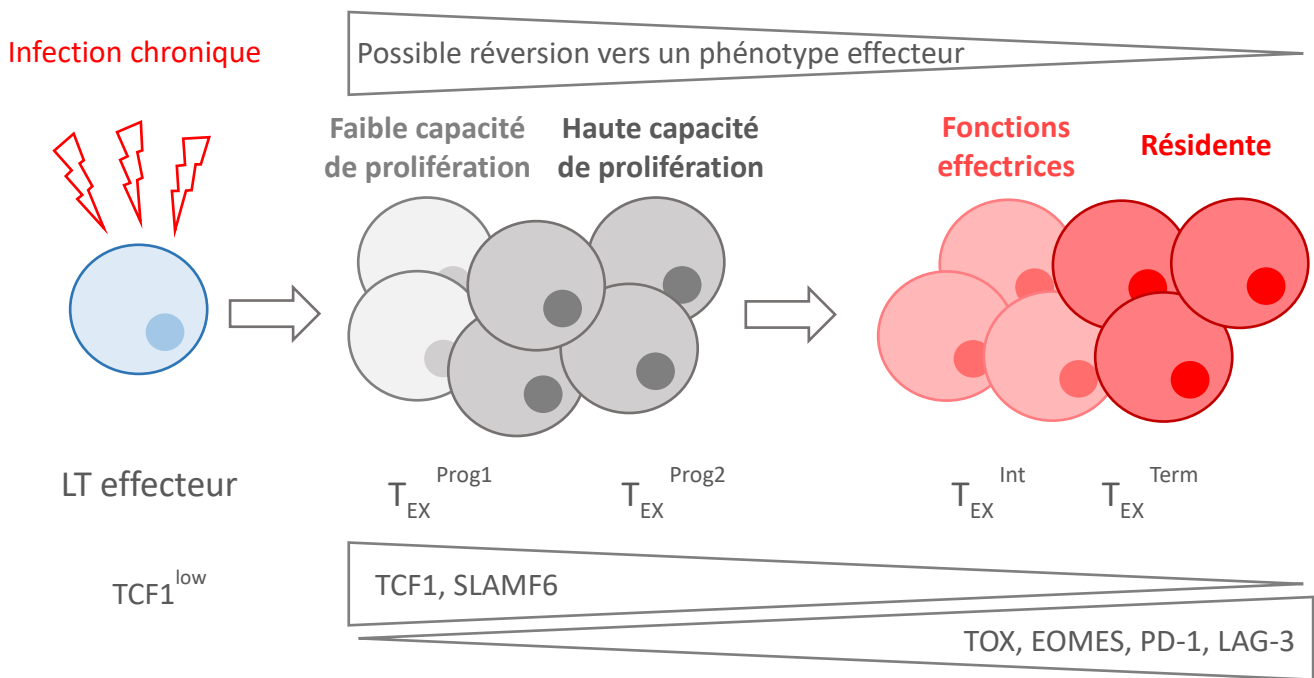


Figure 7. Cinétique de différenciation des lymphocytes T épuisés. Après avoir été exposé à une activation chronique, les lymphocytes T effecteurs se différencie en progéniteurs épuisés T_{EX}^{Prog} ayant une faible capacité à proliférer, ils expriment des facteurs de transcription marquant le stade précoce de l'épuisement. Ils se différencie ensuite en une population intermédiaire présentant toujours des fonctions effectrices, et exprimant des marqueurs du stade tardif de l'épuisement comme des récepteurs co-inhibiteurs. Ils atteignent enfin le stade d'épuisement terminal au cours duquel ils perdent leurs capacités migratoires, leurs fonctions effectrices, et leur capacité à retrouver un phénotype effecteur.

Plus récemment, les cellules épuisées sont aussi identifiées sur la base de l'expression de facteurs de transcription clés. Par exemple, les protéines du complexe AP-1, importantes dans l'activation des lymphocytes T, sont remplacées par des homodimères de NFAT dans les populations épuisées, qui après translocation dans le noyau, mène à l'expression des gènes codant pour PD-1, LAG-3 ou TIM-3. EOMES est également décrit parmi les populations épuisées, mais c'est le facteur TCF-1 qui détermine la transition entre les cellules effectrices TCF1^{low} et les cellules épuisées TCF-1^{high}. À l'inverse, l'expression de KLRG1 et de Granzyme B diminue dans les populations épuisées en comparaison des cellules effectrices. Le facteur TOX est capital pour l'induction de l'épuisement, il fonctionne par un remodelage de la chromatine, et est régulé par NFAT ¹¹². Une étude de Beltra *et al.* a permis de caractériser plusieurs sous populations de lymphocytes T épuisés. Ils en dégagent quatre groupes : les T_{EX}^{prog1} exprimant fortement TCF-1, avec une faible capacité de prolifération, les T_{EX}^{prog2} TCF-1⁺ avec une forte capacité de prolifération, les T_{EX}^{int} TCF-1⁻ présentant certaines fonctions effectrices, et enfin les T_{EX}^{term} TCF-1⁻ non migratoires. Différents marqueurs permettent de distinguer ces sous-groupes. L'expression du facteur EOMES par exemple diminue dans les T_{EX}^{prog2} pour remonter dans les T_{EX}^{term} tandis que le facteur TOX est très fortement exprimé au stade terminal T_{EX}^{term} ¹¹³. L'expression de TOX est directement associée à un phénotype d'épuisement, comportant une augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs, ainsi que celle d'EOMES. Chez les souris TOX^{-/-}, le nombre de CD8⁺ spécifiques du virus LCMV après infection est diminué. Néanmoins ces cellules expriment plus de KLRG1, et produisent plus de Granzyme B, d'IFN γ et de TNF α . Dans des modèles de cancer (B16-GP33), ces souris présentent des tumeurs plus petites. Le facteur TOX agit en reprogrammant le paysage transcriptomique de la cellule vers un phénotype épuisé ¹¹⁴. Cependant, TOX n'est pas exclusivement exprimé dans les cellules épuisées, et il peut être identifié chez des population de LT effecteurs mémoires T_{EM} et T_{EMRA}. Ainsi, TOX est nécessaire pour l'expression de PD-1 à la surface cellulaire, mais pourtant, PD-1 n'est pas toujours associé à un épuisement sévère. En réalité, un transfert de cellules PD-1 KO dans des souris infectées au LCMV montre une diminution de l'expression de cytokines effectrices, de la survie et de la prolifération à long terme, en comparaison des cellules WT ¹¹⁵. PD-1 pourrait en réprimant la réponse des LT effecteurs, également éviter une suractivation menant à un épuisement cellulaire (Figure 7).

IV. Signalisation du TCR

A. Signalisation TCR proximale

Suite à l'interaction entre le TCR et le CMH-peptide, plusieurs événements moléculaires sont impliqués afin d'induire un signal TCR suffisant pour assurer l'activation des fonctions cellulaires. Il y a d'abord activation des tyrosines kinases (PTK) : Lck et FYN qui ont pour rôle de phosphoryler le complexe TCR et particulièrement les motifs d'activation situés sur la queue cytoplasmique des complexes CD3, appelés ITAMs. Lck s'associe à la queue cytoplasmique des co-récepteurs CD4/CD8 et active ensuite d'autres protéines dont ZAP-70 qui engage ensuite différentes voies de signalisations¹¹⁶. La phosphorylation du complexe TCR est dépendante de la disponibilité des motifs ITAMs ciblés par Lck. Les ITAMs sont des motifs d'acides aminés composés de parties consensus et variables : D/EX₀₋₂YXXI/LX₆₋₈YXXI/L¹¹⁷. Les motifs ITAM des chaînes ζ et CD3 ϵ peuvent être situés dans la membrane lipidique cytoplasmique, les rendant non disponibles à des phosphorylations. Certaines recherches suggèrent que l'interaction entre le TCR et le CMH-peptide provoque des flux calciques locaux qui libèrent le complexe CD3 du feuillet interne de la membrane plasmique, rendant les ITAM accessibles aux kinases Lck^{10,118}. Un premier modèle suggère que la force d'interaction du TCR avec le CMH-peptide doit être assez forte pour franchir un palier à partir duquel les signaux sont suffisamment soutenus pour induire l'activation des cellules. L'accumulation de signaux est nécessaire à l'activation cellulaire avant la dissociation du TCR et du CMH-peptide. Il s'agit de la « correction cinétique ». Seule une partie des co-récepteurs CD4/CD8 se lie à Lck, qui peut se trouver en conformation active ou inactive. Il est donc suggéré que les co-récepteurs opèrent en « scannant » la surface des cellules pour détecter les complexes TCR-CMH-peptide et, une fois ces complexes reconnus, induisent un recrutement supplémentaire de Lck conduisant à la phosphorylation des motifs ITAM^{119,120}. Une expérience stabilisant l'interaction Lck-CD8 décrit une augmentation de la réponse cellulaire issue d'un CMH-peptide de faible affinité. Une autre étude montre une augmentation des signaux TCR en réponse à une faible densité de ligand en augmentant la quantité de Lck actif en zone proximale du TCR. D'autres modèles suggèrent que le signal TCR pourrait être renforcé dans le cas d'un engagement en série de plusieurs TCR pour un seul CMH-peptide, ou du réengagement d'un même TCR à plusieurs reprises, augmentant le temps d'interaction avec

le CMH-peptide, particulièrement dans le cas d'un CMH-peptide doté d'un temps d'interaction court ^{121,122}. Enfin il est possible que plusieurs TCR de faible affinité pour un CMH-peptide s'assemblent à la membrane afin d'augmenter la sensibilité au ligand, lors de ce qu'on appelle une « coopération positive » ¹²³. Cet assemblage de TCR a pour effet de libérer des régions du complexe CD3 en modifiant localement la structure de la membrane lipidique. Par exemple, il y a libération de la région riche en proline (PRR) de la chaîne CD3ε, induisant une liaison avec le domaine SH3 de la protéine adaptatrice Nck, et augmentant la force du signal TCR. D'autre part, l'interaction TCR-CMH-peptide ne constitue que la première étape, suivie d'un processus d'accrochage du CD8 au CMH-peptide, induit par des kinases Src. Un complexe TCR-CMH-peptide-CD8 est ainsi formé, sensible aux événements de signalisation proximale. Cette association permet au TCR de discriminer le niveau d'affinité avec le CMH-peptide de manière plus efficace ^{124,125}.

Les différentes voies activées suite à la stimulation du TCR, sont modulées par plusieurs de leurs acteurs, les protéines adaptatrices comme LAT, ZAP-70 et SLP-76 jouant un rôle important dans la régulation des signaux TCR. Le recrutement de PLCγ1 est également vital pour l'activation des voies de signalisation distales. L'activation des voies du TCR nécessite une interaction avec des molécules associées aux radeaux lipidiques recrutés à la synapse immunologique. Cette interaction induit la phosphorylation de tyrosines situées dans le complexe TCR par les PTK et Lck. Lck se lie à ZAP-70 associé au TCR, et promeut son recrutement vers les radeaux lipidiques, amorçant nombre de voies activatrices ¹¹⁶. En parallèle, Grb2 s'associe à LAT et induit son recrutement à la membrane. C'est l'association de Grb2 avec LAT qui mène à l'activation des voies Ras. Un membre de la famille de Grb2, GADS, s'associe à la fois à la forme phosphorylée de LAT mais aussi à la protéine adaptatrice SLP-76, formant un complexe GADS-SLP-76-LAT. Cette association augmente l'activation de NFAT, ainsi que du promoteur du gène codant pour l'IL-2 ¹²⁶ (Figure 8).

1. La SRC kinase Lck

Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) fait partie de la famille des SRC kinases (SFK) contenant 10 kinases non récepteurs ayant un domaine PTK et des domaines de fixation SH2 et SH3. L'activité kinase de Lck est contrôlée par des événements de phosphorylation et de déphosphorylation, contrôlés par la phosphatase membranaire CD45. CD45 provoque

l'activation de Lck en déphosphorylant la tyrosine Y₃₉₄ qui maintient Lck dans une position inactive en empêchant l'autophosphorylation de la tyrosine Y₃₉₄ nécessaire à son activité¹²⁷. Cependant d'autres études montrent qu'une forte expression de CD45 à l'inverse a pour effet d'inactiver Lck en déphosphorylant la tyrosine Y₃₉₄, ainsi qu'en ciblant le complexe TCR, le niveau optimal de signal TCR étant atteint avec une expression modérée de CD45^{128,129}. Il est nécessaire pour le signal TCR que Lck soit situé à la membrane cellulaire, en interagissant avec la queue cytoplasmique des co-récepteurs CD4/CD8 α ¹³⁰. Il semble que l'association du CD8 avec le CD3/ ζ dépend dans un premier temps principalement de Lck, avant la formation du complexe tri-moléculaire. Lck phosphoryle ensuite 6 tyrosines sur les motifs ITAM de la chaîne CD3 ζ . Deux de ces tyrosines forment un site de liaison avec le domaine SH2 de ZAP-70^{131,132}. Cette interaction provoque la stabilisation de la phosphorylation de CD3 ζ , ainsi que l'activation de ZAP-70 par la phosphorylation de sa tyrosine kinase. La chaîne CD3 ζ est susceptible d'interagir avec un Lck libre ou un Lck associé au co-récepteur, ce dernier étant capable d'induire une activation cellulaire efficace¹³³. En effet, dans un contexte de réaction à un antigène du soi, la réponse des lymphocytes T CD8⁺ est modulée par cette association Lck-CD8/CD4. L'expression chez des souris OT1 du récepteur nucléaire Nur77, très sensible aux signaux TCR faibles, est plus faible dans le cas d'une association de Lck au CD8, comparé à son association à un récepteur chimérique possédant la région intracytoplasmique d'un CD4. Il existe ainsi une part constitutive de Lck sous forme actif, menant à des tyrosines phosphorylées à l'état basal, même dans des lymphocytes non-activés.

2. ZAP-70 et LAT

ZAP-70 est présent dans le cytoplasme sous forme inhibée, puis est activé après son recrutement aux motifs ITAM, sa forme activée maintenue par la phosphorylation de ses tyrosines Y₃₁₅ et Y₃₁₉ par Lck, empêchant son processus d'auto-inhibition¹³⁴. Lck est également capable de former un complexe avec ZAP-70, via la phosphorylation de la tyrosine Y₃₁₉ de ZAP-70 qui crée un « site d'amarrage » au domaine SH2 de Lck, menant à la liaison Lck-ZAP-70. Des mutations invalidantes sur ce site d'amarrage sont décrites comme bloquant les signaux du TCR car la liaison du domaine SH2 de Lck à la tyrosine Y₃₁₅ l'empêcherait de prendre une forme inactive¹³⁵. L'inhibition de l'activité kinase de ZAP-70 entraîne une augmentation de l'activité kinase de Lck, ce qui implique l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négative régulant

l'activation des fonctions catalytiques de Lck par ZAP-70¹³⁶. Selon une étude, ZAP-70 interagit avec les motifs ITAM phosphorylés selon un mécanisme de « Catch and release », ZAP-70 étant dissocié des ITAMs après son activation par Lck pour être transloqué vers la molécule adaptatrice transmembranaire LAT dont la phosphorylation dépend de ZAP-70. ZAP-70 phosphoryle la tyrosine Y₁₅₂ qui permet le recrutement et l'activation de la voie phospholipase PLC γ 1 qui déclenche ensuite la voie calcique et Ras/MAPK. ZAP-70 phosphoryle aussi les tyrosines Y₁₇₁, Y₁₉₁, et Y₂₂₆ qui permettent le recrutement des protéines adaptatrices Grb2 et Gads/SLP-76^{137,138}.

En recrutant plusieurs protéines à l'origine de voies de signalisation, LAT opère donc en pilier de la signalisation TCR. La phosphorylation de LAT et SLP-76 par ZAP-70 crée des points d'arrimage permettant l'interaction avec les protéines à domaine SH2. LAT est associé à SLP-76 par l'intermédiaire de Gads et forme des complexes LAT-Gads-SLP-76, qui s'assemblent en clusters dynamiques, pouvant être désassemblés après déphosphorylation de LAT¹³⁹. Ces clusters peuvent être formés de complexes distincts à partir de différentes protéines. Un complexe alternatif à LAT-Gads-SLP-76, est celui formé par la liaison de Grb2 et SKAP1 à LAT, dû à un cross-linking de l'intégrine LFA-1, qui a pour effet l'inactivation de LFA-1, et l'arrêt de l'interaction entre le lymphocyte et la CPA lors de la formation de la synapse immunologique¹⁴⁰.

3. SLP-76

SLP-76, ou SRC homology 2 (SH2) -domain-containing leukocyte protein of 76 kDa, est une protéine adaptatrice de la signalisation proximale du TCR. SLP-76 est recruté à la membrane suite à la phosphorylation de LAT, et forme ainsi un complexe composé de plusieurs protéines de signalisation telles que PLC γ 1, ou ITK¹⁴¹. La déficience pour SLP-76 dans des cellules Jurkat a montré que SLP-76 est nécessaire pour la phosphorylation de PLC γ 1, mais pas celle de LAT ou ZAP-70, suggérant un rôle de SLP-76 plutôt assembleur de protéines proximales¹⁴². En effet, l'absence de SLP-76 induit une diminution de flux calcique ainsi que l'activation de la voie Ras, en aval de PLC γ 1. SLP-76 est composé d'un domaine SH2 en C-terminal, un domaine riche en proline (PRR) et un domaine tyrosine en N-terminal. La zone N-terminale de SLP-76 permet une association avec VAV1 et le domaine riche en proline induit l'interaction avec GADS (Grb2-related adaptor protein) et PLC γ 1. Spécifiquement, la tyrosine Y₁₄₅ permet le

recrutement de ITK, dont la cible est PLC γ 1. Les tyrosines Y₁₁₂ et Y₁₂₈ sont également importantes pour la phosphorylation de PLC γ 1, l'activité de NFAT, et le flux calcique¹⁴³.

B. Signalisation TCR distale

La signalisation distale est celle induite en aval des événements de signalisation proximale, et se divise en plusieurs voies dédiées à l'expression de gènes responsables de différentes fonctions cellulaires. Un acteur central de plusieurs de ces voies est la phospholipase PLC γ 1. L'activation de PLC γ 1 entraîne l'hydrolyse de PIP₂ en deux protéines jouant un rôle majeur dans plusieurs voies de signalisation¹¹⁶ (Figure 8).

1. La voie calcique

La lyse du PIP₂ induit la formation de deux protéines, dont IP₃ se liant ensuite au récepteur ionotrope IP₃R sur le réticulum endoplasmique (ER)¹⁴⁴. Ceci entraîne une libération de Ca²⁺ dans le cytoplasme par IP₃R. Cette augmentation de Ca²⁺ dans le cytoplasme est accrue par une entrée calcique additionnelle qui traverse la membrane plasmique, via les récepteurs CRAC suite à la détection par le ER d'un « déstockage » de Ca²⁺ intracellulaire. La haute concentration calcique cytoplasmique active plusieurs protéines dont la calcineurine, une phosphatase qui a pour rôle de déphosphoryler la protéine NFAT. Ceci induit la translocation de NFAT dans le noyau et son association avec les protéines JUN/Fos (le complexe AP-1), aboutissant à l'expression de gènes associés à l'activation cellulaire comme l'IL-2. Cette association est capitale pour l'activation puisqu'en absence de l'unité AP-1, NFAT joue un autre rôle et induit l'expression d'autres facteurs comme DGK α , un régulateur négatif de l'activité de Ras, induisant ainsi à l'inverse un état anergique de la cellule^{145,146}. Cette voie est également associée aux SFKs et notamment à Lck, décrit comme un inhibiteur de NFAT1. Il a été montré que les SFKs répriment plus globalement la signalisation des NFAT dans les cellules humaines au repos. En absence de Lck, il y a une augmentation de NFAT1 dans le noyau, ainsi que de l'expression des gènes associés à NFAT1. Par opposition, une inhibition de la calcineurine bloque les effets de l'inhibition des SFKs et entraîne une libération d'IL-2 ainsi qu'une augmentation de l'expression de CD25 avec une stimulation basée sur la PMA/Ionomycine¹⁴⁷. D'autre part, l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire active également

une kinase calmoduline-dépendante (CAMK) qui induit l'expression de facteurs de transcription nécessaire à l'activation cellulaire ¹⁴⁸.

2. La voie Ras/MAPK

La deuxième protéine issue de la lyse du PIP₂ est le diacylglycérol (DAG). Associé à la membrane plasmique, il active plusieurs protéines dont PKC θ , et particulièrement RASGRP1 induisant la voie Ras/MAPK en activant les protéines RasGTPase^{149,150}. Ras sous sa forme non-activée est liée à la GDP, et son signal est activé suite à sa liaison à la GTP. Le remplacement de GDP vers GTP est provoqué par RASGRP1 ¹⁵¹. Ceci induit l'activation de Ras qui active ensuite Raf1, menant à l'activation des kinases MEK1/2 puis finalement à celle des kinases ERK1/2. Les protéines ERK sont responsables de nombreuses réponses cellulaires liées au développement des LT, à leur activation et à leur différenciation ¹⁵². Les protéines ERK1/2 active le facteur de transcription cFos, qui s'associe à JUN, activée par la voie VAV1-Rac, pour former l'unité de transcription AP-1 ¹⁵³. Certaines fonctions cellulaires sont dépendantes du nombre de motifs d'activation d'ITAM phosphorylés qui peut varier selon la force d'interaction du TCR avec le CMH-peptide. Les travaux de Clifford *et al.* montrent qu'un faible nombre d'ITAM phosphorylés suffit à induire la production de cytokines, et induit un recrutement diminué de VAV1 au complexe CD3, alors qu'un grand nombre est nécessaire pour induire une prolifération, une augmentation de la production d'IL-2 et l'induction de cMyc, un facteur de transcription important pour la division cellulaire¹⁵⁴.

3. La voie PKC θ -NF κ B

La famille PKC est composée de 10 protéines Sérine/Thréonine kinases, classées en 3 catégories : classique, atypique, et enfin la catégorie des « nouveaux isoformes de PKC » dans laquelle se trouve PKC θ , régulée par le DAG après sa liaison au domaine PB1 de PKC θ après son recrutement à la membrane. PKC θ active ensuite le complexe multimoléculaire CMB, composé de CARMA1, Bcl10 et MALT1 ¹⁵⁵. PKC θ phosphoryle d'abord CARMA1 qui est associé à Bcl10. Bcl10 est ensuite oligomérisé ce qui entraîne l'association de MALT1, ainsi que son oligomérisation. Les oligomères de MALT1 se lient à TRAF6, une ubiquitine ligase E3 ¹⁵⁶. TRAF6 a pour rôle de dégrader IKK γ (ou NEMO) par ubiquitinylation. NEMO interagit avec IKK β , qui forme avec IKK α un complexe IKK¹⁵⁷. Suite à la dégradation de NEMO par TRAF6, le complexe

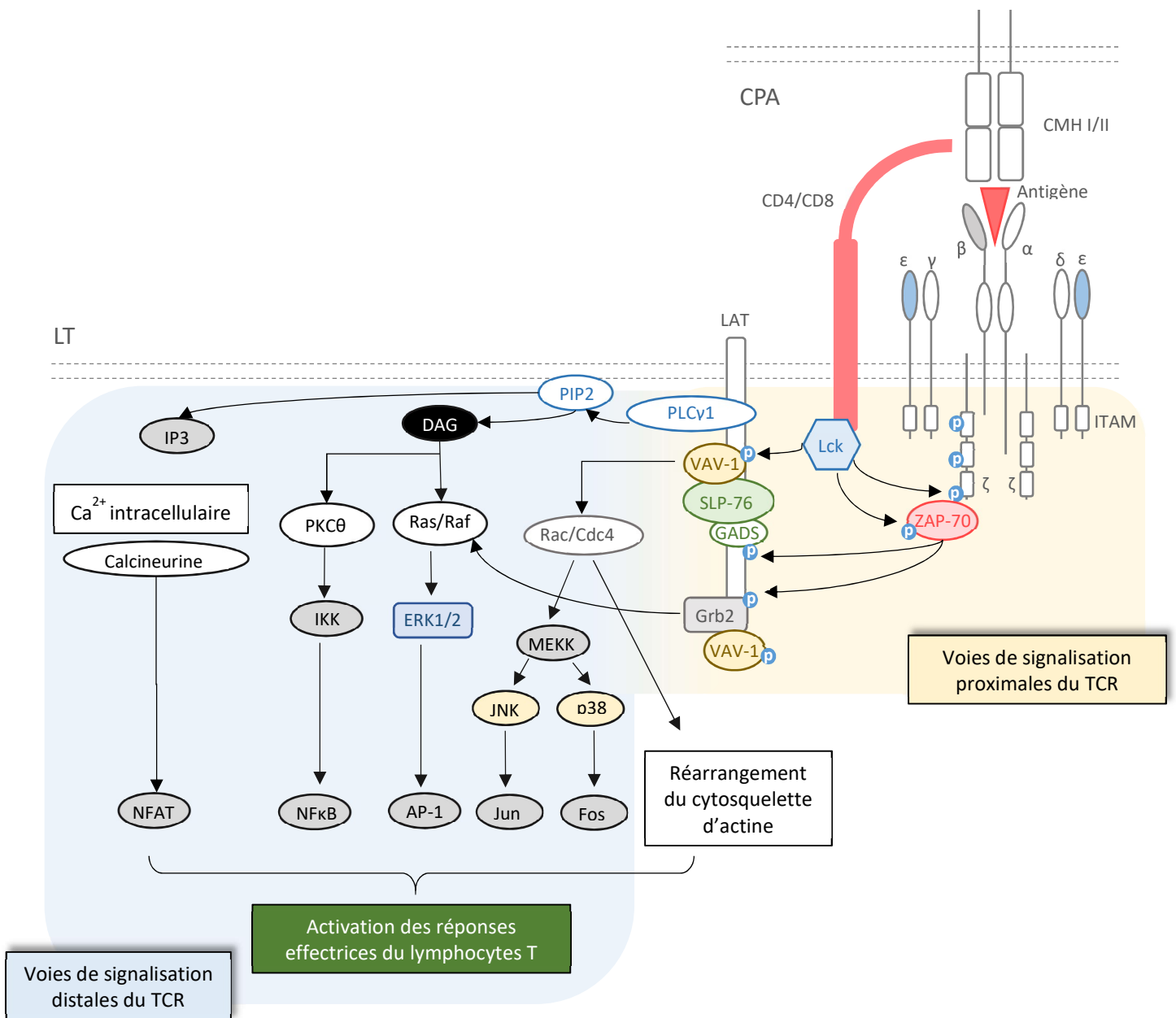


Figure 8. Les différentes voies de signalisation du TCR. La reconnaissance du CMH-peptide par le TCR induit d'abord des événements de la signalisation proximale, avec une cascade de phosphorylation d'acteurs comme ZAP-70, VAV-1 et Grb2, qui induisent ensuite les différentes voies de la signalisation distale comme la voie PKCθ, la voie calcique, ou la voie Rac/MEKK. Ces voies entraînent l'activation cellulaire en induisant la prolifération, la formation de la synapse immunologique et la production de cytokines. (*Adapté de Brownlie, 2013*)

IKK est activé et peut à son tour dégrader par phosphorylation la protéine I κ B. NF κ B n'étant plus inhibé par I κ B peut ensuite être transloqué dans le noyau et induire l'expression de gènes liés à la survie et l'homéostasie, ainsi que l'activation des fonctions effectrices des LT ¹⁵⁸. Cette voie d'activation de NF κ B est celle considérée comme classique, mais il en existe une autre basée sur les MAPK, spécifiquement MAP3K14 qui active le facteur NIK. NIK active ensuite le complexe IKK cette fois plutôt en interagissant avec la sous-unité IKK α . IKK α dégrade une protéine p100 en la phosphorylant et l'empêche ainsi de bloquer NF κ B. P100 a une action similaire à I κ B et sa dégradation induit la translocation de RelB, une sous-unité de NF κ B, dans le noyau ¹⁵⁹.

Le complexe CMB participe aussi à l'activation de la voie mTOR. Les voies Ras et PI3k/Akt induisent l'activation de mTORC1/2, mTORC1 promouvant plutôt une différenciation en Th17 et mTORC2 soit à une différenciation en Th1 par la phosphorylation de Akt, soit une différenciation en Th2 par celle de PKC θ ^{160,161}. Cependant, les deux protéines du CMB CARMA1 et MALT1 sont nécessaires pour que le mTORC soit activé efficacement. Akt agit sur de nombreuses voies de signalisation et active également le complexe IKK menant à l'activation de NF κ B ^{162,163}.

4. Les voies JNK et p38

P38 fait partie d'une famille de 4 MAPKs : p38 α (MAPK14) qui est généralement nommée p38, p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12) et p38 δ (MAPK13). L'activation de p38 est provoquée par la phosphorylation à la fois de sa thréonine et sa tyrosine sur le motif T¹⁸⁰-X-Y¹⁸². Dans les lymphocytes T, il s'agit d'un processus d'autophosphorylation provoqué par ZAP-70 ¹¹⁶. L'activité kinase de p38 touche un large nombre de protéines, et en conséquence, active des fonctions effectrices variées. Un de ses partenaires les plus observés est la protéine MK2, qui forme un complexe avec la forme inactive de p38 et provoque la phosphorylation des deux protéines. Une fois activée, MK2 agit en régulateur post-transcriptionnel de l'expression des gènes. P38 agit sur la survie cellulaire, en partie en régulant l'expression de Bcl-2, et promeut l'expression de p53, régulant ainsi le cycle cellulaire ¹⁶⁴. Curieusement, son action dépend des paramètres d'activation cellulaire. Lorsque des lymphocytes T sont stimulés par un anti-CD3, p38 agit en régulateur négatif de la prolifération et de la phosphorylation de MK2. Lorsque les LT sont stimulés par des cytokines (IL-2, IL-6 ou TNF), p38 stimule la phosphorylation de MK2

la prolifération ainsi que la production de TNF α ¹⁶⁵. Un rôle dans la production d'IFN γ a également été observé, particulièrement chez les cellules Th1, et p38 semble privilégier une différenciation dans cette sous population en inhibant la production d'IL-4 chez les Th2 ¹⁶⁶. D'autre part les kinases JNK font partie d'une famille de trois MAPK : JNK1 (MAPK8), JNK2 (MAPK9), et JNK3 (MAPK10). Elles sont activées par une phosphorylation de MKK4, et agissent en ciblant le complexe de transcription AP-1. Sa première cible décrite est c-JUN, dont la phosphorylation par JNK est nécessaire à son activité transcriptionnelle. En effet dans des cellules Jurkat, une stimulation par anti-CD3 ou par Ionomycine et PMA induit une activation de JNK, corrélée à une forte activité du complexe AP-1. Les protéines JNK1/2 sont faiblement exprimées dans les LT naïfs, puis sont induites après activation, ou *in vitro* après une stimulation TCR. La même cinétique d'expression est observée pour MKK4 et MKK7, deux activateurs en amont de JNK. Les protéines JNK1/2 n'agissent pas de la même manière dans les LT CD4 que dans les LT CD8 cependant. Leur expression est très élevée particulièrement dans les sous populations Th1 et Th2 et un knock-out de JNK2 entraîne une baisse de production d'IFN γ . L'absence de JNK1 et JNK2 n'a pas d'effet sur la production d'IL-2 dans les LT CD4 mais induit une baisse d'IL-2, probablement due à une diminution de l'expression du récepteur à l'IL-2 CD25. Dans les deux populations, la phosphorylation de JNK dépend aussi de signaux provenant de l'activation du récepteur CD28 qui stimule la production d'IL-2 ¹⁶⁶.

C. Régulation de la signalisation du TCR : SHP-1 et SHP-2

De nombreux mécanismes régulent les voies de signalisation du TCR. Ces mécanismes sont dépendants de protéines dont beaucoup agissent à un stade précoce de la signalisation, après stimulation du TCR. Par exemple, la protéine adaptatrice PAG, située dans les radeaux lipidiques, recrute la kinase CSK, régulant négativement les kinases de la Lck en absence de stimulation du TCR. La tyrosine phosphorylée de PAG s'associe au domaine SH2 de CSK, et cette association induit l'activation de CSK qui inhibe ensuite la phosphorylation de Lck, bloquant son activation ¹⁶⁷. Les tyrosines phosphatases sont des acteurs importants dans la régulation de la signalisation du TCR, et agissent en déphosphorylant des tyrosines situées sur leurs protéines cibles. Parmi elles, la tyrosine phosphatase CD45 stimule les signaux du TCR chez les LT naïfs en induisant l'activation de Lck. CD45 déphosphoryle la tyrosine Y₅₀₅ de Lck, le maintenant sous forme activée. Les thymocytes déficients pour CD45 présentent un défaut

de la signalisation TCR, dont une diminution de la phosphorylation du TCR par Lck, et du recrutement de ZAP-70¹⁶⁸. Au contraire, lorsque l'expression de CD45 est haute, il agit en tant que régulateur négatif de l'activation de Lck, en déphosphorylant sa tyrosine Y₃₉₄. Ainsi une forte expression de CD45 inhibe les signaux provenant du TCR, évitant une suractivation cellulaire. En absence de CD45, la tyrosine Y₃₉₄ de Lck est hyperphosphorylée, ce qui augmente l'activité kinase de Lck¹⁶⁹.

Au cours de notre étude, nous nous intéressons particulièrement à deux phosphatases à domaines SH2, recrutées à la queue cytoplasmique de récepteurs inhibiteurs suite à leur engagement.

Les tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2, ou respectivement PTPN6 et PTPN11, sont sans doute parmi les phosphatases les plus caractérisées. Elles se lient principalement mais pas exclusivement aux domaines ITIM situés sur les régions intracytoplasmiques de protéines transmembranaires. Elles contiennent un domaine central catalytique comportant une séquence conservée, deux domaines SH2 en N-terminal qui se fixe sur des tyrosines phosphorylées incluses dans un ITIM, un domaine catalytique PTP, ainsi qu'un domaine C-terminal possédant plusieurs tyrosines phosphorylables¹⁷⁰. Ces tyrosines sont des sites d'auto-activation, phosphorylés par le domaine catalytique. En effet, une phosphorylation des tyrosines Y₅₃₆ et Y₅₆₄ entraîne une augmentation de l'activité catalytique de SHP-1, de même que pour les tyrosines Y₅₄₂ et Y₅₈₀ chez SHP-2. Les deux tyrosines n'ont pas toutes un effet équivalent. Pour SHP-1, la phosphorylation de la Y₅₃₆ induit une augmentation de l'activité catalytique d'un facteur 4 à 8, tandis que celle de la Y₅₆₄ seulement d'un facteur inférieur à 2¹⁷¹. Une autre étude récente montre cependant que la phosphorylation des tyrosines Y₅₆₄ et Y₅₃₆ de SHP-1 n'est pas nécessaire pour son activité catalytique. En effet, une mutation invalidante des deux tyrosines Y₅₆₄ et Y₅₃₆ de SHP-1 n'empêche pas la déphosphorylation de ses protéines cibles SYK ou ZAP-70¹⁷². La liaison des domaines SH2 au phosphotyrosines augmentent l'activité phosphatase des SHP. Ils contiennent des séquences consensus d'une centaine d'acides aminés répétées se liant à la queue cytoplasmique de récepteurs membranaires sur leur région ITIM (I/V)XYXX(L/V)¹⁷³. Une mutation invalidante du domaine phosphatase de SHP-1 entraîne une augmentation des effets de la stimulation du TCR sur l'activité des lymphocytes T. Les auteurs constatent une coprécipitation de SHP-1 avec ZAP-70, qui est corrélée à une augmentation de l'activité phosphatase de SHP-1. L'invalidation du domaine catalytique de SHP-1 entraîne une augmentation de la phosphorylation de ZAP-70,

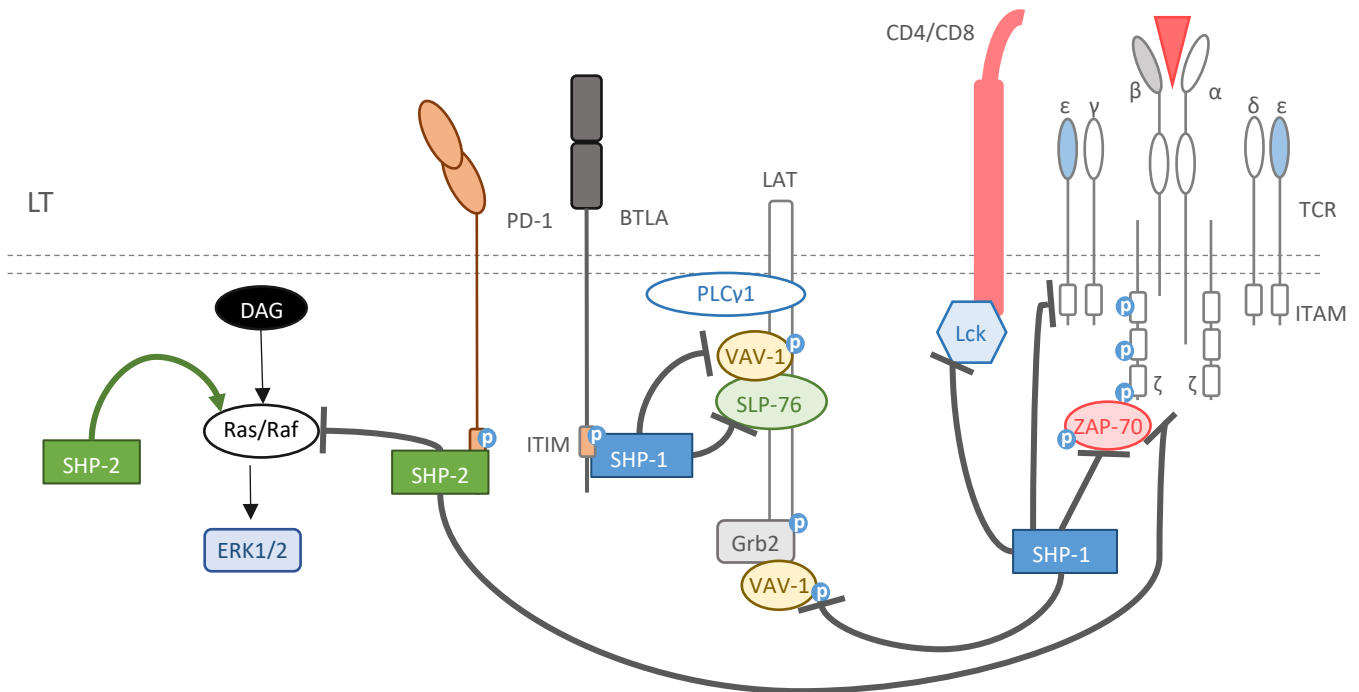


Figure 9. Les phosphatases SHP-1 et SHP-2. SHP-1 régule négativement la signalisation du TCR en déphosphorylant des protéines importantes dans la signalisation proximale comme ZAP-70, Lck ou VAV1 (Adapté de Sharma et al., 2016). SHP-1 est recrutée sur le domaine ITIM du récepteur co-inhibiteur BTLA après son engagement par son ligand. SHP-2 dans le contexte de son recrutement par le récepteur co-inhibiteur PD-1, inhibe également des acteurs de la signalisation proximale du TCR comme ZAP-70, mais aussi la voie Ras/ERK. Hors de son association à des récepteurs co-inhibiteurs, SHP-2 peut aussi avoir un rôle activateur de la voie Ras/ERK (Adapté de Dance et al., 2008).

et de la chaîne ζ , suggérant que SHP-1 opère en déphosphorylant ces protéines¹⁷⁴. SHP-1 est directement associé aux ITAM du CD3 ζ dans le cas de signaux du TCR de faible affinité (Figure 9).

Le rôle de SHP-2 est plus ambiguë. SHP-2 n'est pas phosphorylé par le TCR, mais il est associé aux motifs ITAM de la chaîne ζ . Une mutation invalidante de SHP-2 dans des cellules Jurkat induit une diminution de l'activation de ERK suite à la stimulation du TCR, ainsi que la formation de clusters de LFA-1 et leur association avec la fibronectine^{136,175}. Dans les souris comportant un mutant conditionnel de SHP-2 dans les lymphocytes T, il y a une augmentation de l'activation des LT périphériques, mais aussi une diminution de la phosphorylation de LAT, ainsi qu'une diminution de flux calcique, montrant une action à la fois activatrice et inhibitrice de SHP-2 sur les fonctions cellulaires. Plus globalement, une délétion de SHP-2 dans le lignage des LT induit une diminution de la prolifération, de la production d'IL-2, et de l'expression de marqueurs d'activations comme CD69 et CD25¹⁷⁶. Une autre étude comparant l'action de la forme sauvage de SHP-2 à celle d'une forme inactive de SHP-2 montre que SHP-2 promeut la phosphorylation de ERK, mais pas de STAT5 ou STAT3, suggérant un effet stimulateur de SHP-2 sur des voies spécifiques¹⁷⁷.

Les deux phosphatases agissent au stade du développement thymique. L'absence de SHP-1 induit une exacerbation de la sélection négative, tandis que l'absence de SHP-2 au stade DN2/DN3 entraîne une diminution par 2 du nombre de cellules DP, et SP CD4⁺ et CD8⁺, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules DN, suggérant un rôle de SHP-2 dans la signalisation du pré-TCR¹⁷⁶. La différenciation des LT périphériques en cellules effectrices dépend également de SHP-1 et SHP-2. SHP-1 a pour effet d'inhiber la différenciation en condition polarisante menant aux sous population effectrices Th1 et Th2. SHP-1 a été identifié comme acteur non nécessaire à la différenciation en Th2, mais nécessaire à celle des LT CD8⁺ en sous population Tc2 productrice d'IL-4. Il y a une perte de la production d'IL-4 par ces cellules en absence de SHP-1¹⁷⁸. Une absence de SHP-1 dans les LT CD8⁺ matures entraîne une augmentation des populations SLEC, sans changement de la part des population précurseur mémoires¹⁷⁹. Une étude contradictoire, montre que la déficience en SHP-1 dans les LT CD4⁺ induit une expansion d'une certaine population de cellules CD44^{high} présentant un phénotype de cellule centrale mémoire : CD62L^{high} CD127^{high} CCR7^{high}¹⁸⁰. L'IL-4 est nécessaire pour l'expansion de LT CD44^{high} en absence de SHP-1, suggérant que SHP-1 agit en bloquant les signaux issus de l'IL-4.

SHP-1 et SHP-2 sont cependant particulièrement connus pour leur association avec différents récepteurs inhibiteurs, dont le plus étudié, PD-1 (Figure 9). Une étude par spectrométrie de masse montre un recrutement des deux phosphatases à la queue cytoplasmique de PD-1 après une stimulation cellulaire au pervanadate, avec une stœchiométrie d'interaction plus élevée pour SHP-2 que pour SHP-1. Par contraste, SHIP ou SH2D1A ne sont pas recrutés par PD-1 après stimulation du TCR ¹⁸¹.

SHP-1 s'associe à la queue cytoplasmique de plusieurs autres récepteurs inhibiteurs tels que CTLA-4, ou BTLA qui déphosphoryle la tyrosine activatrice de Lck Y₃₉₄.

V. Co-récepteurs inhibiteurs

A. Régulation de la signalisation TCR par les récepteurs co-modulateurs

En plus des régulateurs intracytoplasmiques, l'activation cellulaire est également modulée par des récepteurs co-stimulateurs (CD28, ICOS, 4-1BB...) et co-inhibiteurs (CTLA-4, PD-1, TIGIT...). Ces co-récepteurs agissent sur différentes voies de signalisation. Certains stimulent les fonctions effectrices des LT via la production de cytokines inflammatoires, et d'autres comme CD28 augmentent plutôt la production d'IL-2 et de prolifération. Les récepteurs inhibiteurs répriment les fonctions effectrices des lymphocytes conventionnels et des Treg en régulant négativement les signaux des TCR ou d'autres récepteurs co-stimulateurs. Certains récepteurs co-inhibiteurs ont aussi la capacité de stimuler les fonctions suppressives des Treg bien que les mécanismes impliqués soient encore mal caractérisés ¹⁸². La stimulation de PD-1 par son ligand PD-L1 favorise la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en iTreg Foxp3⁺ capables de réprimer les fonctions des LT CD4⁺ effecteurs *in vitro*. De plus le nombre de iTreg est largement diminué chez les souris PD-L1^{-/-}, indiquant un rôle immunosuppresseur de la signalisation PD-1/PD-L1 ¹⁸³. D'autre part, la déficience pour PD-1 dans les Treg induit une augmentation de leurs fonctions suppressives. Les Treg PD-1^{-/-} présentent une expression accrue de Foxp3 et de CD44, ainsi que du marqueur de prolifération Ki67. La déletion de PD-1 dans les Treg provoque une diminution du développement de l'EAE. L'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ ou l'IL-17 est diminuée ¹⁸⁴.

Les récepteurs inhibiteurs, aussi appelés « Immune Checkpoints » sont identifiés comme des marqueurs de sous populations épuisées. L'interruption de la liaison PD-1/PD-L1 provoque

une augmentation de la réponse virus spécifique des LT CD8⁺ dans un contexte d'infection LCMV, entraînant une capacité accrue de prolifération et de production de cytokine en réponse à la stimulation antigénique¹⁸⁵. Ces fonctions suppressives des Immunes Checkpoints sont nécessaires pour prévenir le développement de maladies auto-immunes. Un même ligand peut interagir avec plusieurs récepteurs résultant en différents types de signal. Par exemple les ligands de CD28, B7-1 et B7-2 se lient également avec le récepteur inhibiteur CTLA-4, avec lequel ils ont une plus grande affinité que pour CD28. CTLA-4 est aussi impliqué dans la prévention de développement auto-immune, et une déficience en CTLA-4 chez la souris provoque une réaction auto-immune létale. Par contraste, la déficience conditionnelle en CTLA-4 dans les Treg chez les souris adultes entraîne à l'inverse une résistance à l'EAE, suggérant que CTLA-4 régule positivement les fonctions suppressives des Treg¹⁸⁶.

Les Immune Checkpoints sont particulièrement étudiés dans le contexte du cancer. La réaction immunitaire anti-cancéreuse est limitée par la présence de populations LT CD8⁺ épuisées exprimant à leur surface plusieurs co-récepteurs inhibiteurs qui contribuent à ce phénotype. Le blocage de la signalisation inhibitrice de CTLA-4 permet une amélioration drastique du contrôle tumoral dans plusieurs modèles de tumeurs chez la souris, comme un carcinome du colon ou un modèle de fibrosarcome¹⁸⁷. L'utilisation d'anticorps bloquant l'engagement de CTLA-4 (ipilimumab) chez l'Homme améliore également les réponses antitumorales dans plusieurs cas de cancer, dont le NY-ESO-1 (New York esophageal squamous cell carcinoma 1). Le traitement anti-CTLA-4 induit des réponses accrues de LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques à la tumeur chez des patients atteints de cancer NY-ESO-1. Ces réponses accrues sont associées à des pronostics favorables^{188,189}. L'étude du rôle de CTLA-4 chez les LT CD4⁺ et CD8⁺ est rendue difficile par le phénotype létal des souris CTLA-4^{-/-} mais la déficience en CTLA-4 chez les souris adultes ne provoque pas de changement dans le développement de tumeurs MC38¹⁸⁶.

Un des Immune Checkpoints les plus utilisés en clinique est PD-1, il existe de très nombreux traitements ciblant PD-1 dans plusieurs types de cancers, comme le mélanome, le cancer colorectal, ou le cancer du poumon non à petites cellules. Des premières études de 2002 montrent le rôle de la signalisation de PD-1 dans le développement tumoral. Les auteurs observent un développement tumoral accru chez les tumeurs (modèle P815) exprimant le ligand PD-L1, et l'injection d'anticorps bloquant anti-PD-1 diminue le développement tumoral *in vivo* chez la souris¹⁹⁰.

PD-L1 est fréquemment exprimé à la surface des cellules tumorales, et cette expression seule est suffisante pour réprimer l'activité des LT CD8⁺ effecteurs et diminuer la réponse antitumorale. Le rôle de PD-L1 diffère cependant selon les modèles de cancer. Des traitements avec des anticorps antagonistes anti-PD-L1 améliorent drastiquement la réponse antitumorale dans un modèle MC38. Le PD-L1 exprimé à la surface des cellules MC38 inhibe l'activité cytotoxique des LT CD8⁺, et les souris PD-L1^{-/-} réagissent plus au traitement anti PD-1 que les souris WT¹⁹¹. Les cellules les moins réactives dans un contexte de cancer sont celles exprimant plusieurs Immune Checkpoints à leur surface tels que PD-1 conjointement exprimé avec TIM-3. LAG-3 est également fréquemment associé à PD-1 et son expression à la surface des lymphocytes T est associée à un développement tumoral accru¹⁹². Pour cette raison, des immunothérapies sont utilisées ciblant plusieurs Immune Checkpoints. Les principales monothérapies ciblant PD-1 (nivolumab) et CTLA-4 (ipilimumab) n'induisent pas d'aussi bonnes réponses que les thérapies à plusieurs cibles qui augmentent les réponses en moyenne de 60% dans certains cancers. La plupart combinent un anti-PD-1 avec un ou plusieurs anticorps bloquant TIM-3, TIGIT, CTLA-4 ou LAG-3, et de nouvelles combinaisons sont régulièrement testées en clinique. Un défi soulevé par ces traitement anti-cancéreux est de limiter les risques de développement de pathologies auto-immunes. Certains traitements ciblent donc des populations cellulaires identifiées comme impliquées à la fois dans le développement cancéreux, et auto-immune, comme les populations Th1 et Th17 pathogéniques.

La signalisation de ces Immune Checkpoints est spécifique à chaque récepteur. LAG-3, contrairement à PD-1 ou BTLA, ne possède pas de motifs ITIM sur sa queue cytoplasmique. À la place, elle un motifs EP recrutant la protéine LAP, et KIEELE modulant la fonction de LAG-3¹⁹³. LAG-3 est associé au complexe TCR-CD3 et entraîne la dissociation de Lck au co-récepteur CD4 ou CD8¹⁹⁴. CTLA-4 se lie au ligand CD80 ou CD86, deux ligands également ciblés par le récepteur co-activateur CD28. CTLA-4 empêche donc la liaison de CD28 à ses ligands, mais provoque aussi leur destruction par voie lysosomale après induction de leur transendocytose¹⁹⁵. Les deux Immune Checkpoints que nous étudions ici sont BTLA et PD-1. Ils fonctionnent tous deux par le recrutement de phosphatases à domaine SH2, SHP-1 et SHP-2.

B. Le récepteur BTLA

BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator) est un Immune Checkpoint de la famille des Ig-SF. Il est exprimé à la surface des lymphocytes T et B, ainsi que les monocytes et certaines sous population de DC et des NKT. Il a d'abord été identifié dans des banques d'ADN extrait de cellules Th1, mais des études ultérieures ont montré qu'il était aussi exprimé dans les lymphocytes Th2 ¹⁹⁶. Des travaux plus récents chez l'Homme montrent que BTLA est exprimé de façon similaire dans les populations produisant de l'IL-4 et de l'IFN γ ¹⁹⁷. De façon générale, BTLA est exprimé sur les LT naïfs, particulièrement chez l'Homme, et son expression est accrue après stimulation du TCR.

1. La structure de BTLA

BTLA possède plusieurs domaines dont : un peptide signal (30 Aa), un domaine extracellulaire permettant la liaison avec ses ligands (127 Aa), un domaine transmembranaire (21 Aa) et un domaine cytoplasmique (111 Aa) ¹⁹⁶. La structure tertiaire relie plusieurs régions par 3 ponts disulfures. Le domaine extracellulaire est composé d'une boucle Ig similaire à celle de PD-1 permettant l'interaction avec son ligand HVEM (Herpes Virus Entry Mediator). Le domaine cytoplasmique quant à lui contient plusieurs régions à motifs tyrosine, un motif d'association avec la protéine adaptatrice Grb2, ainsi que des motifs de signalisation ITIM et ITSM similaires à ceux d'autres Immunes Checkpoints comme PD-1 ou CTLA-4. L'association de BTLA avec HVEM induit la phosphorylation des motifs ITIM, ce qui permet le recrutement de phosphatases à domaine SH2 SHP-1 et SHP-2, avec un recrutement préférentiel de SHP-1 par rapport à SHP-2. L'association de SHP-2 et SHP-1 avec BTLA requiert la phosphorylation des deux tyrosines sur les motifs ITIM et ITSM ¹⁹⁸.

2. BTLA dans les réponses physiologiques et pathologiques

L'engagement de BTLA par HVEM a pour effet la diminution de la production d'IL-2. Les lymphocytes T déficients pour BTLA possèdent une plus grande capacité à proliférer. Ces cellules ne présentent cependant pas de modifications de développement, indiquant que BTLA n'est pas nécessaire au développement thymique. BTLA semble au contraire important pour réguler le développement de CD8⁺ mémoires. La déficience pour BTLA provoque une augmentation du nombre de CD8⁺CD44^{high} et CD122⁺. Le même phénotype est observé pour

les souris HVEM KO. Les cellules BTLA KO ont également un nombre de divisions plus grand que les cellules WT. Dans une expérience de transfert de cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans des souris irradiées, les LT BTLA KO sont 20 fois plus présents dans la rate de la souris hôte que les cellules WT. Ceci indique que BTLA est très impliqué dans la suppression des capacités prolifératives des lymphocytes dans des conditions de maintien homéostatiques des cellules ¹⁹⁹. Dans un contexte cancéreux, une forte expression de BTLA est généralement corrélée à une faible réponse antitumorale et un stade avancé de la pathologie dans les modèles de cancer de la vésicule biliaire, ou de cancer du poumon ²⁰⁰⁻²⁰². Il est considéré comme cible thérapeutique potentiel dans plusieurs types de cancer comme le lymphome à cellules B. Un anticorps anti-BTLA, l'icatolimab (ou le tificemalimab) est développé en clinique pour traiter différents types de tumeurs qui montre des résultats prometteurs chez une cohorte de patients atteints de lymphome, ainsi que dans le cas de tumeurs solides ^{203,204}. Des tests cliniques en combinaison bithérapie avec un anti-PD-1 sont en cours. Chez la souris dans un modèle de glioblastome, une combinaison du blocage de PD-1 et de BTLA a pour effet une augmentation du nombre de LT CD4⁺ et CD8⁺ produisant de l'IFN γ dans le cerveau, ainsi qu'une diminution de cellules Foxp3⁺. La bithérapie montre aussi une survie post-injection de cellules tumorales supérieure aux condition bloquant PD-1 ou BTLA seuls ²⁰⁵. Cependant chez les patients atteints de cancer colorectal, son expression est plus faible que chez les patients sains. De plus BTLA est aussi identifié comme marqueur d'une population de CD8⁺ TIL présentant une capacité de survie accrue ainsi qu'une plus grande prolifération en réponse à une stimulation IL-2²⁰⁶. BTLA permet la tolérance immunitaire et favorise la prise de greffes dans un modèle murin. Un traitement agoniste activant BTLA permet une diminution des effets de rejet de transfert de cellules souches chez la souris. La stimulation de BTLA permet une répression des LT effecteurs et l'expansion des Tregs chez la souris hôte, menant à une diminution générale de la réponse immunitaire ²⁰⁷. Les souris BTLA^{-/-} présentent une augmentation d'autoanticorps et d'immunoglobulines, et bien que le nombre de cellules effectrices ne change pas, celles-ci présentent une plus grande capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires, susceptible de mener au développement spontané de maladie auto-immune, ou inflammatoire ²⁰⁸. Ainsi une étude suggère que les souris BTLA^{-/-} sur fond génétique 129/sv développe des réactions inflammatoires hépatiques spontanées. Les LT issus de souris HVEM^{-/-} ont un phénotype similaire, avec une production de cytokines plus élevée que les lymphocytes T provenant de souris sauvages, comme le TNF, l'IFN γ et l'IL-2 après stimulation par un anti-CD3. L'absence

de HVEM induit une plus grande prolifération en réponse à la stimulation par la Concanavalline A. À l'instar des souris BTLA^{-/-}, les souris HVEM^{-/-} ont une susceptibilité accrue au développement de l'EAE ²⁰⁹.

Certaines études suggèrent que BTLA pourrait transmettre des signaux de co-stimulation dans les lymphocytes T. L'association de Grb2 à un phosphopeptide dérivé de la région cytoplasmique ITSM de BTLA entraîne un recrutement de la sous unité de PI3K, p85, ce qui amène à des signaux d'activation des réponses cellulaires ²¹⁰. BTLA existe également sous forme soluble dans l'organisme, de même que PD-1, bien que cette forme soit beaucoup moins exprimée que la forme transmembranaire. Chez des patients septiques, il y a une augmentation de la forme soluble de BTLA comparé aux patients sains. Cet effet n'est pas visible pour la forme soluble de PD-1. La sévérité de la septicémie est également corrélée avec l'expression de la forme soluble de BTLA ²¹¹.

À l'état basal des lymphocytes T, BTLA est exprimé en grande partie dans le cytoplasme de la cellule, puis est recruté à la membrane après stimulation du TCR, pour former des clusters à la synapse immunologique. Suite à son engagement par HVEM, il s'associe aux radeaux lipidiques, suggérant que la localisation de BTLA à la membrane est modulée par des signaux issus de la stimulation du TCR et de son engagement par HVEM ²¹².

Bien que la plupart des études sur BTLA se fasse dans les lymphocytes T, BTLA est en réalité beaucoup plus exprimé dans les lymphocytes B. Et si la déficience pour BTLA n'a pas d'impact direct sur le développement des LB, l'absence de son ligand HVEM augmente les capacités prolifératives des lymphocytes B dans les centres germinatifs. Cependant l'expression de BTLA dans les lymphocytes B n'est pas nécessaire pour leur sélection dans les centres germinatifs ²¹³.

3. *Les ligands de BTLA : HVEM*

Le ligand principal de BTLA est HVEM. Il en existe cependant un autre appelé UL144, qui est également une protéine virale issue de HCMV (Human Cytomegalovirus). UL144 possède beaucoup de séquences similaires à HVEM et provoque également une signalisation inhibitrice de l'activation cellulaire ²¹⁴.

HVEM ou CD270 est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des TNFRSF. Il comporte un peptide signal (38 Aa), un domaine extracellulaire (164 Aa), un domaine

transmembranaire (21 Aa), et un domaine cytoplasmique (60 Aa). La particularité de HVEM est dans sa double nature de ligand/récepteur ²¹⁵. Son engagement avec BTLA produit à la fois des signaux inhibiteurs en aval de BTLA, mais aussi des signaux activateurs en aval de HVEM. Son domaine cytoplasmique est capable de recruter TRAF, qui induit une production de cytokines par l'intermédiaire de l'activation de NFκB ²¹⁶. Le domaine extracellulaire de HVEM se compose de 4 régions CRD (Cystein Rich Domain) permettant la liaison spécifique de ses différents ligands. HVEM se lie à BTLA mais aussi à d'autres récepteurs : LIGHT, CD160, et la Lymphotoxine alpha (L-α). LIGHT et L-α appartiennent à la famille des récepteurs TNFSF et interagissent avec les régions CRD2 et CRD3 d'HVEM. Ils induisent tous deux des signaux stimulateurs menant à la prolifération dans des lymphocytes T mais aussi d'autres types cellulaires comme les HEK293 ^{217,218}. BTLA et CD160 se lient aux régions CRD1 et CRD2 et induisent des signaux inhibiteurs, bien que le rôle de CD160 est plutôt controversé et est décrit alternativement comme un récepteur co-inhibiteur et co-activateur selon les modèles cellulaires d'études et les modalités de stimulation du récepteur ²¹⁹. La délétion de CRD1 ou la suppression de l'interaction de CD160 avec HVEM empêche l'inhibition de l'activation des LT CD4⁺. Par contre les cellules NK nécessitent CD160 pour produire de l'IFNγ, et les tumeurs B16, répondant aux cellules NK, inoculées à des souris RAG^{-/-} CD160^{-/-} se développent plus rapidement que chez les souris RAG^{-/-} ²²⁰.

HVEM est exprimé dans de nombreux tissus différents, avec une prévalence dans les poumons, les reins, et le foie, pour être moins exprimé dans le cœur et le pancréas. Il est également exprimé dans la plupart des cellules hématopoïétiques dont les lymphocytes T et B, les cellules NK, les monocytes et les neutrophiles. HVEM est plus fortement exprimé dans les cellules naïves, son expression étant diminuée juste après activation cellulaire pour augmenter de nouveau à un stade plus avancé de l'activation ²²¹.

BTLA et HVEM sont capables de s'associer en *cis* sur des cellules co-exprimant les deux récepteurs. Cette interaction *cis* se déroule principalement au stade naïf, et empêche la liaison de HVEM avec ses autres partenaires. Après l'activation de la cellule, HVEM est internalisé, ce qui provoque une interaction BTLA-HVEM en *trans*, induisant la signalisation activatrice en aval de HVEM. Il est difficile de déterminer si l'interaction *cis* provoque également une signalisation activatrice de la part de HVEM, et si cette signalisation entre en compétition avec celle inhibitrice de BTLA ²²². L'interaction en *cis* de HVEM avec ses autres ligands provoque une signalisation en aval de HVEM, dont l'activation de NFκB, mais l'interaction avec BTLA

n'induit qu'un faible signal de HVEM. Par contre, l'inhibition BTLA-médiée est maintenue même en présence saturante de HVEM en *cis*. LIGHT existe également sous forme soluble, et a un rôle différent sous cette forme que sous forme transmembranaire. Cette interaction *cis* joue également un rôle dans le processus d'homéostasie, possiblement pour éviter une suractivation cellulaire dû à l'interaction de HVEM avec d'autres ligands. LIGHT soluble a pour effet de stabiliser l'interaction *cis* entre BTLA et HVEM, tandis que sa forme activée rompt l'interaction et provoque l'internalisation de HVEM, promouvant l'activation cellulaire ²²³. HVEM peut également être activé par la forme soluble de BTLA et de CD160, qui induisent les signaux activateurs en aval de HVEM, sans l'induction de leur propres signaux inhibiteurs. Une étude comparant les affinités des ligands pour HVEM utilise des ectodomains solubles et établit une constante d'affinité plus grande pour BTLA, qui semble être le ligand préférentiel de HVEM, avec une constante de dissociation de 250nM.

C. Le récepteur PD-1

PD-1 (Programmed Cell Death 1) appartient à la famille des Ig SF, et comme BTLA contient un domaine cytoplasmique comportant des régions ITIM et ITSM, qui après liaison de PD-1 à ses ligands PD-L1 et PD-L2, recrutent des phosphatases à domaine SH2 SHP-1 et SHP-2 avec cette fois-ci un recrutement préférentiel pour SHP-2 par rapport à SHP-1 ²²⁴. Suite à la liaison avec PD-L1, PD-1 est co-localisé avec le TCR sous forme de clusters et inhibe la formation normale de la synapse immunologique, limitant les capacités des lymphocytes T CD8⁺ à tuer les cellules cibles. SHP-2 peut être recruté à la membrane vers les clusters de PD-1 mais pas SHP-1. Ce phénomène de clustering n'est pas lié aux motifs tyrosines sur les régions ITIM de PD-1, dédiés à l'induction de signaux inhibiteurs ²²⁵. L'activité phosphatase de SHP-2 a de plus la capacité de réguler la phosphorylation de PD-1. PD-1 a été décrit comme agissant particulièrement comme un inhibiteur de la signalisation de CD28, réprimant la prolifération et la production d'IL-2. Plus précisément, l'engagement de PD-1 inhibe la phosphorylation de molécule en aval de CD28, ainsi que son association avec PKC θ . Parmi les ligands de PD-1, PD-L1 est exprimé dans la plupart des cellules hématopoïétiques ainsi que dans de nombreux tissus non hématopoïétiques, particulièrement à la surface des cellules tumorales. Il s'agit du ligand principalement étudié en comparaison de PD-L2 qui lui est exprimé dans un nombre plus restreint de types cellulaires, tels que les DC et les macrophages. La déficience en PD-1 chez

la souris provoque le développement spontané de maladies auto-immunes de types Lupus, ou de type cardiomyopathie dilatée ^{226,227}. De plus, l'interruption du signal PD-1 mène à de meilleures réponses antitumorales, et les thérapies anticancéreuses basées sur le blocage de PD-1 sont les plus utilisées en clinique. PD-1 joue également un rôle important lors du développement thymique, notamment dans la régulation de la sélection positive et négative. Les souris PD-1^{-/-} présentent une diminution du nombre de cellules SP CD8⁺, une diminution de l'expression du marqueur d'activation CD69 dans les DP et une augmentation de l'expression de CD24 dans les thymocytes SP CD8⁺ suggérant une diminution de la maturation des thymocytes ²²⁸. D'autres travaux montrent aussi un défaut du nombre de cellules DP et SP CD4⁺ et CD8⁺ suite à la surexpression de PD-1 dans le thymus. De même, les souris PD-L1^{-/-} mais pas les souris PD-L2^{-/-} présentent un enrichissement de cellules thymiques au stade DP, suggérant un rôle de PD-1 dans la régulation de la sélection positive ²²⁹. En périphérie, l'expression de PD-1 augmente chez les cellules épuisées, et l'inhibition de la signalisation PD-1 médiée peut changer le phénotype épuisé des T_{EX} vers un phénotype effecteur lorsque les cellules ne sont au stade T_{EX}^{term}. Le rôle de PD-1 dans le maintien homéostatique des LT CD8⁺ est moins évident que celui de BTLA, mais l'absence de PD-1 induit une augmentation du nombre total de LT CD4⁺ et de LT CD8⁺ dans la rate et le foie, l'augmentation du nombre de CD8⁺ étant particulièrement drastique dans le foie. Les souris PD-1^{-/-} ont aussi plus de cellules effectrices CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ ainsi que d'expression du récepteur aux chimiokines CXCR6, mais un nombre moindre de cellules mémoires CD127⁺KLRG1⁻. Ceci suggère un rôle de PD-1 dans l'inhibition de signaux menant au maintien de cellules activées au profit d'un phénotype mémoire. Paradoxalement l'absence de PD-1 provoque une augmentation du marqueur d'épuisement TOX dans les CD8⁺, ce qui peut être expliqué par un phénomène compensatoire avec l'augmentation d'expression de différents Immune Checkpoints comme TIM-3, LAG-3 ou TIGIT. L'expansion de la population T_{EX} est ainsi augmentée en absence de PD-1 et cette expansion est dépendante du facteur de transcription EOMES, la déficience pour EOMES induit une expression de TOX similaire aux cellules provenant de souris sauvages ²³⁰.

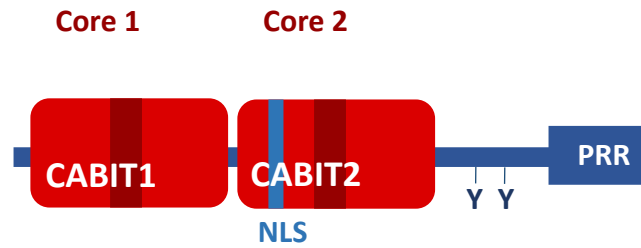
VI. THEMIS

Ce projet de thèse s'intéresse particulièrement à une protéine intracytoplasmique appelée THEMIS, et à son rôle sur les signaux inhibiteurs médiés par les Immune Checkpoints PD-1 et BTLA.

THEMIS1 est une protéine de 72.8 kDa découverte en 2009 par plusieurs équipes de recherche de manière simultanée²³¹⁻²³⁵. Le gène *themis* est localisé chez la souris sur le chromosome 10 et sur le chromosome 6 chez l'homme, avec une correspondance de 81% entre l'homme et la souris ²³³. THEMIS1 fait partie de la famille globale THEMIS comportant trois protéines : THEMIS1 exprimée principalement dans les Lymphocytes T, mais aussi dans les cellules NK et les mastocytes. THEMIS2 est fortement exprimée dans les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les macrophages, tandis que THEMIS3 est exprimée dans les cellules intestinales ²³⁶. Dans cette étude, nous nous concentrons sur l'action de THEMIS1 dans les lymphocytes T, désigné dans le reste du manuscrit par THEMIS. THEMIS a été caractérisée dès sa découverte comme essentielle pour le développement des lymphocytes T, particulièrement l'étape de la sélection positive. THEMIS joue un rôle dans le maintien d'un signal TCR propice au développement des thymocytes matures SP. Au niveau structurel, la protéine THEMIS est composée de deux modules fonctionnels nommés CABIT (cystein-containing all- β in Themis), d'une région PRR (proline rich region) en C-terminal, et d'une région NSL (Nuclear Signal localization) de localisation nucléaire^{234, 235}. (Figure 10A) Des estimations par modélisation informatique des domaines CABIT ont prédit une structure en 12 feuillets β , et la présence d'un résidu cystéine conservé chez les autres membres de la famille THEMIS. Des approches d'immunoprécipitation et de spectrométrie de masse ont identifié Grb2 comme partenaire principal de THEMIS. Ces deux protéines interagissent de manière directe, via le domaine SH3 N-terminal de Grb2 qui se lie à la région PRR de THEMIS ²³¹ (Figure 10A).

A.

THEMIS



B.

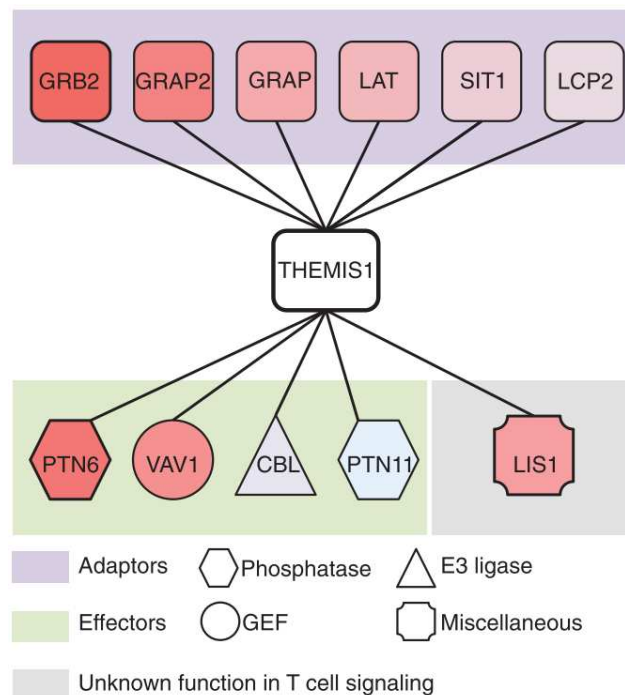


Figure 10. (A.) Structure de la protéine THEMIS, composée de deux modules CABIT, une région PRR, une région de localisation nucléaire NLS, et des sites tyrosines de phosphorylation. *Adapté de Johnson et al. THEMIS is a member of new metazoan gene family and is required for completion of thymocyte positive selection, Nature Immunology, 2009* (B.) Schéma des protéines interagissant avec THEMIS dans les thymocytes. *Zvezdova et al. Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting VAV1 activity and Grb2 stability, Science Signaling, 2016*

A. THEMIS dans le développement thymique

THEMIS a d'abord été caractérisée comme molécule protéique essentielle au développement des lymphocytes T dans le thymus. Une souris possédant une invalidation du gène codant pour THEMIS ou une mutation génétique résultant dans l'expression d'une forme tronquée présentent une diminution drastique du nombre de cellules SP CD4⁺ et dans une plus faible mesure, de cellules SP CD8⁺, dans le thymus comme dans les nœuds lymphatiques ^{233,235}. Parallèlement, le nombre de cellules au stade DP est plus élevé dans les souris THEMIS^{-/-} que chez les souris sauvages, suggérant que THEMIS agit au cours du développement des thymocytes en stimulant la sélection positive. L'absence de THEMIS provoque la diminution de la population CD4⁺CD8^{int}, concordant avec une perte de sélection positive. Les deux populations CD4⁺ et CD8⁺ présentent également une perte d'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD5, suggérant une diminution de l'intensité des signaux du TCR en absence de THEMIS. L'absence de THEMIS conduit aussi à une diminution des signaux nécessaires à la sélection négative ¹⁷².

THEMIS est fortement exprimé au cours du développement thymique, particulièrement dans les cellules DP. Les premières études décrivent une faible expression de la protéine THEMIS, ainsi que du niveau d'ARNm chez les thymocytes au stade DN1 et DN2. L'expression de THEMIS augmente ensuite au stade DN3 pour être maintenue durant le passage au stade DN4, atteignant un pic d'expression dans les thymocytes DP TCR^{low} en pré-sélection. L'expression de THEMIS diminue au cours de la maturation chez les thymocytes DP TCR^{int} et TCR^{high} pour être maintenue à un niveau plus faible dans les SP CD4⁺ et CD8⁺ matures. Plus précisément, une étude de l'expression protéique de THEMIS montre un pic d'expression aux stades précoces de la sélection positive dans les populations DP CD5^{high}CD69^{high} par rapport aux DP CD5^{low}CD69^{low} pour diminuer dans les thymocytes immatures SP CD69^{high} et atteindre une plus faible expression chez les thymocytes matures SP CD69^{low}, de manière équivalente entre les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ ^{233,235,237}.

THEMIS est directement associé à la protéine adaptatrice Grb2, par le domaine SH3 de Grb2, et le domaines PRR1 de THEMIS. Cette association est requise pour le recrutement de THEMIS à LAT (Figure 10B). En absence d'interaction entre THEMIS et Grb2, THEMIS n'interagit plus avec LAT et PLCγ1, et THEMIS n'est plus recruté au sein de la synapse immunologique. THEMIS est phosphorylé par Lck et ZAP-70 sur ses tyrosines Y₅₄₀ et Y₅₄₁. Des souris présentant une

forme de THEMIS mutée sur la région PRR1 présentent un défaut de SP CD4⁺ similaire à celui observé dans les souris THEMIS^{-/-}, suggérant que l'interaction entre THEMIS et Grb2, et par extension le recrutement de THEMIS à la membrane, est nécessaire au développement thymique ²³⁸. L'interaction avec Grb2 permet également l'association des phosphatases à domaine SH2 SHP-1 et SHP-2 à THEMIS. L'absence du domaine PRR1 réduit la co-immunoprécipitation des deux phosphatases avec THEMIS ²³⁹. Les différents domaines de THEMIS ont différentes fonctions, mais chacun des motifs est nécessaire au développement thymique. Des travaux basés sur la génération de formes mutantes de THEMIS invalidant les CABIT ou la régions PRR montre que chacun de ces domaines contribue aux effets de THEMIS sur le développement des thymocytes. Ces mutants ne sont plus associés à Grb2, et ne sont pas phosphorylés. La localisation nucléaire de THEMIS est garantie par le domaine CABIT1, et l'effet de l'absence de CABIT1 sur le développement thymique est plus drastique que l'absence de CABIT2 ²⁴⁰. En effet, une mutation invalidante du domaine CABIT1 ou de la région NLS résulte en un défaut de localisation nucléaire de THEMIS, et les souris présentant une mutation invalidante sur le domaine CABIT1, mais sur le CABIT2 ont un défaut de SP CD4⁺ et SP CD8⁺ dans le thymus, et une diminution de la phosphorylation de ERK. Ces souris sont également incapables de restaurer le défaut de sélection positive dans les souris THEMIS^{-/-}.

B. THEMIS : Sélection positive ou négative ?

Plusieurs groupes ont différentes interprétations sur le rôle de THEMIS dans le développement thymique. L'une d'elle suggère que THEMIS agit en bloquant la sélection négative en recrutant la phosphatase SHP-1 qui réprimerait les signaux du TCR forts transmis de façon « inappropriée » par des ligands de relativement faible affinité. Dans ce modèle, l'absence de THEMIS conduirait à une forme de sélection négative exacerbée pour des cellules qui seraient, en conditions normales, sélectionnées positivement. Une absence de THEMIS cause une phosphorylation de ERK accrue en condition de reconnaissance de peptide du soi de faible affinité, ainsi qu'une activation de la Caspase 3 ²⁴¹. Le rôle de THEMIS de modulateur négatif des signaux TCR est appuyé par l'augmentation de l'activation de ERK après un knockdown de THEMIS dans des cellules Jurkat. Le knockdown de THEMIS induit une plus grande phosphorylation de la tyrosines Y₁₄₂ sur la chaîne ζ du TCR ²³⁹. En périphérie, une expression plus faible de THEMIS induite par des approches d'extinction d'ARN engendre une

augmentation de l'expression de CD69 et de CD25. La stimulation du TCR dans les lymphocytes T primaires humains entraîne une expression de l'Annexine V en absence de THEMIS, suggérant une induction d'apoptose provoquée par un signal TCR trop fort. Le même phénomène est observé en condition d'expression réduite de SHP-1. De plus, une étude montre que l'activité phosphatase après immunoprécipitation de SHP-1 est diminuée dans les thymocytes n'exprimant pas THEMIS. Dans cette étude, les auteurs montrent que la sélection du gène codant pour SHP-1 au stade DP ne rétablit pas le développement thymique dans les souris THEMIS^{-/-} ²⁴². En absence de SHP-1, l'activité phosphatase associée à THEMIS après immunoprécipitation reste à un niveau similaire à celle observée en conditions WT. Ceci est expliqué par les auteurs par un effet compensatoire de SHP-2 qui se lie de manière accrue à THEMIS en absence de SHP-1. D'autre part, un article étudiant les réponses des lymphocytes T CAR (Chimeric Antigen Receptor), montre une phosphorylation de la chaîne ζ du récepteur 4-1BB en présence du complexe THEMIS-SHP-1, concordant avec l'hypothèse que THEMIS permet le recrutement de SHP-1 au complexe TCR et promeut ainsi son activité inhibitrice²⁴³.

Ce modèle est en contradiction avec un autre modèle suggérant que THEMIS stimule la signalisation du TCR en inhibant l'activité phosphatase de SHP-1. Une étude montre que les modules CABIT de THEMIS se lient au domaine phosphatase de SHP-1 et régule négativement l'activité de sa cystéine catalytique. SHP-1 est oxydée dans les cellules stimulées par du pervanadate ou du peroxyde d'hydrogène. L'oxydation de la tyrosine catalytique de SHP-1 par les ROS (Reactive Oxygen Species) entraîne une diminution de l'activité phosphatase de SHP-1. Cette forme oxydée diminue dans les lymphocytes T issus de souris THEMIS^{-/-} traités au pervanadate ou avec de l'H₂O₂. Il est à noter que la phosphorylation des tyrosines Y₅₆₄ et Y₅₃₆ diminue également en absence de THEMIS. Les auteurs estiment que cette diminution est due à l'augmentation de l'activité phosphatase de SHP-1, qui provoque une auto-dephosphorylation. En effet, à l'ajout de pervanadate, répresseur de l'activité phosphatase, il y a une augmentation de la phosphorylation de SHP-1 en présence comme en absence de THEMIS. De plus, dans des expériences de culture *in vitro*, le nombre de CD4⁺ diminué par l'absence de THEMIS augmente de nouveau à l'ajout d'un inhibiteur de SHP-1 (SSG). Le groupe de Paul Love a d'ailleurs montré que la délétion du gène codant pour SHP-1 au stade DN en utilisant deux modèles conditionnels distincts restaure le développement des thymocytes et le nombre de lymphocytes T périphériques. L'utilisation de souris reporter transgéniques Nur-

77-GFP qui permet d'évaluer l'intensité des signaux TCR dans les lymphocytes T *in vivo*, indique que THEMIS stimule les signaux du TCR *in vivo* au cours de la sélection positive ²⁴⁴.

La question se pose donc du rôle de THEMIS sur la signalisation. Lorsque les thymocytes sont stimulés par la Concanavalline A, soit une stimulation engendrant des ROS, la phosphorylation de ZAP-70 diminue en absence de THEMIS. Cet effet n'est pas observé dans des conditions de stimulation basée sur l'utilisation d'anticorps par anti-CD3. En revanche, l'absence de THEMIS entraîne une diminution de la phosphorylation de ZAP-70 et Lck dans des cellules stimulées par anticorps anti-CD3 en conditions de culture générant des ROS. ZAP-70 et Lck étant des cibles de SHP-1, les auteurs supposent que la capacité de THEMIS à bloquer SHP-1 est modulée par la présence de ROS. THEMIS pourrait agir plus spécifiquement sur le facteur d'échange VAV1 qui est un des partenaires majoritaires de THEMIS dans les thymocytes et les lymphocytes T périphériques. THEMIS stimule l'activité du facteur d'échange VAV1 dans les thymocytes. La phosphorylation de VAV1 sur ses tyrosines activatrices est diminuée en absence de THEMIS en conditions de stimulation du TCR. À l'inverse, chez des souris AND la surexpression de THEMIS engendre une augmentation du pourcentage de cellules SP CD4⁺ CD24^{low} montrant une sélection positive plus efficace. La surexpression de THEMIS est capable de rétablir la phosphorylation de VAV1 et la sélection positive dans les thymocytes Grb2^{+/-}. Cependant, cet effet n'est plus observé en absence de signaux provenant de la chaîne ζ du TCR, impliquant que THEMIS agit particulièrement sur la signalisation liée à Grb2 ^{245,246}.

Enfin, *in vivo*, l'absence de THEMIS dans des souris immunisées par un peptide I-Eα induit une diminution des réponses antigéniques des lymphocytes Th1. Au contraire, THEMIS inhibe la production d'IFNγ de Th1 dans des cultures *in vitro*. Ces résultats suggèrent qu'en contexte *in vivo*, THEMIS pourrait avoir un rôle activateur des signaux du TCR en agissant sur un récepteur non engagé dans un contexte de culture *in vitro* ²⁴⁷.

C. Rôle de THEMIS à la périphérie

Les caractéristiques fonctionnelles de THEMIS ont d'abord été décrite dans le processus de développement thymique des lymphocytes T. Les travaux étudiant son rôle dans les lymphocytes matures sont plus récents. Certaines études portant sur des souris présentant une déficience germinale de THEMIS notent que l'absence de THEMIS dans les LT CD4⁺

provoque en culture *in vitro* une diminution des capacités cellulaires, notamment la prolifération et le niveau d'expression du marqueur d'activation CD25. Le défaut de prolifération est de nouveau observé dans une expérience de transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ dans des souris RAG^{-/-}. Ces cellules ont également un métabolisme réduit en comparaison de cellules qui expriment THEMIS. L'expression du récepteur à l'insuline, ainsi que du transporteur de glucose GLUT1 sont réduites suite à la stimulation du TCR. L'expression du gène du récepteur à l'insuline est régulée par le facteur de transcription NFAT, dont l'expression est diminuée après stimulation du TCR dans les CD4⁺ en absence de THEMIS. L'absence de THEMIS provoque une augmentation de la quantité de glutamate et glutamine intracellulaire, impliquant une activité mitochondriale accrue, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de pS6, substrat de la kinase mTOR, et ainsi une diminution de cMyc²⁴⁸. Cependant, les effets de l'absence de THEMIS dans cette étude pourraient être influencés par la lymphopénie induite par l'absence de THEMIS dans les thymocytes au cours du développement des lymphocytes T.

D'autres travaux réalisés en utilisant des souris sélectivement déficientes pour THEMIS dans les lymphocytes T périphériques ne révèlent pas d'effet drastique de l'absence de THEMIS sur les fonctions de LT CD4⁺ naïfs après stimulation du TCR *in vitro*, que ce soit sur la prolifération ou sur la production de cytokine. À l'inverse, lors d'une culture de CD4⁺ polarisés en Th1, l'absence de THEMIS provoque une augmentation de la production d'IFN γ , suggérant un rôle inhibiteur de THEMIS sur la polarisation²⁴⁷. L'absence de THEMIS n'a pas d'effet sur la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers les sous-populations effectrices Th2 et Th17, suggérant un effet spécifique sur les réponses de type 1. Cet effet s'accompagne d'une augmentation sélective de l'expression de THEMIS dans les lymphocytes CD4 polarisés en conditions Th1. Il est aussi corrélé avec une augmentation de la phosphorylation de ERK observée en absence de THEMIS dont l'activité est nécessaire à la sécrétion d'IFN γ en condition de polarisation Th1²⁴⁹.

Cependant, lorsqu'il s'agit de cellules CD4⁺ pré-polarisées en Th1, l'absence de THEMIS au contraire induit une diminution de la production d'IFN γ . Ces résultats sont corroborés par des études *in vivo*. Dans un modèle d'immunisation en présence de CFA, l'absence de THEMIS dans les lymphocytes T périphériques provoque une diminution du nombre de cellules T-bet⁺ et IFN γ ⁺CD44^{high}, impliquant plutôt un rôle stimulateur de THEMIS dans le développement des réponses de type 1 *in vivo*. La déficience conditionnelle en THEMIS dans les lymphocytes T

périphériques entraîne aussi une diminution de l'auto-immunité du système nerveux central dans le modèle d'EAE associé à une diminution de la pathogénicité des cellules spécifiques du peptide MOG₃₅₋₅₅ (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) et de leur capacité à se différencier en cellules T-bet⁺ IFN γ ⁺. Ces résultats impliquent que THEMIS stimule ou inhibe les signaux du TCR selon le contexte biologique et de l'état d'activation cellulaire.

En plus de moduler l'activation des LT effecteurs, THEMIS est impliqué dans le maintien des LT naïfs. En effet, la délétion post-thymique du gène codant pour THEMIS induit une diminution du nombre de LT CD8⁺ en périphérie, mais pas de LT CD4⁺ ²⁵⁰. Le défaut conditionnel de THEMIS dans les LT périphériques mène à une diminution de la LIP lors d'un transfert adoptif de CD8⁺ OT1⁺ dans des souris RAG1^{-/-}. Des résultats similaires sont obtenus lorsque les lymphocytes T CD8⁺ exprimant le TCR OT1 sont transférées dans des souris irradiées β 2m^{-/-}. Ces souris n'expriment pas de CMHI, ceci suggère que le défaut de prolifération homéostatique observé en absence de THEMIS n'est pas lié uniquement à un défaut de signalisation du TCR ²⁵¹. Lors de stimulation des cellules avec des peptides OVA, reconnus par le TCR OT1, de différentes affinités, l'absence de THEMIS réduit la prolifération en conditions de faible affinité, et cet effet n'est plus observé avec un peptide de plus haute affinité. Cette diminution de la prolifération s'explique par une réduction de l'activation d'Akt, de pS6, cMyc et Foxo1 en condition de stimulation par cytokines IL-7 et IL-12. THEMIS agit donc sur la prolifération spécifiquement en conditions mimant une prolifération homéostatique, en promouvant l'intégration des signaux en aval des récepteurs de cytokines, particulièrement la voie Akt. La LIP nécessite des signaux provenant de cytokines, ainsi que de signaux TCR faibles, provenant d'antigène de faible affinité. Les capacités prolifératives de lymphocytes T CD8⁺ naïfs sont réduites en absence de THEMIS dans des cultures contenant des combinaisons de cytokines tels que l'IL-7 et l'IL-12. Des résultats similaires sont obtenus lors de stimulation par de l'IL-2 ou de l'IL-15. L'absence de THEMIS provoque un défaut de prolifération, mais aussi une diminution de l'expression de CD44, CD25 et CD132 des marqueurs exprimés dans des conditions de prolifération homéostatiques. La déficience en THEMIS entraîne une diminution de la phosphorylation de Jak1, Jak3, STAT5 et une diminution de la voie Akt-mTOR dans des conditions de stimulation par de l'IL-2 et de l'IL-15. L'absence de THEMIS dans des cellules stimulées dans ces conditions affecte également les changements métaboliques, induisant un défaut d'assimilation du glucose.

Des analyses suggèrent que THEMIS stimule la signalisation des récepteurs à l'IL-2 et IL-15 en bloquant l'activité catalytique de la phosphatase SHP-1. La délétion du gène codant pour SHP-1 restaure nombre de lymphocytes CD8⁺ dans les souris déficientes en THEMIS dans les lymphocytes périphériques. La déficience en SHP-1 restaure aussi une signalisation normale en réponse à l'IL-2 et IL-15 en absence de THEMIS induite par et des capacités de prolifération de ces CD8⁺ en stimulation IL-7 et IL-12, mais aussi IL-15. L'ensemble de ces travaux impliquent qu'à l'instar du contexte de développement thymique, THEMIS stimule la prolifération et le métabolisme cellulaire en conditions homéostatiques en bloquant la phosphatase SHP-1.

Objectif : Analyser les effets de THEMIS sur la signalisation inhibitrice de BTLA et PD-1

THEMIS est une protéine exprimée au stade DP du développement thymique, essentielle pour la sélection positive des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans le thymus. Le rôle de THEMIS dans le développement thymique est cependant controversé. THEMIS agit sur la phosphatase SHP-1 en bloquant son activité inhibitrice. Il a aussi été montré que THEMIS favorise les signaux issus de récepteurs aux cytokines lors du maintien des lymphocytes T CD8⁺ à la périphérie.

BTLA et PD-1 sont deux Immune Checkpoints qui agissent recrutant des phosphatases à domaine SH2 sur leur queue cytoplasmique après leur engagement par leurs ligands respectifs. Les deux récepteurs ont une tendance à recruter préférentiellement l'une ou l'autre des phosphatases, SHP-1 pour BTLA, et SHP-2 pour PD-1.

La question est donc de déterminer si THEMIS agit sur les phosphatases SHP-1 et SHP-2 dans le contexte de leur recrutement aux Immune Checkpoints BTLA et PD-1, et donc, si THEMIS est capable de bloquer les signaux inhibiteurs de ces récepteurs.

Cette étude consiste ainsi à examiner les effets de THEMIS sur les capacités de BTLA et PD-1 à réprimer l'activation et la différenciation des lymphocytes T par des expériences *in vitro* en utilisant des souris déficientes pour THEMIS en périphérie, ou surexprimant THEMIS.

Il s'agit ensuite de comprendre les mécanismes d'action de THEMIS sur la phosphatase SHP-1 dans le contexte de son association à BTLA, et quelles répercussions THEMIS a sur les événements de la signalisation du TCR.

Cette étude vise ensuite à étudier les effets de THEMIS sur la signalisation de BTLA et PD-1 dans le contexte physiologique du développement thymique, dans lequel THEMIS est essentiel. Enfin, nos travaux visent à déterminer les effets de THEMIS sur la capacité de BTLA à inhiber les signaux issus des récepteurs à l'IL-2 et l'IL-15 dans le contexte du maintien des lymphocytes T CD8⁺.

Résultats



THEMIS promotes T cell development and maintenance by rising the signaling threshold of the inhibitory receptor BTLA

Suzanne Mélique^a, Aurélie Vadel^a, Nelly Rouquié^a , Cui Yang^a , Cyrielle Bories^a , Coline Cotineau^a, Abdelhadi Saoudi^a , Nicolas Fazilleau^a , and Renaud Lesourne^{a,1}

Edited by Kenneth Murphy, Washington University in St. Louis School of Medicine, St. Louis, MO; received October 26, 2023; accepted April 12, 2024

The current paradigm about the function of T cell immune checkpoints is that these receptors switch on inhibitory signals upon cognate ligand interaction. We here revisit this simple switch model and provide evidence that the T cell lineage protein THEMIS enhances the signaling threshold at which the immune checkpoint BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator) represses T cell responses. THEMIS is recruited to the cytoplasmic domain of BTLA and blocks its signaling capacity by promoting/stabilizing the oxidation of the catalytic cysteine of the tyrosine phosphatase SHP-1. In contrast, THEMIS has no detectable effect on signaling pathways regulated by PD-1 (Programmed cell death protein 1), which depend mainly on the tyrosine phosphatase SHP-2. BTLA inhibitory signaling is tuned according to the THEMIS expression level, making CD8⁺ T cells more resistant to BTLA-mediated inhibition than CD4⁺ T cells. In the absence of THEMIS, the signaling capacity of BTLA is exacerbated, which results in the attenuation of signals driven by the T cell antigen receptor and by receptors for IL-2 and IL-15, consequently hampering thymocyte positive selection and peripheral CD8⁺ T cell maintenance. By characterizing the pivotal role of THEMIS in restricting the transmission of BTLA signals, our study suggests that immune checkpoint operability is conditioned by intracellular signal attenuators.

T cell | immune checkpoint | signaling | BTLA | THEMIS

T cells express a set of inhibitory receptors (designated immune checkpoints) which enhance the threshold of T cell responsiveness to antigens and attenuate the magnitude of T cell effector responses by negatively regulating signals elicited by the T cell antigen receptor (TCR) and costimulatory receptors (1, 2). Therapies based on immune checkpoint blockade have revolutionized the field of cancer immunotherapy resulting in durable remission in patients with tumors that previously were uniformly fatal. However, a high proportion of patients are resistant to checkpoint blockade treatments (3–5), although targeted receptors are expressed on tumor-infiltrating immune cells, suggesting that additional layers of regulation modulate the functional capacity of these receptors.

B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA) and Programmed cell death protein 1 (PD-1) are structurally related immune checkpoints that regulate T cell homeostasis and effector responses at multiple stages (6–8). Stimulation of BTLA and PD-1 by their natural ligands, Herpes virus entry mediator (HVEM) and Programmed death-ligand 1 (PD-L1) respectively, leads to the recruitment to their cytoplasmic tails of the protein tyrosine phosphatases (PTP) src homology-2 (SH2) domain-containing phosphatase (SHP)-1 and SHP-2 that dephosphorylate and inactivate signaling proteins, downstream of the TCR and CD28 (9–12). Each receptor recruits both phosphatases with different stoichiometries, with BTLA interacting predominantly with SHP-1 and PD-1 interacting predominantly with SHP-2 (10, 11). The T-lineage protein thymocyte-expressed molecule involved in Selection (THEMIS) has been identified as an inhibitor of the catalytic activity of SHP-1 and to a lesser extent of SHP-2 (13). This action is mediated by globular domains on THEMIS, named cysteine-containing, all-beta in Themis (CABIT) modules (14), which bind to the PTP domain of SHP1/2 and promote oxidation of their catalytic cysteine by reactive oxygen species, resulting in inhibition of PTP activity (13, 15). Analysis of THEMIS-deficient mouse models revealed that THEMIS is critical for T cell development (14, 16, 17) and peripheral CD8⁺ T cell homeostasis (18). Although the *in vivo* defects associated with THEMIS deficiency are suggestive of reduced TCR signal intensity, most studies have failed to detect significant signaling defects caused by the loss of THEMIS following TCR cross-linking *in vitro* (14, 16, 17, 19). This indicates that THEMIS could operate in the context of other signaling receptors.

Here, we found that THEMIS enhances TCR signals by restraining the signaling capacity of the inhibitory receptor BTLA. THEMIS is recruited to the cytoplasmic tail of BTLA together with the adapter protein GRB2 (Growth factor receptor-bound protein) and inactivates SHP-1 by promoting/stabilizing the oxidation of its catalytic cysteine. In

Significance

Therapies based on immune checkpoint blockades have revolutionized the field of cancer immunotherapy, yet the molecular mechanism underlying the signaling activity of these receptors remains ill-defined. Here, we show that the T cell lineage protein THEMIS operates as a rheostat which restrains the signaling capacity the inhibitory receptor BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator). THEMIS promotes T cell development and maintenance by conferring to T cells the capacity to resist to BTLA-mediated inhibition. Our findings suggest that the operability of immune checkpoints depends on intracellular factors that regulate the signaling thresholds at which these receptors inhibit T cell responses. This improves our understanding of immune checkpoint operability which was mainly described as a simple switch mechanism relying solely on cognate ligand interactions.

Author affiliations: ^aToulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), INSERM UMR1291, CNRS UMR5051, University Toulouse III, Toulouse 31024, France

Author contributions: S.M., A.S., N.F., and R.L. designed research; S.M., A.V., N.R., C.Y., C.B., and C.C. performed research; S.M., C.B., C.C., N.F., and R.L. analyzed data; and R.L. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Copyright © 2024 the Author(s). Published by PNAS. This article is distributed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 \(CC BY-NC-ND\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

¹To whom correspondence may be addressed. Email: renaud.lesourne@inserm.fr.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2318773121/-/DCSupplemental>.

Published May 7, 2024.

contrast, THEMIS has no detectable regulatory effect on the PD-1-SHP-2 inhibitory axis. THEMIS operates as a rheostat, conferring on T cells the capacity to resist to BTLA-mediated inhibition according to its expression levels, which is variable across T cell subsets. This mechanism is critical for thymocyte development, enabling signals elicited by the TCR to reach the threshold of positive selection, and for the maintenance of naive CD8+ T cells, enhancing homeostatic signals driven by low-affinity TCR ligands and cytokines.

Results

The Inhibitory Function of BTLA Is Repressed by THEMIS in Peripheral T cells. We hypothesized that THEMIS could regulate the inhibitory functions of BTLA and PD-1 and first focused our investigations on BTLA which interacts predominantly with SHP-1 (11, 20), a major binding partner of THEMIS (21). The ability of THEMIS to modulate the inhibitory functions of BTLA was analyzed in vitro in T cells isolated from mice that harbor a conditional deletion of the *Themis* gene in peripheral T cells (*Cd2-Cre+ Themis^{fllox/fllox}*, referred to as *Themis^{TKO}* mice) (22). We first stimulated naive CD4+ and CD8+ T cells from *Cd2-Cre-neg Themis^{fllox/fllox}* (referred to as *Themis^{TWT}*) and *Themis^{TKO}* mice with variable amounts of plate-bound anti-CD3 antibodies in the presence of different concentrations of agonist antibodies against BTLA or isotype control antibody and compared the ability of BTLA to inhibit the proliferation of cells induced in response to TCR stimulation. In the presence of THEMIS, the costimulation of the TCR and BTLA mildly inhibited the proliferation of CD4+ T cells but had no detectable inhibitory effects on the percentages of proliferating CD8+ T cells (Fig. 1 *A* and *B* and *SI Appendix, Fig. S1*). The inhibitory effects of BTLA in CD4+ T cells increased with the amount of stimulatory antibody against BTLA, resulting in a 25% decrease of proliferation at the highest antibody doses (Fig. 1*A* and *SI Appendix, Fig. S1*). In the absence of THEMIS in similar conditions, the stimulation of BTLA together with the TCR decreased by 50% the percentage of cells that proliferated, indicating increased inhibitory capacity of BTLA (Fig. 1*A* and *SI Appendix, Fig. S1*). Most strikingly, the absence of THEMIS conferred on BTLA the capacity to inhibit CD8+ T cell proliferation, reaching 60% inhibition when cells were stimulated with a combination of low and high amounts of anti-TCR and anti-BTLA antibodies, respectively (Fig. 1*B* and *SI Appendix, Fig. S1*). Similar increase of BTLA inhibitory functions were observed in THEMIS-deficient CD8+ T cells when BTLA was stimulated with recombinant HVEM, indicating that this effect was conserved when BTLA was stimulated with its natural ligand (Fig. 1*C*). The loss of THEMIS had no detectable effect on BTLA surface expression upon antibody-mediated TCR and CD28 stimulation (*SI Appendix, Fig. S2A*), indicating that the increased ability of BTLA to inhibit T cell activation in the absence of THEMIS was not the consequence of higher BTLA surface expression.

The capacity of BTLA to inhibit the expression of activation markers and the production of cytokines induced upon TCR stimulation was also increased in *Themis^{TKO}* CD4+ and CD8+ T cells in comparison to that in control *Themis^{TWT}* cells (Fig. 1*D*). We previously showed that the loss of THEMIS leads to an exacerbated production of IFN γ by CD4+ T cells stimulated in T_H1 polarizing conditions in the presence of anti-CD3 antibodies, whereas in vivo, THEMIS deficiency results in a decreased production of IFN γ and expression of the transcription factor T-box Expressed in T cells (T-BET) in effector CD4+ T cells specific of self- or foreign antigens (22). We hypothesized that this

discrepancy could reflect the ability of THEMIS to modulate the signaling capacity of receptors which would not be engaged in a reductionist in vitro model exclusively based on TCR stimulation (22, 23). Thus, we examined whether THEMIS could stimulate the production of IFN γ and T-BET in T_H1-polarized cells by repressing the ability of BTLA to inhibit those responses. In agreement with our previous observation (22), the loss of THEMIS was associated with an enhanced production of IFN γ in CD4+ T cells stimulated in T_H1 conditions with no detectable effect on T-BET expression (Fig. 1*E* and *SI Appendix, Fig. S1*). The proliferation and the production of IFN γ , as well as the expression of the transcription factor T-BET, were mildly inhibited by BTLA in THEMIS-sufficient CD4+ T cells polarized in T_H1 conditions but became strongly repressed upon BTLA stimulation in the absence of THEMIS (Fig. 1*E*), recapitulating in vitro the stimulatory effect of THEMIS on T_H1 responses that was previously detected in vivo (22). Together, these results indicated that the loss of THEMIS increased the capacity of BTLA to inhibit the activation of CD4+ and CD8+ T cells and the differentiation of naive CD4+ T cells into T_H1 cells.

We noticed that the capacity of BTLA to inhibit T cell activation was more pronounced in CD4+ T cells than in CD8+ T cells (Fig. 1 *A* and *B*). We hypothesized that this could result from the lower amount of THEMIS expressed in CD4+ T cells relatively to that in CD8+ T cells (*SI Appendix, Fig. S2B* and ref. 24). We thus analyzed whether enhancing the amount of THEMIS in CD4+ T cells, through transgenic expression (*Themis^{Tg}* mice), could repress the inhibitory functions of BTLA. The expression level of THEMIS in CD4+ T cells from *Themis^{Tg}* mice was increased by eightfold relatively to that in wild-type cells, far beyond the amount of THEMIS expressed in CD8+ T cells (*SI Appendix, Fig. S2B*). We then stimulated naive CD4+ T cells from *Themis^{WT}* and *Themis^{Tg}* mice with a low amount of plate-bound anti-CD3 antibodies, which favored inhibition of CD4+ T cell responses upon BTLA stimulation (Fig. 1 *A* and *F*). The ability of BTLA to inhibit CD4+ T cell proliferation was blocked in the context of THEMIS transgenic expression (Fig. 1*F*). Confirming the stimulatory effect of THEMIS on T_H1 responses, we also observed that the transgenic expression of THEMIS could block BTLA-mediated inhibition in T_H1-polarized cells and restored proliferation and production of IFN γ to levels comparable to those observed when the TCR was stimulated alone (Fig. 1*G*). THEMIS transgenic expression could also block BTLA-mediated inhibition of T_H1 responses when cells were stimulated with recombinant HVEM (Fig. 1*H*). To determine whether THEMIS transgenic expression could repress the inhibitory effect of BTLA on CD4+ T cell expansion in vivo, we administered BTLA agonist antibodies to *Themis^{WT}* and *Themis^{Tg}* mice previously immunized with a peptide variant of the I-E α chain immunodominant peptide 52-68 (EAWGALANKAVDKA, hereafter called the I-E α peptide), and followed antigen-specific CD4+ T cells by staining cells from the draining lymph nodes with the I-E α -pMHCII tetramer. In *Themis^{WT}* mice, the percentages of tetramer+ CD4+ T cells were decreased upon injection of BTLA agonist antibodies in comparison to that in the control PBS group, reflecting a decreased expansion of antigen-specific CD4+ T cells (Fig. 1*I*). In contrast, injection of BTLA agonist antibodies in *Themis^{Tg}* mice had no detectable effects on the percentages of tetramer+ CD4+ T cells (Fig. 1*I*), indicating that THEMIS transgenic expression restrained the capacity of BTLA to inhibit the expansion of antigen-specific CD4+ T cells. Collectively, these results demonstrated that THEMIS enhances peripheral T cell responses by repressing the inhibitory function of BTLA in peripheral T cells.

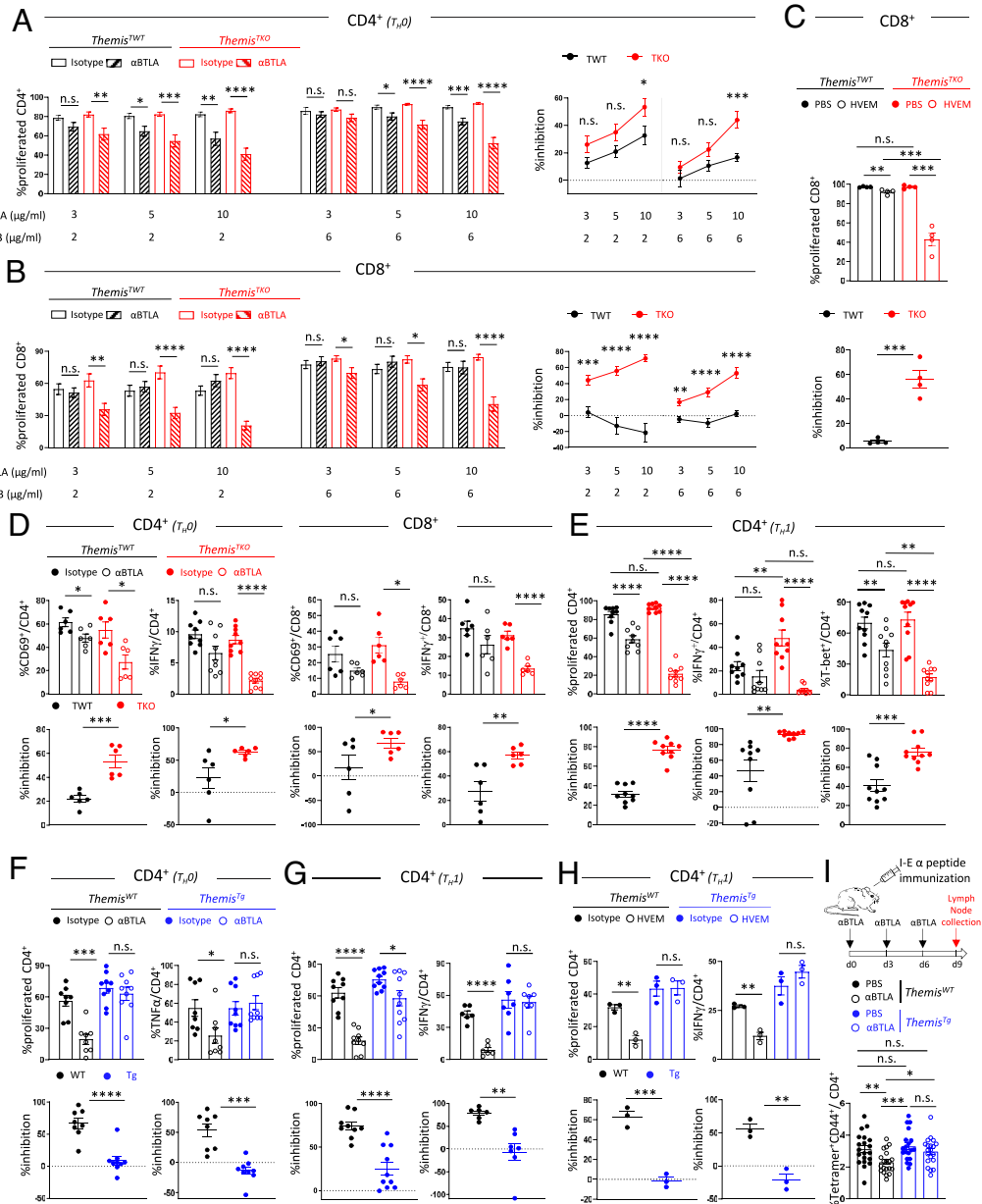


Fig. 1. THEMIS represents the inhibitory functions of BTLA in peripheral T cells. (A and B) Naive CD44-CD25- CD4⁺ T cells (A) and CD8⁺ T cells (B) from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice were stained with CellTrace violet (CTV) and stimulated with the indicated doses of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of the indicated doses of plate-bound anti-BTLA antibodies or isotype control antibody for 72 h. Bar graphs represent the percentages of cells that divided at least one time as determined by flow cytometry at 72 h. Curves represent the percentages of inhibition of proliferation by BTLA in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} (black curves) and *Themis*^{TKO} (red curves) mice. Data are mean ± SEM and represent four to five independent experiments each including n = 3 mice per group. (C) Naive CD44-CD25- CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence or not of plate-bound HVEM-Fc recombinant protein. Bar graphs represent the percentages of cells that proliferated. Dot graphs represent the percentage of inhibition of proliferation by BTLA in CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} (black curves) and *Themis*^{TKO} (red curves) mice. (D) Naive CD44-CD25- CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice were stimulated with anti-CD3 (6 to 8 μg/mL) and anti-CD28 antibodies in the presence of plate-bound anti-BTLA antibodies or isotype control antibody. Bar graphs represent the percentages of cells that are positive for CD69 and IFN γ staining as determined by flow cytometry at 24 and 72 h respectively. Dot graphs represent the percentages of inhibition of each response by BTLA in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} (black dots) and *Themis*^{TKO} (red dots) mice. Data are mean ± SEM and represent two to three independent experiments each including n = 3 mice per group. (E) Naive CD44-CD25- CD4⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of plate-bound anti-BTLA antibodies or isotype control in T_{H1} polarizing cell-culture medium for 72 h. Bar graphs represent the percentages of cells that proliferated and that are positive for IFN γ and T-BET as determined by flow cytometry. Dot graphs represent the percentages of inhibition of each response by BTLA in CD4⁺ T cells from *Themis*^{TWT} (black dots) and *Themis*^{TKO} (red dots) mice. Data are mean ± SEM and represent three independent experiments each including n = 3 to 4 mice per group. (F and G) Naive CD44-CD25- CD4⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{Tg} mice were stained with CTV and stimulated with anti-CD3 (2 μg/mL) and anti-CD28 antibodies in the presence of plate-bound anti-BTLA antibodies or isotype control antibody in T_{H0} (F) or T_{H1} (G) polarizing cell-culture medium. Bar graphs represent the percentages of cells that proliferated and produced TNF α or IFN γ as determined by flow cytometry at 72 h. Data are mean ± SEM and represent two to three independent experiments each including n = 3 mice per group. (H) Naive CD44-CD25- CD4⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{Tg} mice were stimulated as in (G) in the presence of recombinant HVEM instead of anti-BTLA agonist antibodies. Bar graphs represent the percentages of cells that proliferated and produced IFN γ as determined by flow cytometry at 72 h. Dot graphs represent the percentages of inhibition of each response by BTLA in CD4⁺ T cells from *Themis*^{TWT} (black dots) and *Themis*^{Tg} (blue dots) mice. Data are mean ± SEM and represent the experiment including n = 3 mice per group. (I) *Themis*^{TWT} and *Themis*^{Tg} mice were immunized subcutaneously with I-E α peptide in CFA. Anti-BTLA antibodies or PBS were injected intravenously (200 μg/mouse) at the day of immunization and at days 3 and 6 postimmunization. Draining lymph nodes were collected after 9 d, and the isolated cells were stained with I-E α -conjugated MHC tetramers. Bar graphs represent the percentages of tetramer-CD44⁺CD4⁺ T cells among CD4⁺ T cells as determined by flow cytometry. Data are mean ± SEM and represent four independent experiments each including n = 4 to 5 mice per group. Data were analyzed by the unpaired two-tailed Mann-Whitney *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.0001.

THEMIS Enhances TCR Signaling by Regulating the Oxidation of SHP-1 Bound to BTLA. We next investigated whether THEMIS could restrict the capacity of BTLA to regulate signals triggered by the TCR. To address this question, we stimulated CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT}, *Themis*^{TKO}, and *Themis*^{Tg} mice with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 2 d, to induce BTLA surface expression, and rested the cells in interleukine (IL)-2-containing medium, prior stimulation with anti-CD3 antibodies in the presence or not of anti-BTLA antibodies. We first analyzed whether the absence of THEMIS would enable BTLA to repress TCR signals in CD8⁺ T cells since they were more refractory to BTLA-mediated inhibition than CD4⁺ T cells. The phosphorylation of Zeta-chain-associated protein kinase 70 (ZAP-70) and Extracellular signal-regulated kinases (ERK) -1 and -2 were induced upon TCR cross-linking but were not detectably attenuated by BTLA costimulation in *Themis*^{TWT} CD8⁺ T cells (Fig. 2A). In contrast, ZAP-70 and ERK1/2 phosphorylation became susceptible to BTLA-mediated inhibition when cells

were stimulated in similar conditions in the absence of THEMIS (Fig. 2A). We next evaluated whether the transgenic expression of THEMIS could repress BTLA-dependent inhibitory signals in CD4⁺ T cells, which were more amenable than CD8⁺ T cells to BTLA-mediated inhibition. Confirming previous reports (21), the amount of phosphorylated ERK induced after TCR cross-linking was lower in *Themis*^{Tg} CD4⁺ T cells compared to that in *Themis*^{TWT} cells (Fig. 2B), possibly because THEMIS mildly inhibits SHP-2 PTP's activity, which is required for ERK1/2 activation (25, 26). The phosphorylation of ZAP-70 and ERK1/2 was decreased upon BTLA stimulation in wild-type CD4⁺ T cells but became resistant to BTLA-mediated inhibition in CD4⁺ T cells expressing THEMIS transgene (Fig. 2B). Together, these results indicated that THEMIS promoted TCR signaling by repressing BTLA-mediated negative regulation.

We next examined the mechanism by which THEMIS represses BTLA-mediated signaling. BTLA stimulation by its ligand leads to the recruitment of the adapter protein GRB2 to its cytoplasmic

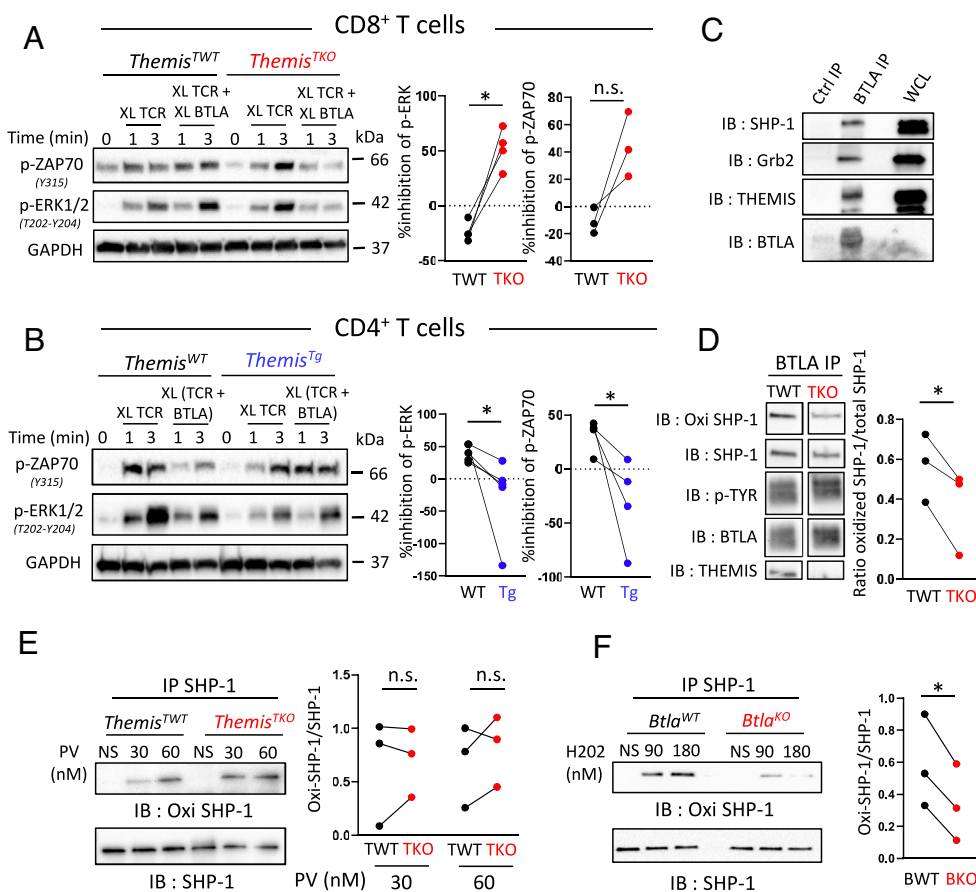


Fig. 2. THEMIS stimulates TCR signaling by enhancing the oxidation of the SHP-1 catalytic cysteine on BTLA. (A and B) The TCR and BTLA were cross-linked on pre-expanded CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice (A) and on pre-expanded CD4⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{Tg} mice (B) for the indicated times. Total cytoplasmic extracts of the cells were then analyzed by western blotting with antibodies against phosphorylated forms of ZAP-70 (Tyr315) and ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Graphs represent the percentages of inhibition by BTLA of ERK and ZAP-70 phosphorylation after 3 min of stimulation. The percentages of inhibition were calculated in each experiment from the relative abundances of the indicated phosphorylated proteins determined by calculating the ratios of the intensities of the bands corresponding to the indicated phosphorylated proteins to those corresponding to GAPDH, the loading control. Paired black and red dots represent 3 to 4 independent experiments. (C) Pre-expanded CD8⁺ T cells were stimulated with pervanadate for 5 min. Samples were then subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies specific for BTLA or isotype control and then analyzed by western blotting with antibodies specific for the indicated proteins. WCL, whole cell lysate. (D) Pre-expanded CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice were stimulated with pervanadate for 5 min. Samples were then subjected to IP with antibodies specific for BTLA and then analyzed by western blotting with antibodies specific for the indicated proteins. The graph represents the ratios of the intensities of the bands corresponding to the oxidized form of SHP-1 to those corresponding to SHP-1. Paired dots represent three independent experiments. (E) Pre-expanded CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice were stimulated with pervanadate at the indicated doses for 5 min. Samples were then subjected to IP with antibodies specific for SHP-1 and then analyzed by western blotting with antibodies specific for the indicated proteins. The graph represents the ratios of the intensities of the bands corresponding to the oxidized form of SHP-1 to those corresponding to SHP-1. Paired dots represent three independent experiments. (F) Pre-expanded CD8⁺ T cells from *Btla*^{WT} (BWT) and *Btla*^{KO} (BKO) mice were stimulated with H₂O₂ for 5 min. Samples were then subjected to IP with antibodies specific for SHP-1 and then analyzed by western blotting with antibodies specific for the indicated proteins. The graph represents the ratios of the intensities of the bands corresponding to the oxidized form of SHP-1 to those corresponding to SHP-1. Paired dots represent three independent experiments. Data were analyzed by paired two-tailed Mann-Whitney *t* test. **P* < 0.05.

tail, which contains a tyrosine-based YxN sequence typical of GRB2-binding motif (27). Quantitative mass-spectrometry studies indicate that GRB2 is the major binding partner of THEMIS in thymocytes (21) and peripheral T cells (28), suggesting that THEMIS could interact with BTLA through GRB2. Accordingly, THEMIS, GRB2 and SHP-1 were precipitated together with BTLA in expanded CD8+ T cells stimulated with pervanadate, a pan-tyrosine phosphatase inhibitor (Fig. 2C). The amount of SHP-1 that precipitated together with BTLA was not significantly modified in *Themis*^{TKO} CD8+ T cells, indicating that THEMIS does not operate by repressing SHP-1 interaction with BTLA (Fig. 2D). Recent studies demonstrated that GRB2 facilitates THEMIS-mediated inactivation of SHP-1 (29), leading us to hypothesize that the SHP-1 recruited to BTLA could be inactivated by THEMIS. To address this possibility, we analyzed the amount of oxidized (inactivated) SHP-1 bound to BTLA upon treatment of expanded CD8+ T cells with pervanadate, which irreversibly oxidizes PTP active-site cysteine residues to the sulfonic acid (S-O₃H) form (30). Oxidized SHP-1 was detected by immunoblot analysis with a monoclonal antibody specific for sulfonated PTP active-site cysteines (31). The amount of oxidized SHP-1 that precipitated together with BTLA was enhanced in the presence of THEMIS (Fig. 2D). In contrast, the amount of total cellular oxidized SHP-1 was not significantly increased in *Themis*^{TWT} CD8+ T cells compared to *Themis*^{TKO} CD8+ T cells (Fig. 2E), indicating that THEMIS regulates SHP-1's catalytic cysteine when both proteins assembled together on BTLA cytoplasmic tail. Supporting this possibility, the amount of oxidized SHP-1 was decreased in *Btla*^{KO} CD8+ T cells as compared to that in wild-type cells following treatment with H₂O₂, which induces SHP-1 oxidation (Fig. 2F). Together, these results indicated that THEMIS inactivates SHP-1 upon its recruitment to BTLA.

Restriction of BTLA Inhibitory Function by THEMIS Enhances Thymocyte Positive Selection. BTLA expression is induced during T cell development at the stage of thymocyte positive selection (32), yet mice deficient for BTLA do not show significant defects of T cell development (9), suggesting that BTLA might be partially inoperative in this context. Of note, mice bearing a germline deletion in the *Themis* gene (*Themis*^{KO}) exhibit a severe defect of thymocyte positive selection, characterized by partial block of T cell development at the transition stage from CD4+CD8+ thymocytes [referred to as double-positive (DP) thymocytes] to CD4+CD8- and CD4-CD8+ thymocytes [referred to as single-positive (SP) thymocytes]. This defect is associated with an attenuation of TCR signaling (16, 21) and could be alleviated by deleting the gene encoding for SHP-1 (13, 33), suggesting that attenuation of BTLA-mediated signaling by THEMIS could be required for enabling TCR signals to reach the threshold of positive selection.

To address this possibility, we first analyzed BTLA surface expression on thymocyte subsets from mice expressing or not the $\alpha\beta$ -TCR transgene (OT-1) restricted to the class-I MHC. BTLA was not detected on preselection DP CD69- thymocytes but was expressed on DP CD69+, at early stages of positive selection, and increased further in expression on postselection CD69+CD4+ and CD8+ SP thymocytes (SI Appendix, Fig. S3A), confirming previous observations (32). HVEM was also expressed on cortical thymic epithelial cells (TECs) and to a lesser extent on medullary TECs, which are involved in self-antigen presentation to thymocytes in the context of positive and negative selection, respectively (SI Appendix, Fig. S3B). To determine whether the developmental block in *Themis*^{KO} mice could result from increased BTLA-mediated inhibition of TCR signaling, we crossed mice bearing a germline

deletion of *Themis* (*Themis*^{KO}) with *Btla*^{KO} mice to generate mice deficient for both THEMIS and BTLA (*Themis*^{KO}*Btla*^{KO}). Thymocytes from *Themis*^{KO}*Btla*^{TWT} control mice exhibited normal maturation up to the DP stage but a marked reduction in the numbers of CD4+ and, to a lesser extent, of CD8+ SP thymocytes and peripheral T cells (Fig. 3A). The deletion of *Btla* rescued the developmental block, as evinced by the significantly greater frequency and number of CD4+ and CD8+ SP thymocytes and peripheral T cells in *Themis*^{KO}*Btla*^{KO} mice which reached the values observed in control *Themis*^{TWT}*Btla*^{TWT} mice (Fig. 3A). The percentages of TCR^{hi} and the numbers of mature CD24^{low} SP thymocytes, which are decreased in *Themis*^{KO}*Btla*^{TWT} mice, were also restored in *Themis*^{KO}*Btla*^{KO} mice to values comparable to those observed in *Themis*^{TWT}*Btla*^{TWT} mice (SI Appendix, Fig. S4A and B). As reported previously (16), the surface expression of CD5, which is correlated with the strength of TCR signals (34), was decreased on immature TCR+CD62L^{low} CD4+ and CD8+ SP thymocytes from *Themis*^{KO}*Btla*^{TWT} mice (SI Appendix, Fig. S4C). The deletion of *Btla* in *Themis*^{KO} mice restored CD5 surface expression on these cells to levels comparable to those observed in *Themis*^{TWT}*Btla*^{TWT} mice (SI Appendix, Fig. S4C), indicating that the defect of TCR signaling in the THEMIS-deficient thymocytes is caused by BTLA-dependent inhibitory signals. T cell development was also analyzed in *Themis*^{KO}*Btla*^{KO} mice expressing the $\alpha\beta$ -TCR transgene OT-1, which drives positive selection signals leading to CD8+ SP thymocyte development (35). The numbers and percentages of V α 2+CD8+ SP thymocytes, which represent CD8+ thymocytes expressing the OT-1 TCR, were strongly reduced in *Themis*^{KO}*Btla*^{TWT} mice, similar to what has been described previously (17), but were increased in *Themis*^{KO}*Btla*^{KO} mice to similar values as that observed in *Themis*^{TWT}*Btla*^{TWT} mice (Fig. 3B). Collectively, these results demonstrate that the attenuation of BTLA-mediated signaling by THEMIS is required for optimal T cell development.

PD-1 Operates Independently of THEMIS in Thymocytes and Peripheral T cells. We then evaluated whether the inhibitory potential of PD-1, which relies predominantly on SHP-2 (10), could also be attenuated by THEMIS. The deletion of *Themis* had no detectable effect on PD-1 surface level after TCR stimulation (SI Appendix, Fig. S2A). Naive CD8+ T cells from *Themis*^{TWT}, *Themis*^{TKO}, and *Themis*^{Tg} mice were stimulated with anti-CD3 antibodies in the presence or not of different amounts of PD-L1-Fc recombinant proteins or isotype control antibody. Stimulation of PD-1 moderately inhibited the proliferation of CD8+ T and only at the highest dose of plate-bound PD-L1 (Fig. 4A). In contrast to what we previously observed upon BTLA engagement, the deletion of THEMIS did not enhance the ability of PD-1 to inhibit CD8+ T cell proliferation (Fig. 4A). Stimulation of PD-1 also inhibited similarly the production of cytokines in *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} CD8+ T cells (SI Appendix, Fig. S5A). The transgenic expression of THEMIS, which increases the abundance of THEMIS by about fourfold in CD8+ T cells (SI Appendix, Fig. S2B), also did not significantly attenuate the inhibitory effects of PD-1 on proliferation and cytokine secretion (Fig. 4B and SI Appendix, Fig. S5B). Taken together, these results indicated that modulating THEMIS expression does not modify the capacity of PD-1 to inhibit peripheral T cell responses.

Since PD-1 was reported to negatively regulate thymocyte positive selection (36), we also analyzed T cell development in mice deficient for both THEMIS and PD-1 (*Themis*^{KO}*Pdcd1*^{KO}). In contrast to what we observed in *Themis*^{KO}*Btla*^{KO} mice, the deletion of *Pdcd1* in *Themis*^{KO} mice did not increase the percentages and numbers of CD4+ SP thymocytes and peripheral T cells (Fig. 4C). The percentages and numbers of CD8+ SP thymocytes, including

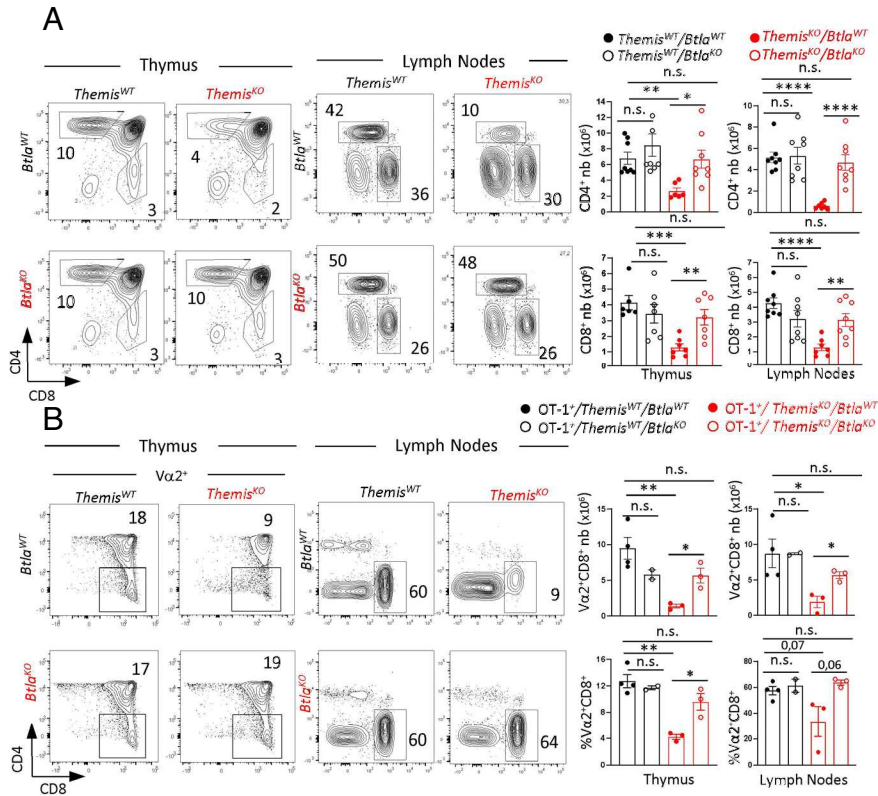


Fig. 3. Deletion of BTLA restores thymocyte positive selection in *Themis*^{KO} mice. (A) Dot plots show CD4 versus CD8 surface staining on thymocytes from *Themis*^{WT}*Btla*^{WT}, *Themis*^{KO}*Btla*^{WT}, *Themis*^{WT}*Btla*^{KO}, and *Themis*^{KO}*Btla*^{KO} mice. (B) Dot plots show CD4 versus CD8 surface staining on Va2⁺ thymocytes and total peripheral T cells from *Themis*^{WT}*Btla*^{WT}, *Themis*^{KO}*Btla*^{WT}, *Themis*^{WT}*Btla*^{KO}, and *Themis*^{KO}*Btla*^{KO} mice expressing the transgenic TCR OT-1. Bars graphs represent the numbers and percentages of Va2⁺ CD8⁺ thymocytes and lymph nodes T cells from mice of the indicated genotype. Data are mean ± SEM and represent a pool of five independent experiments each including n = 1 to 2 mice per group. Data were analyzed by the unpaired two-tailed Mann-Whitney *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.0001.

mature TCR+CD62L^{low} CD8⁺ SP thymocytes, were increased in *Themis*^{KO}*Pdcd1*^{KO} mice to nearly reach the values observed in *Themis*^{WT}*Pdcd1*^{WT} mice (Fig. 4C and *SI Appendix*, Fig. S4A). The deletion of *Pdcd1* mildly increased the surface expression of CD5 on *Themis*^{KO} thymocytes which remained far below the levels observed in *Themis*^{WT}*Pdcd1*^{WT} mice (*SI Appendix*, Fig. S4C). Together, these data indicated that the deletion of *Pdcd1* did not correct the defect of CD4⁺ T cell development and TCR signaling in THEMIS-deficient thymocytes but could elicit CD8⁺ T cell development, possibly by mildly increasing the intensity of TCR signals. In peripheral lymphoid organs, the percentages and numbers of CD8⁺ T cells in *Themis*^{KO}*Pdcd1*^{KO} mice remained similar to that in *Themis*^{KO}*Pdcd1*^{WT} mice (Fig. 4C), showing that the loss of PD-1 incompletely rescued the defects affecting CD8⁺ T cells in *Themis*^{KO} mice. Collectively, these results suggested that the defect of T cell development in *Themis*^{KO} mice does not result from exacerbated PD-1-dependent inhibitory signals.

Restriction of BTLA Inhibitory Function by THEMIS Promotes the Homeostatic Maintenance of Naive CD8⁺ T cells. BTLA is expressed at low levels on naive CD8⁺ T cells and regulates their homeostasis, as revealed by the ability of BTLA to restrain proliferation of naive CD8⁺ T cells upon transfer into lymphocyte-deficient host (37). Mice containing a postthymic deletion of *Themis* in peripheral T cells have reduced numbers of naive CD8⁺ T cells in peripheral lymphoid organs (18, 21). *Themis* postthymic deletion also decreases the potential of naive CD8⁺ T cells to proliferate into lymphocyte-deficient hosts (18), suggesting that the restriction of BTLA signaling by THEMIS could enhance the

maintenance of CD8⁺ T cells. To address this possibility, we crossed postthymic THEMIS-deficient mice (*Themis*^{TKO}) with *Btla*^{KO} mice to evaluate whether the functional inactivation of BTLA could rescue the defect of CD8⁺ T cell homeostasis associated with the loss of THEMIS. As already established (18), numbers of peripheral CD8⁺ T cells were reduced in *Themis*^{TKO}*Btla*^{WT} mice in comparison to that in control *Themis*^{TWT}*Btla*^{WT} mice, whereas numbers of CD4⁺ T cells remained unchanged (Fig. 5A). The deletion of *Btla* in THEMIS-sufficient mice did not significantly modify the numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 5A). However, numbers of CD8⁺ T cells in *Themis*^{TKO}*Btla*^{KO} mice were restored to values comparable to those in *Themis*^{TWT}*Btla*^{WT} mice, indicating that the invalidation of BTLA rescued the defect of CD8⁺ T cell maintenance in *Themis*^{TKO} mice (Fig. 5A). To address whether THEMIS stimulates lymphopenia-induced proliferation of CD8⁺ T cells by repressing BTLA, we transferred CellTrace Violet (CTV) stained CD45.1⁺ CD8⁺ T cells from *Themis*^{TKO} or *Themis*^{TKO}*Btla*^{KO} mice mixed in a 1:1 ratio with CTV-stained CD45.2⁺ CD8⁺ T cells from C57BL/6 mice into *Rag*^{KO}*γc*^{KO} host mice which lack T, B, and NK cells (Fig. 5B). The percentage of *Themis*^{TKO} CD8⁺ T cells that proliferated were reduced in comparison to those in THEMIS expressing CD8⁺ T cells (Fig. 5C and D). As opposed to CD8⁺ T cells from wild-type mice, which were normally maintained, the percentages of CD45.1⁺ cells from *Themis*^{TKO} mice recovered in the spleen were decreased to 20% (Fig. 5E). The deletion of BTLA in the THEMIS-deficient background increased the proportions of CD8⁺ T cells recovered in the spleen to 40% (Fig. 5E) and restored proliferative responses (Fig. 5C and D), which were comparable to those observed in

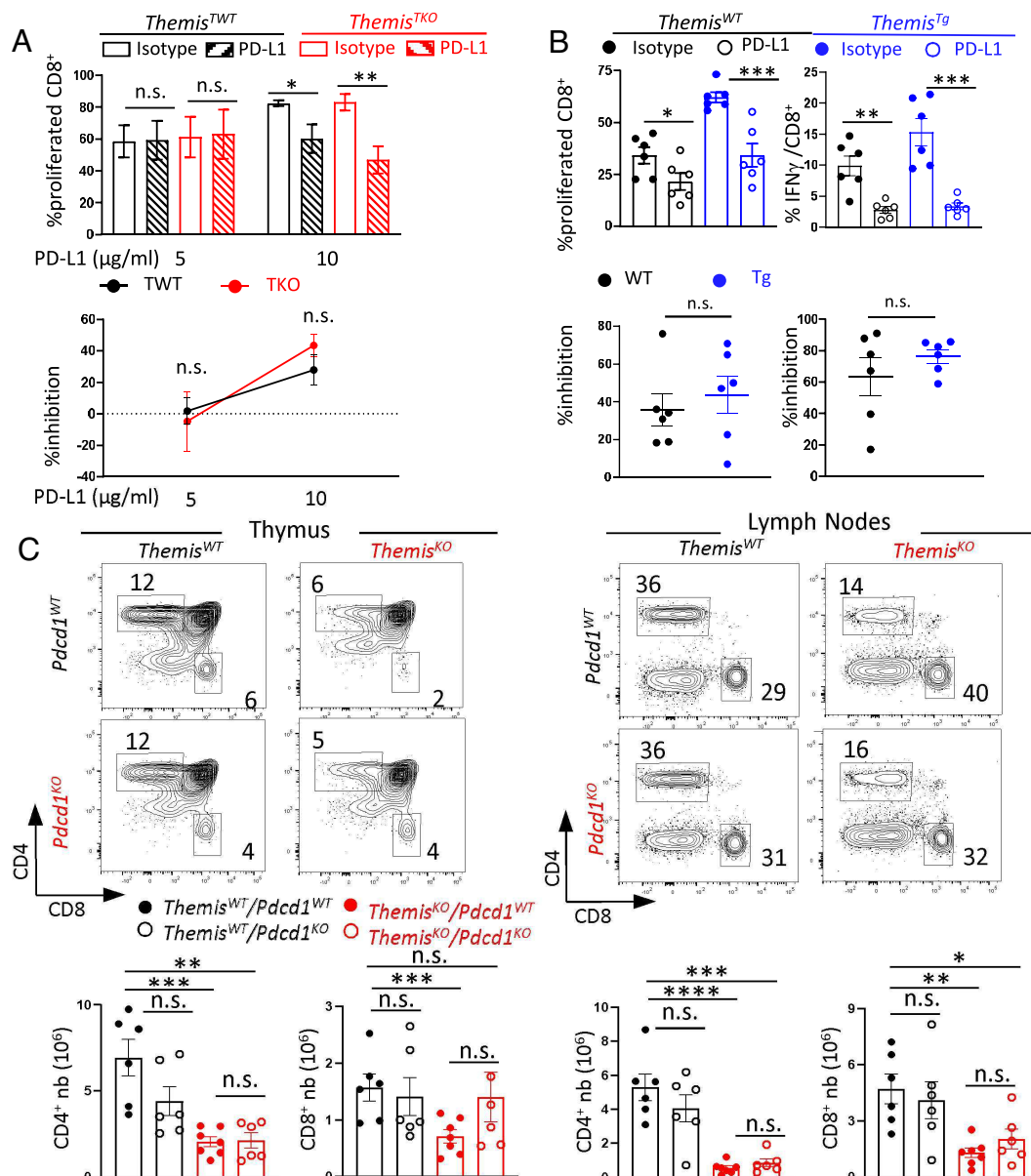


Fig. 4. THEMIS does not regulate the inhibitory functions of PD-1 in peripheral T cells and thymocytes. (A) Naive CD44-CD25- CD8+ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice were stained with CTV and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of the indicated doses of plate-bound recombinant PD-L1-Fc proteins or isotype control antibody. Bar graphs represent the percentages of cells that proliferated as determined by flow cytometry at 72 h. Curve graphs represent the percentages of inhibition of proliferation by PD-1 in CD8+ T cells from *Themis*^{TWT} (black curves) and *Themis*^{TKO} (red curves) mice. Data are mean \pm SEM and represent two independent experiments each including n = 3 mice per group. (B) Naive CD44-CD25- CD8+ T cells from *Themis*^{WT} and *Themis*^{Tg} mice were stained with CTV and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of plate-bound recombinant PD-L1-Fc proteins or isotype control antibody. Bar graphs represent the percentages of cells that proliferated and produced IFN γ as determined by flow cytometry at 72 h. Dot graphs represent the percentages of inhibition of each response by PD-1 in CD4+ T cells from *Themis*^{WT} (black dots) and *Themis*^{Tg} (blue dots) mice. Data are mean \pm SEM and represent two independent experiments each including n = 3 mice per group. (C) Dot plots show CD4 versus CD8 surface staining on thymocytes from *Themis*^{WT}/Pdccl1^{WT}, *Themis*^{TKO}/Pdccl1^{WT}, *Themis*^{WT}/Pdccl1^{KO}, and *Themis*^{TKO}/Pdccl1^{KO} mice. Bars graphs represent the numbers of CD4+ and CD8+ thymocytes and lymph nodes T cells from mice of the indicated genotype. Data are mean \pm SEM and represent a pool of three independent experiments each including n = 2 to 3 mice per group. Data were analyzed by the unpaired two-tailed Mann-Whitney t test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.0001.

wild-type cells. Together, these results demonstrated that the attenuation of BTLA signaling by THEMIS is required for the optimal maintenance of a naive CD8+ T cell pool.

Homeostatic expansion of CD8+ T cells depends on the interaction of the TCR with low-affinity ligands and on signals driven by cytokines such as IL-7 (38). To better characterize the mechanism by which BTLA regulates the homeostatic expansion of CD8+ T cells and evaluate the effect of THEMIS on this process, we stimulated naive CD8+ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice with suboptimal doses of plate-bound anti-CD3 antibodies together with IL-7. In this model, stimulation of the TCR induced slow proliferative responses which could be detected after 14 d of

culture and only when the TCR was engaged in the presence of IL-7 (Fig. 5*F*). The stimulation of BTLA on *Themis*^{TWT} CD8+ T cells had no detectable effects on the proliferation and on the expression of the activation marker CD44 which is induced following homeostatic expansion (39) (Fig. 5*F*). In contrast, proliferation and CD44 expression were strongly attenuated when BTLA was stimulated on *Themis*^{TKO} CD8+ T cells (Fig. 5*F*), showing that BTLA could inhibit proliferation induced by weak TCR signals when THEMIS-deficient CD8+ T cells were cultured with IL-7.

It has been suggested that THEMIS could enhance the homeostatic expansion of CD8+ T cells by positively regulating signals

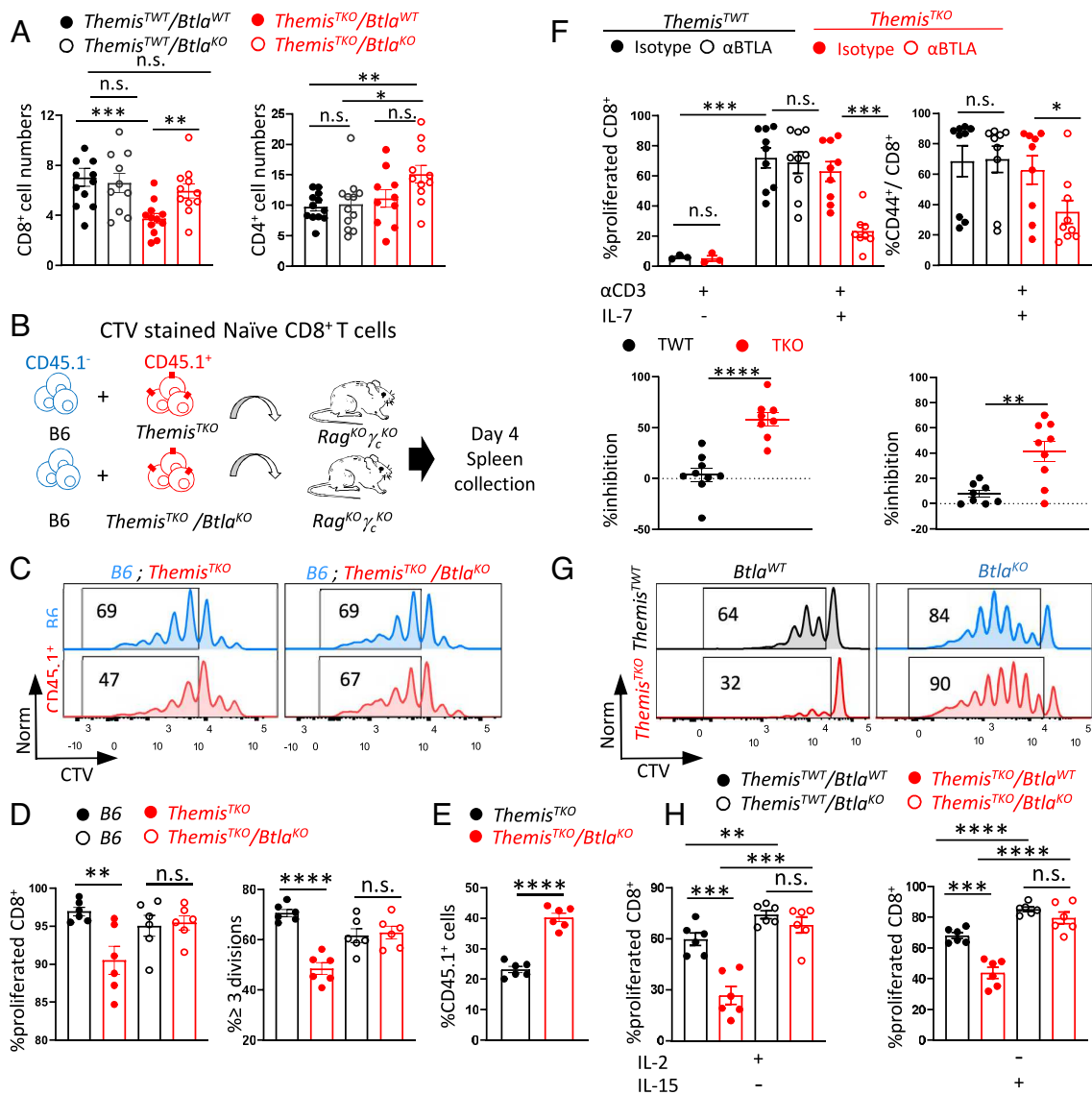


Fig. 5. Deletion of BTLA restores TCR- and cytokine-driven peripheral CD8⁺ T cell maintenance in *Themis*^{TKO} mice. (A) Bar graphs represent the numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT}/*Btla*^{WT}, *Themis*^{TWT}/*Btla*^{KO}, *Themis*^{TKO}/*Btla*^{WT}, and *Themis*^{TKO}/*Btla*^{KO} mice. Data are mean \pm SEM and represent six independent experiments each including $n = 1$ to 2 mice per group. (B) Scheme representing the experimental setting for data shown in (C–E). Naïve CD45.2⁺CD8⁺ T cells from C57BL/6 mice and naïve CD45.1⁺CD8⁺ T cells from *Themis*^{TKO} or *Themis*^{TKO}/*Btla*^{KO} mice were stained with CTV and mixed in a 1:1 ratio prior transfer into *Rag*^{KO} γ_c ^{KO} mice. Splens were collected at day 4 after transfer, and the isolated cells were analyzed by flow cytometry. (C) The histogram graphs show the CTV dilution in C57BL/6, *Themis*^{TKO}, and *Themis*^{TKO}/*Btla*^{KO} CD8⁺ T cells isolated from *Rag*^{KO} γ_c ^{KO} mice. (D) Bar graphs represent the percentages of cells that divided at least one time or that divided more than three times as represented by the gate in the CTV dilution histogram graph in (C). Data are mean \pm SEM and represent two independent experiments each including $n = 3$ mice per group. (E) Bar graphs represent the percentages of *Themis*^{TKO} and *Themis*^{TKO}/*Btla*^{KO} CD45.1⁺ T cells among CD8⁺ T cells recovered in the spleen of *Rag*^{KO} γ_c ^{KO} mice at day 4 after cotransfer. Data are mean \pm SEM and represent two independent experiments each including $n = 3$ mice per group. (F) Naïve CD44⁺CD25⁺CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice were stained with CTV and stimulated for 14 d with anti-CD3 (1 μ g/mL) and anti-CD28 antibodies in the presence of plate-bound anti-BTLA or isotype control antibodies in cell-culture medium containing or not IL-7. Bar graphs represent the percentages of cells that divided at least one time and the surface expression of CD44 as determined by flow cytometry after 14 d of culture. Dot graphs represent the percentages of inhibition of proliferation and CD44 surface expression by BTLA in CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} (black dots) and *Themis*^{TKO} (red dots) mice. Data are mean \pm SEM and represent three independent experiments each including $n = 3$ mice per group. (G) Naïve CD44⁺CD25⁺CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT}/*Btla*^{WT}, *Themis*^{TKO}/*Btla*^{WT}, *Themis*^{TWT}/*Btla*^{KO}, and *Themis*^{TKO}/*Btla*^{KO} mice were stained with CTV and cultured for 7 d in cell-culture medium containing IL-15. The histogram graphs show the CTV dilution in CD8⁺ T cells from the indicated genotypes. (H) Bar graphs represent the percentages of CD8⁺ T cells from the indicated genotypes that divided at least one time after 7 d of culture with IL-2 or IL-15. Data are mean \pm SEM and represent two independent experiments each including $n = 3$ mice per group. Data were analyzed by the unpaired two-tailed Mann-Whitney *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.0001.

driven by IL-2 and IL-15 in the absence of additional TCR costimulation (40). The ability of naïve CD8⁺ T cells to proliferate in vitro in response to these cytokines is decreased in the absence of THEMIS and is restored in THEMIS-deficient cells upon deletion of the gene encoding SHP-1 (40). We thus hypothesized that BTLA might also have the capacity to inhibit proliferation induced by IL-2 and IL-15 and that the proliferative defects of THEMIS-deficient CD8⁺ T cells might be the consequence of an increased signaling activity of BTLA. To address this possibility, we stimulated naïve CD62L^{hi}CD44^{low} CD8⁺ T cells

from *Themis*^{TWT}/*Btla*^{WT}, *Themis*^{TKO}/*Btla*^{WT}, *Themis*^{TWT}/*Btla*^{KO}, and *Themis*^{TKO}/*Btla*^{KO} mice with IL-2 and IL-15 and analyzed their proliferative responses after 7 d of stimulation. Confirming previous findings, we observed that *Themis*^{TKO}/*Btla*^{WT} CD8⁺ T cells proliferated less than *Themis*^{TWT}/*Btla*^{WT} CD8⁺ T cells in response to IL-2 and IL-15 (Fig. 5 G and H). Noticeably, the deletion of BTLA in THEMIS-sufficient CD8⁺ T cells increased their capacity to proliferate in response to those cytokines, indicating that BTLA inhibited proliferation induced by IL-2- and IL-15 without exogenous agonistic stimulation (Fig. 5 G and H). HVEM was

expressed on *Themis*^{TWT}*Btla*^{WT} and *Themis*^{TWT}*Btla*^{KO} CD8+ T cells during expansion (SI Appendix, Fig. S6A), suggesting that BTLA inhibits cytokine-mediated proliferation by engaging HVEM through cis- or trans-interaction on CD8+ T cells. The increased expansion of *Themis*^{TWT}*Btla*^{KO} CD8+ T cells was not caused by an inappropriate enrichment of memory CD44^{hi}CD62L^{low} CD8+ T cells (SI Appendix, Fig. S6 B and C), which are more responsive to IL-15 (41). Confirming previous studies, the deletion of BTLA had no detectable effect on proliferation, when naive CD8+ T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 antibodies (SI Appendix, Fig. S6D). Most importantly, the absence of THEMIS in BTLA-deficient background did not decrease the ability of cells to proliferate in contrast to what we observed in cells expressing BTLA, indicating that THEMIS enhances IL-2- and IL-15-driven proliferation by restraining the signaling capacity of BTLA (Fig. 5 G and H). Collectively, these data indicated that THEMIS facilitated the homeostatic expansion of naive CD8+ T cells by repressing the capacity of BTLA to inhibit signals driven by the TCR and by cytokines such as IL-2 and IL-15.

Discussion

Immune checkpoints are required to raise the threshold of T cell activation and differentiation and reduce T cell responsiveness to self-antigens which could cause autoimmunity. However, it is unclear how TCR signals elicited by self-ligands escape from immune checkpoint-mediated inhibitory signals in the context of thymocyte positive selection and peripheral T cell maintenance. Here we have shown that a critical function of THEMIS is to enhance TCR signals required for positive selection and peripheral CD8+ T cell homeostasis by repressing the inhibitory signaling capacity of BTLA. THEMIS is recruited to BTLA together with GRB2, which interacts directly with the cytoplasmic tail of BTLA (27), and the tyrosine phosphatase SHP-1. The association of THEMIS with SHP-1 enhances or stabilizes the oxidation of the catalytic cysteine of SHP-1, leading to inhibition of its phosphatase activity (42).

Whether THEMIS operates as a positive or negative regulator of TCR signaling has been extensively debated (15, 23, 43). The phenotype of THEMIS-deficient mice (14, 16, 17, 22) and studies based on TCR signaling reporter mice (21) support mostly a stimulatory effect of THEMIS on TCR signaling in vivo. However, TCR stimulation on DP thymocytes by cognate pMHC tetramers (44) and on peripheral CD4+ T cells polarized in T_H1 conditions by anti-CD3 antibodies (22) suggest that THEMIS inhibits TCR signaling when the TCR is stimulated in vitro independently of additional costimuli. One possible explanation for this apparent discrepancy could rely on the different contributions of SHP-1 and SHP-2 to the regulation of TCR signaling. Analysis based on SHP-1-deficient mice suggests that SHP-1 has a relatively mild impact on T cell responses in vitro upon TCR cross-linking (45–47). This correlates with recent mass-spectrometry results which fail to detect any robust interaction of SHP-1 with TCR signaling proteins following TCR stimulation with anti-CD3 antibodies (28). This suggests that SHP-1 might function more effectively in feedback loops triggered by inhibitory receptors, such as BTLA, which might enrich SHP-1 in proximity of TCR signaling complexes. A consequence of such mechanisms could be that although THEMIS inhibits SHP-1 predominantly over SHP-2, the functional consequence of inhibiting SHP-2 might predominate over that of inhibiting SHP-1 in the absence of coinhibitory receptor stimulation. In contrast to SHP-1, which is mostly characterized as a negative regulator of TCR signaling, SHP-2 has been assigned more complex functions and was reported to have a positive

regulatory role on ERK1/2 activity upon pre-TCR or TCR cross-linking (25, 48). Therefore, the inhibitory effect of THEMIS on TCR signaling, which results more selectively in ERK1/2 inhibition (21, 22), could be the consequence of its effect on SHP-2. Thus, THEMIS might affect T cell responses differently according to whether BTLA is engaged or not with the TCR. Supporting this possibility, THEMIS was reported to repress CD8+ T cell differentiation into effector cells upon lymphocytic choriomeningitis viruses infection (49), which is associated with the down-regulation of HVEM surface expression on T cells and decreased BTLA-mediated inhibition of antiviral T cell responses (50).

Another controversy relative to the function of THEMIS pertains to its effect on SHP-1's PTP activity. Although it is generally accepted that THEMIS regulates thymocytes and T cells by modulating SHP-1's PTP activity, studies from different groups reported nearly opposite effects. Studies from Paul Love's lab suggested that THEMIS enhances TCR signaling and positive selection by stabilizing/promoting the oxidation of the catalytic cysteine of SHP-1, thereby repressing the PTP activity of SHP-1 (13). One strong evidence supporting this model was the fact that deleting SHP-1 at the DP stage, using a *Cd4-Cre* transgene, could restore normal numbers of SP thymocytes and peripheral T cells in *Themis*^{KO} mice (13). Studies from other groups suggest that THEMIS inhibits TCR signaling by coactivating SHP-1 (51, 52). Here, the authors propose that THEMIS promotes T cell development by preventing the transmission of strong signaling events that might be inadequately triggered by self-ligands, possibly leading to misplaced negative selection. Here, the authors have failed to observe a developmental rescue of *Themis*^{KO} thymocytes when SHP-1 was deleted using the same *Cd4-Cre* transgenic model (51). It was later suggested that small variation in the timing of SHP-1 deletion at the DP stage, when positive selection occurs, might result in different outcomes (33). To address this possibility, SHP-1 was deleted prior the DP stage using either *Lck-Cre* or *CD2-iCre* transgenes (33). Analysis of thymocyte subsets showed first that the deletion of SHP-1 and/or SHP-2 in mice failed to result in a phenotype resembling that of THEMIS-deficient mice (33), indicating that the defect of T cell development in the absence of THEMIS cannot be attributed to the reduced tyrosine phosphatase activities of SHP1, SHP2, or both. More importantly, in both models, the loss of SHP-1 at early stages of T cell development alleviates the developmental block of *Themis*^{-/-} thymocytes (33), supporting that the defect observed in the absence of THEMIS is caused by enhanced rather than decreased SHP-1's PTP activity. The deletion of SHP-1 also rescues the maintenance of CD8+ T cells in mice with conditional deletion of THEMIS in peripheral T cells (18). In agreement with these experiments, we showed that the deletion of the BTLA encoding gene rescues the defect of positive selection in *Themis*^{KO} mice and the defect of CD8+ T cell maintenance in *Themis*^{TKO} mice. These results together with those showing that BTLA has enhanced inhibitory function in the absence of THEMIS strongly support that THEMIS operates by restraining the BTLA-SHP-1 signaling axis.

The deletion of BTLA attenuates the oxidation of SHP-1 on its catalytic cysteine, suggesting that THEMIS inactivates SHP-1 upon its recruitment to BTLA. The recruitment of THEMIS-GRB2 complexes to BTLA could be important to facilitate the interaction of THEMIS's CABIT modules with the phosphatase domain of SHP-1 or might be required for additional steps of regulation affecting the phosphorylation (53) or the ubiquitinylation (24) of THEMIS. This is in accordance with reports showing that GRB2 facilitates the inactivation of SHP-1 by THEMIS during T cell development (29). Other inhibitory receptors such as ILT-2 and LAIR-1 interact with SHP-1 in T cells (54, 55) but lack

conventional GRB2-binding motifs on their cytoplasmic tail, suggesting that SHP-1 associated with these receptors might possibly be less responsive to THEMIS-based regulation, although this requires additional investigation. PD-1 also recruits GRB2 together with SHP-2 to its cytoplasmic tail following stimulation by PD-L1 (11), yet we could not detect an effect of THEMIS on regulatory pathways dependent on PD-1, supporting previous studies that reported a moderate inhibitory effect of THEMIS on SHP-2 activity in comparison to that on SHP-1 (13). PD-1 predominantly recruits SHP-2, but it also has the capacity to recruit SHP-1 (11, 20), which can maintain a functional PD-1 inhibitory signaling in the absence of SHP-2 (11). Although we were unable to detect an effect of THEMIS on PD-1-mediated signaling, we cannot exclude the possibility that THEMIS could affect TCR signaling by repressing the function of PD-1 in a context-specific manner. This might provide an explanation for the partial rescue of CD8+ T cell development observed in *Pdcd1^{KO}Themis^{KO}* mice, which in contrast to CD4+ T cell development is less dependent on strong or sustained TCR signals (56).

The deletion of *Btla* in THEMIS-sufficient mice enhances the capacity of naive CD8+ T cells to expand upon transfer into lymphopenic hosts (37), suggesting that BTLA preserves part of its inhibitory functions in wild-type CD8+ T cells. The mechanism whereby BTLA regulates CD8+ T cell expansion in this context has remained ill-investigated. HVEM is expressed on immature dendritic cells (57) and on lymph nodes fibroblastic reticular cells (58), and may attenuate homeostatic signals driven by low-affinity TCR ligands and by IL-7 by engaging BTLA which is mildly expressed on naive T cells (32). Accordingly, BTLA strongly inhibited proliferation of THEMIS-deficient naive CD8+ T cells induced by weak TCR signals and IL-7. The deletion of BTLA in THEMIS-sufficient cells also enhanced the capacity of naive CD8+ T cells to proliferate in vitro in response to IL-2 and IL-15, which are important for the homeostatic maintenance of CD8+ T cells (40). Remarkably, we did not use agonist antibodies against BTLA or recombinant HVEM to stimulate BTLA in those assays, suggesting that BTLA might be directly stimulated in cis or in trans by HVEM expressed on CD8+ T cells (59). Deletion of BTLA could lead to an increase in IL-2/IL-15 receptor signaling which was shown to be negatively regulated by SHP-1 (40). Alternatively, the loss of BTLA could also enhance the costimulatory function of HVEM which is repressed by BTLA upon cis interaction with HVEM (60). Here, HVEM could be possibly stimulated by its other ligands such as CD160 or LIGHT which are expressed on the cell surface of CD8+ T cells (59).

What could be the biological advantage of repressing the signaling function of a receptor while maintaining its expression at the cell surface? BTLA is part of a complex ligands-receptors interaction network, which includes HVEM and additional receptors and ligands such as LIGHT, CD160, and lymphotoxin α (61). BTLA interaction with HVEM triggers the propagation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B)-dependent signaling events downstream of HVEM that can have pleiotropic effects according to cell type (61, 62). The expression of signaling-inactive forms of BTLA at the membrane could possibly preserve its stimulatory function in response to HVEM and block the inhibitory outcomes resulting from BTLA engagement. The consequences of this in the context of T cell development is not clear since HVEM-deficient mice have no reported defect at this stage (63). However, it may contribute to explain why HVEM exerts anti-inflammatory effects in some disease models (63–65), presumably by stimulating inhibitory signals through BTLA, and proinflammatory effects in other models (66–69), possibly in contexts where BTLA signaling is incapacitated. The expression of BTLA and HVEM in the same cell leads

to the stable formation of a cis-complex in which BTLA suppresses HVEM-mediated signaling of NF- κ B by all of its membrane-bound ligands (CD160, BTLA, and LIGHT) in trans (70). Thus, preserving BTLA expression in this context might also prevent the transmission of inappropriate HVEM-mediated signals in T cells which could lead to exacerbated and damageable T cell responses.

Our findings suggest that the responsiveness of inhibitory receptors to their ligands could be governed by intracellular molecules whose expression levels vary across immune-cell subsets or activation states in order to promote or refrain specific immunological processes. Inhibitory effects similar to those described here for BTLA have been described for the inhibitory receptor TIM-3 whose signaling capacities are repressed by the adapter protein human leukocyte antigen B (HLA-B)-associated transcript (BAT-3) (71). The impact of this could be important in the context of immune checkpoint blockade immunotherapies since it implies that the efficacy of treatments in a given individual or cancer type could be dependent on the intrinsic responsiveness of immune checkpoints to stimulation which is set by such intracellular factors. This might explain why the efficacy of treatments can be uncoupled from the expression levels of the targeted receptors on immune cells in the tumor environment (5). It also provides a possible rationale to explain why T cells expressing multiple immune checkpoints could remain highly functional in the context of cancers (72, 73) and virus infections (74, 75). A better characterization of the intracellular mechanisms that regulate immune-checkpoint activity might allow a refinement of the predicting criteria of treatment efficacy and could possibly lead to the development of new approaches aiming at raising the signaling threshold of these receptors in complement to immune checkpoint blockade- or chimeric antigen receptor-based therapies.

Materials and Methods

Complete experimental methods are described in *SI Appendix, Materials and Methods*.

Mice. *Themis^{KO}* (16), *Themis^{Tg}* (76), and *Cd2-Cre Themis^{flox/flox}* (22) mice were described previously. *Btla^{KO}* mice were kindly provided by T. Jacobs (77). *Pdcd1^{KO}* and *Rag^{KO} γ_c ^{KO}* mice were from Jackson laboratories (strain #028276 and #014593, respectively). All of the experiments were conducted with sex- and age-matched mice between 6 and 14 wk old that were housed under specific pathogen-free conditions at the INSERM animal facility (Zootechnie US-006; accreditation number A-31 55508), which is accredited by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice. All experimental protocols were approved by the local ethics committee and are in compliance with the French and European regulations on the care and protection of laboratory animals (European Commission Directive 2010/63).

Cell Purification and Cultures. For T cell purification: Naive T cells from the spleen and lymph nodes were enriched by magnetic immunodepletion (Dynabeads from DB untouched mouse CD4 cells kit, Invitrogen) using the following monoclonal antibodies: anti-B220 (RA3-6-B2), anti-CD11b (M1/70), anti-MHC class II (m5-114), anti-Fc γ Rs (2.4G2), NK1.1 (83PK136), anti-CD4 (GK1.5) or anti-CD8 (SN-H59) (generated in the lab) as well as anti-CD44 (IM7) and anti-CD25 (PC61) from BioXcell. For T cell stimulation: naive CD44-CD25- CD4+ and CD8+ T cells were stimulated in 96-well plates with variable amounts of plate-bound anti-CD3 antibodies (145-2C11, BioLegend) and 1 μ g/mL of soluble anti-CD28 antibodies (PV-1, BioLegend), in the presence of variable amounts of plate-bound anti-BTLA antibodies (PK18.6, BioXcell), HVEM-Fc recombinant proteins (BioLegend # 771306), PD-L1-Fc recombinant proteins (R&D systems, # 1019-B7) or rat IgG1 isotype control antibodies (BioXcell). For T_H 1 polarization assays: naive CD44-CD25- CD4+ T cells were stimulated as described above in the presence of IL-12 (10 ng/ml, PeproTech) and anti-IL-4 (10 μ g/ml, BVD4-1D11, BD Bioscience). For the analysis of cytokine production by flow cytometry, cells were restimulated for 4 h using Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 500 ng/ml), Ionomycin (1 μ g/ml) and Golgi-plug (1 μ g/ml) from BD Bioscience. For

proliferation assays: naive CD44-CD25- CD8+ T cells were labeled with 2 μ M CTV (Life Technologies) for 15 min at 37 °C and cultured in 96-well plates coated with anti-CD3 antibodies at the indicated doses. For experiments in Fig. 5, CTV-stained naive CD44-CD25- CD8+ T cells were cultured in 96-well plates coated with anti-CD3 antibodies at 1 μ g/mL in the presence of IL-7 (PeproTech, #217-17, 1 ng/mL) or with IL-2 (PeproTech, #212-12, 0.5 to 1 μ g/mL) or IL-15 (PeproTech, #210-15, 0.5 to 1 μ g/mL) alone. The incorporation of CTV was measured by flow cytometry after 7 and 14 d of culture.

Analysis of TCR Signaling and Immunoprecipitation (IP). All analyses were performed on CD4+ or CD8+ T cells that were shortly expanded to enable BTLA cell surface expression. Briefly, T cells were expanded for 48 h with plate-bound anti-CD3 (145-2C11, 5 μ g/mL) and soluble anti-CD28 (PV-1; 1 μ g/mL) antibodies from BioLegend. T cells were then harvested and grown in the presence of IL-2 (5 to 10 ng/mL, PeproTech) for 48 h. For IPs: A total of 0.2 to 1 \times 10⁸ CD8+ T cells from C57Bl/6, *Themis*^{WT}, *Themis*^{KO}, and *Btla*^{KO} mice were left untreated or 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 1 mL of ice-cold lysis buffer [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton, 2 mM Na3VO4, 5 mM NaF, 1 mM EDTA, 10 mM iodoacetamide, 10 mM N-Ethylmaleimide, and protease inhibitor cocktail tablet (Roche)] and incubated for 20 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 18,000 g for 15 min at 4 °C, and SHP-1 or BTLA were subjected to IP from cleared lysates for 2 h at 4 °C with 15 μ L of protein A- and protein G-Sepharose resin coated with 10 μ g of polyclonal rabbit anti-SHP-1 antibodies (07-419, Millipore) or rat anti-BTLA antibodies (PK18.6, BioXcell), respectively. Resins were washed three times and incubated for 10 min at 95 °C with Laemmli buffer. For TCR signaling analysis: *Themis*^{WT} and *Themis*^{KO} CD8+ T cells were incubated with hamster anti-CD3-biot (145-2C11, BD Bioscience) and rat anti-BTLA (PK18.6, BioXcell) for 15 min on ice. Cells were washed and stimulated for the indicated time points with streptavidin and F(ab')₂ goat anti-rat IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch). *Themis*^{WT} and *Themis*^{tg} CD4+ T cells were incubated with rat anti-mouse CD3 (17A2, BD Bioscience) and rat anti-BTLA (PK18.6, BioXcell) for 15 min on ice. Cells were washed and stimulated for the indicated time points with goat anti-rat IgG antibodies. Cell lysates were prepared as described above.

Immunization of Mice with I-E α Peptide. Mice were immunized subcutaneously on each side at the base of the tail with 40 μ g of peptide I-E α (EAWGALANKAVDKA from GeneCust) in CFA (Sigma-Aldrich). Anti-BTLA antibodies (clone PK18, BioXcell) or PBS were injected intraperitoneally (200 μ g/mouse) at the day of immunization and at days 3 and 6 postimmunization. CD4+ T cell populations from the draining lymph nodes were analyzed at day 9 after immunization. For staining of antigen-specific cells, I-E α -I-Ab tetramers were obtained from the NIH Tetramer core facility. Overall, cells at 1 \times 10⁸/mL were first stained at room temperature for 2 h with an optimal concentration of tetramer. Cell staining for additional markers was then performed as described earlier.

Lymphopenia-Induced Proliferation. Naive CD44-CD25- CD8+ T cells from C57Bl/6 (CD45.2+), *Themis*^{KO} (CD45.1+), and *Themis*^{KO}*Btla*^{KO} (CD45.1+) mice were stained with CTV. 5 \times 10⁵ CD8+ T cells from C57Bl/6 mice were then mixed in a 1:1 ratio with CD8+ T cells from *Themis*^{KO} or *Themis*^{KO}*Btla*^{KO} mice and injected intravenously into *Rag*^{KO}*g γ* ^{KO} mice. Four days after transfer, splenic cells were collected, and CTV dilution was analyzed in CD45.1+ and CD45.2+ cells by flow cytometry.

Data, Materials, and Software Availability. All study data are included in the article and/or *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Loïc Dupré and Paul Love for helpful comments and suggestions and Dr. Thomas Jacobs for providing *Btla*^{-/-} mice. We acknowledge the technical assistance provided by the personnel of INSERM US-006 Anexplo/Creffre animal facility. We thank Fatima-Ezzahra L'Faqih-Olive, Valérie Duplan-Eche, and Anne-Laure Iscache from the cytometry facility of INFINITY. This work was supported by INSERM; the Foundation ARSEP; the Association pour la Recherche sur le Cancer; the Agence Nationale de la Recherche (ANR-20-CE15-0002 and ANR-20-CE15-0005); SANOFI (iAward Europe); the French Ministry of Higher Education and Research (PhD fellowship for S.M.); and the China Scholarship Council (a PhD fellowship for C.Y.). Portions of this work were developed from the doctoral thesis of C.Y. (Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2021) supervised by R.L.

- S. H. Baumeister, G. J. Freeman, G. Dranoff, A. H. Sharpe, Coinhibitory pathways in immunotherapy for cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 539-573 (2016).
- Q. Zhang, D. A. Vignali, Co-stimulatory and co-inhibitory pathways in autoimmunity. *Immunity* **44**, 1034-1051 (2016).
- R. W. Jenkins, D. A. Barbie, K. T. Flaherty, Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br. J. Cancer* **118**, 9-16 (2018).
- A. Kalbasi, A. Ribas, Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 25-39 (2020).
- G. Morad, B. A. Helmink, P. Sharma, J. A. Wargo, Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade. *Cell* **185**, 576-576 (2022).
- K. M. Murphy, C. A. Nelson, J. R. Sedy, Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 671-681 (2006).
- T. L. Murphy, K. M. Murphy, Slow down and survive: Enigmatic immunoregulation by BTLA and HVEM. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 389-411 (2010).
- A. H. Sharpe, K. E. Pauken, The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 153-167 (2018).
- N. Watanabe *et al.*, BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* **4**, 670-679 (2003).
- E. Hui *et al.*, T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* **355**, 1428-1433 (2017), 10.1126/science.aaf1292.
- J. Celis-Gutierrez *et al.*, Quantitative interactomics in primary T cells provides a rationale for concomitant PD-1 and BTLA coinhibitor blockade in cancer immunotherapy. *Cell Rep.* **27**, 3315-3330.e7 (2019).
- N. Patsoukis, Q. Wang, L. Strauss, V. A. Boussiotis, Revisiting the PD-1 pathway. *Sci. Adv.* **6**, eabd2712 (2020).
- S. Choi *et al.*, THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1. *Nat. Immunol.* **18**, 433-441 (2017), 10.1038/ni.3692.
- A. L. Johnson *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).
- S. Choi, R. Cornall, R. Lesourne, P. E. Love, THEMIS: Two models, different thresholds. *Trends Immunol.* **38**, 622-632 (2017).
- R. Lesourne *et al.*, Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat. Immunol.* **10**, 840-847 (2009).
- G. Fu *et al.*, Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat. Immunol.* **10**, 848-856 (2009).
- J. Brzostek *et al.*, T cell receptor and cytokine signal integration in CD8(+) T cells is mediated by the protein Themis. *Nat. Immunol.* **21**, 186-198 (2020).
- M. S. Patrick *et al.*, Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 16345-16350 (2009).
- X. Z. Xu *et al.*, PD-1 and BTLA regulate T cell signaling differentially and only partially through SHP1 and SHP2. *J. Cell Biol.* **219**, e201905085 (2020).
- E. Zvezdova *et al.*, Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Sci. Signal.* **9**, ra15 (2016).
- C. Yang *et al.*, THEMIS enhances the magnitude of normal and neuroinflammatory type 1 immune responses by promoting TCR-independent signals. *Sci. Signal.* **15**, eabl5343 (2022).
- S. Melique, C. Yang, R. Lesourne, Negative times negative equals positive, THEMIS sets the rule on thymic selection and peripheral T cell responses. *BioMed. J.* **45**, 334-346 (2022).
- A. Garreau *et al.*, Grb2-mediated recruitment of USP9X to LAT enhances themis stability following thymic selection. *J. Immunol.* **199**, 2758-2766 (2017).
- T. V. Nguyen, Y. Ke, E. E. Zhang, G. S. Feng, Conditional deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in thymocytes suppresses both pre-TCR and TCR signals. *J. Immunol.* **177**, 5990-5996 (2006).
- S. Q. Zhang *et al.*, Shp2 regulates Src family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol. Cell* **13**, 341-355 (2004).
- M. Gavrieli, N. Watanabe, S. K. Loftin, T. L. Murphy, K. M. Murphy, Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1236-1243 (2003).
- G. Voisinne *et al.*, Quantitative interactomics in primary T cells unveils TCR signal diversification extent and dynamics. *Nat. Immunol.* **20**, 1530-1541 (2019).
- S. Choi *et al.*, GRB2 promotes thymocyte positive selection by facilitating THEMIS-mediated inactivation of SHP1. *J. Exp. Med.* **220**, e20221649 (2023).
- G. Huyer *et al.*, Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* **272**, 843-851 (1997).
- R. Karisch, B. G. Neel, Methods to monitor classical protein-tyrosine phosphatase oxidation. *FEBS J.* **280**, 459-475 (2013).
- P. Han, O. D. Goularte, K. Rufner, B. Wilkinson, J. Kaye, An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J. Immunol.* **172**, 5931-5939 (2004).
- S. Choi *et al.*, THEMIS increases TCR signaling in CD4(+)CD8(+) thymocytes by inhibiting the activity of the tyrosine phosphatase SHP1. *Sci. Signal.* **16**, eade1274 (2023).
- H. S. Azzam *et al.*, CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* **188**, 2301-2311 (1998).
- K. A. Hogquist *et al.*, T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17-27 (1994).
- M. E. Keir, Y. E. Latchman, G. J. Freeman, A. H. Sharpe, Programmed death-1 (PD-1)-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. *J. Immunol.* **175**, 7372-7379 (2005).
- C. Krieg, O. Boyman, Y. X. Fu, J. Kaye, B and T lymphocyte attenuator regulates CD8+ T cell-intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nat. Immunol.* **8**, 162-171 (2007).
- C. D. Surh, J. Sprent, Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* **29**, 848-862 (2008).

39. J. Sprent, C. D. Surh, Normal T cell homeostasis: The conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat. Immunol.* **12**, 478–484 (2011).
40. Y. Liu *et al.*, Themis is indispensable for IL-2 and IL-15 signaling in T cells. *Sci. Signal.* **15**, eabi9983 (2022).
41. M. K. Kennedy *et al.*, Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* **191**, 771–780 (2000).
42. L. I. Pao, K. Badour, K. A. Siminovich, B. G. Neel, Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 473–523 (2007).
43. N. R. Gascoigne, V. Rybakina, O. Acuto, J. Brzostek, TCR signal strength and T cell development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **32**, 327–348 (2016).
44. G. Fu *et al.*, Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* **504**, 441–445 (2013).
45. D. J. Johnson *et al.*, Shp1 regulates T cell homeostasis by limiting IL-4 signals. *J. Exp. Med.* **210**, 1419–1431 (2013).
46. E. R. Mercadante, U. M. Lorenz, T cells deficient in the tyrosine phosphatase SHP-1 resist suppression by regulatory T cells. *J. Immunol.* **199**, 129–137 (2017).
47. T. Kamata *et al.*, src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* **111**, 109–119 (2003).
48. J. A. Frearson, D. R. Alexander, The phosphotyrosine phosphatase SHP-2 participates in a multimeric signaling complex and regulates T cell receptor (TCR) coupling to the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in Jurkat T cells. *J. Exp. Med.* **187**, 1417–1426 (1998).
49. N. Gautam *et al.*, Themis controls T cell activation, effector functions, and metabolism of peripheral CD8(+) T cells. *Life Sci. Alliance* **6**, e202302156 (2023).
50. P. Diethelm *et al.*, LCMV induced downregulation of HVEM on antiviral T cells is critical for an efficient effector response. *Eur. J. Immunol.* **52**, 924–935 (2022).
51. M. Mehta *et al.*, Themis-associated phosphatase activity controls signaling in T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E11331–E11340 (2018).
52. J. Zhang *et al.*, THEMIS is a substrate and allosteric activator of SHP1, playing dual roles during T cell development. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **31**, 54–67 (2024).
53. C. Brockmeyer *et al.*, T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *J. Biol. Chem.* **286**, 7535–7547 (2011).
54. T. Bellon, F. Kitzig, J. Sayos, M. Lopez-Botet, Mutational analysis of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs of the Ig-like transcript 2 (CD85j) leukocyte receptor. *J. Immunol.* **168**, 3351–3359 (2002).
55. D. H. Peng *et al.*, Collagen promotes anti-PD-1/PD-L1 resistance in cancer through LAIR1-dependent CD8(+) T cell exhaustion. *Nat. Commun.* **11**, 4520 (2020).
56. A. Singer, S. Adoro, J. H. Park, Lineage fate and intense debate: Myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 788–801 (2008).
57. Y. Morel, A. Truneh, R. W. Sweet, D. Olive, R. T. Costello, The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J. Immunol.* **167**, 2479–2486 (2001).
58. X. Li *et al.*, Lymph node fibroblastic reticular cells deposit fibrosis-associated collagen following organ transplantation. *J. Clin. Invest.* **130**, 4182–4194 (2020).
59. G. Cai, G. J. Freeman, The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: A bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunol. Rev.* **229**, 244–258 (2009).
60. C. Battin *et al.*, BTLA inhibition has a dominant role in the cis-complex of BTLA and HVEM. *Front. Immunol.* **13**, 956694 (2022).
61. M. W. Steinberg, T. C. Cheung, C. F. Ware, The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol. Rev.* **244**, 169–187 (2011).
62. T. C. Cheung *et al.*, Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 16535–16536 (2009).
63. Y. Wang *et al.*, The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *J. Clin. Invest.* **115**, 711–717 (2005).
64. M. W. Steinberg *et al.*, A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **205**, 1463–1476 (2008).
65. M. Pierer *et al.*, Herpesvirus entry mediator-Ig treatment during immunization aggravates rheumatoid arthritis in the collagen-induced arthritis model. *J. Immunol.* **182**, 3139–3145 (2009).
66. Y. Xu *et al.*, Selective targeting of the LIGHT-HVEM costimulatory system for the treatment of graft-versus-host disease. *Blood* **109**, 4097–4104 (2007).
67. Q. Ye *et al.*, Modulation of LIGHT-HVEM costimulation prolongs cardiac allograft survival. *J. Exp. Med.* **195**, 795–800 (2002).
68. K. X. Fan *et al.*, Blockade of LIGHT/HVEM and B7/CD28 signaling facilitates long-term islet graft survival with development of allospecific tolerance. *Transplantation* **84**, 746–754 (2007).
69. J. Wang *et al.*, The critical role of LIGHT in promoting intestinal inflammation and Crohn's disease. *J. Immunol.* **174**, 8173–8182 (2005).
70. T. C. Cheung *et al.*, T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding microenvironment. *J. Immunol.* **183**, 7286–7296 (2009).
71. M. Rangachari *et al.*, Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat. Med.* **18**, 1394–1400 (2012).
72. C. A. Egelston *et al.*, Human breast tumor-infiltrating CD8(+) T cells retain polyfunctionality despite PD-1 expression. *Nat. Commun.* **9**, 4297 (2018).
73. Y. Shen *et al.*, PD-1 does not mark tumor-infiltrating CD8+ T cell dysfunction in human gastric cancer. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000422 (2020).
74. D. T. Utzschneider *et al.*, T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion. *Nat. Immunol.* **14**, 603–610 (2013).
75. B. Chatterjee *et al.*, CD8(+) T cells retain protective functions despite sustained inhibitory receptor expression during Epstein-Barr virus infection in vivo. *Plos Pathog.* **15**, e1007748 (2019).
76. R. Lesourne *et al.*, Interchangeability of themis1 and themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J. Immunol.* **189**, 1154–1161 (2012).
77. B. Lepenies *et al.*, Ligation of B and T lymphocyte attenuator prevents the genesis of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* **179**, 4093–4100 (2007).

Supporting Information Text

Materials and Methods

Flow Cytometry

For flow cytometry analysis, single-cell suspensions from the spleen or lymph nodes were incubated with diluted eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 780 (ThermoFisher Scientific) in phosphate-buffered saline (PBS), 1% fetal calf serum, and 2 mM EDTA before undergoing staining with the following fluorochrome-conjugated antibodies: anti-CD4 (RM4-5), anti-BTLA (6A6), anti-CD5 (53-7.3) from Biolegend, anti-CD8 α (53-6.7), anti-TCR β (H57-597), anti-CD25 (PC61.5), anti-CD44 (IM7), anti-CD69 (H1.2F3) from eBioscience, anti PD-1 (J43, ThermoFisher), anti-CD62L (MEL-14), anti-CD24 (M1/69) from BD Bioscience, anti-CD45.1 (A20), anti-TCR V α 3.2 (REA359) and anti-TCR V β 11(REA657) from Miltenyi Biotech. Intracellular staining was performed with the FOXP3 staining buffer (00-5523-00, eBioscience) containing the following fluorochrome conjugated antibodies: anti-T-BET (4B10), anti-IFN γ (XMG1.2) and anti-TNF α (MP6- XT22) from BD Bioscience. Data acquisition was performed on a BD LSR FortessaTM X- 20 flow cytometer from BD Bioscience, and data were analyzed using the FlowJo software. For flow cytometry analysis of thymic epithelial cells, fresh thymus were digested in RPMI medium containing 0.05% Liberase TH and 100U/ml DNase I and mechanically disrupted. After complete digestion, cells were stained with anti-CD45.2 (104-2) from Miltenyi, with anti-CD80 (16-10A1), anti-EpCAM (G8.8), anti-MHCII (M5/114.15.2), anti-Ly51 (6C3) and anti-HVEM (HMHV-1B18) from Biolegend and with UEA1 lectin from Sigma.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Enzyme Immunoassays were used to assess cytokine secretion levels in culture supernatants. Briefly, 96-well plates were coated for 3 hours at 37°C with anti-IL-2 (JES6- 1A12) from BD

Biosciences in carbonate buffer 0.05M pH 9.6. Culture medium or standards were incubated for 2 hours at 37°C. The plates were then incubated for 2 hours with secondary biotinylated antibodies specific for each cytokine, which was followed by a 20-min incubation with streptavidin-conjugated alkaline phosphatase at 37°C. Last, plates were revealed by alkaline phosphatase substrate, and the absorbance was measured at 450 and 540 nm.

Western blotting analysis

Proteins were resolved by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes according to standard protocols. Membranes were blocked with 5% milk in tris-buffered saline containing Tween at 0.05% for 1 hour at room temperature before being incubated with primary antibodies at 4°C overnight. For T-cell signaling analysis and immunoprecipitation studies the following antibodies were used: anti-pZAP70 (2717S), anti-pERK (9101S) from Cell signaling, anti-GAPDH (MAB374) from R&D, anti-oxidized-PTP (MAB2844) from R&D, anti-SHP-1 (07-419, Millipore) anti-BTLA (AF3007, R&D), anti-THEMIS (3A3, Millipore). After washing, membranes were incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Subsequently, membranes were incubated with enhanced chemiluminescence solution (Sigma-Aldrich) for 5 min in the dark, and luminescence was captured with a Bio-Rad XRS+ imager. Band intensities were quantified with Bio-Rad ImageLab software. Values from the quantitated bands were normalized for loading differences with GAPDH as a control. The percentages of inhibition were calculated by dividing the intensity values obtained for pZAP and pERK by Western blot upon TCR+BTLA stimulation to those obtain upon TCR stimulation. Western blots in Fig. 2B display independent experiments that were regroup in one single figure for clarity of reading.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis were performed using unpaired t test except for Figure 2 where paired t test were used. Mann-Whitney test was used for nonparametric tests. P values < 0.05 were considered statistically significant (*p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,001).

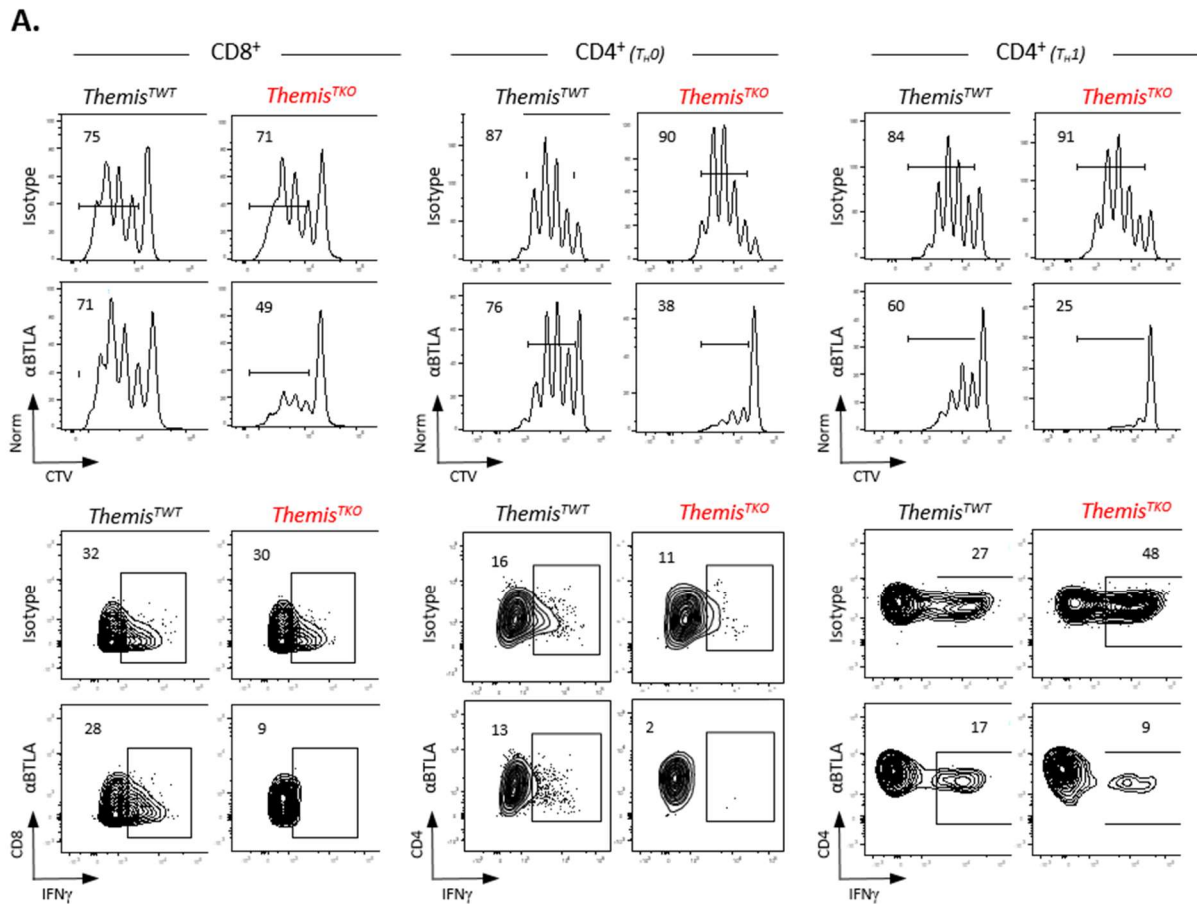


Figure S1. Effects of THEMIS deficiency on BTLA-mediated inhibition in CD4+ and CD8+ T cells. Representative histogram graphs and dot plots of data showed in Figure 1A-1E. Naïve CD44⁻ CD25⁻ CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice were stained with Cell Trace violet (CTV) and stimulated with the indicated doses of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of plate-bound anti-BTLA antibodies or isotype control antibody in non-polarizing or T_{H1} polarizing cell-culture medium for 72 hours. The histogram graphs show the CTV dilution in CD4⁺ and CD8⁺ T cells isolated from mice of the indicated genotype. Dot plots show CD4 versus IFN γ staining in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from mice of the indicated genotype

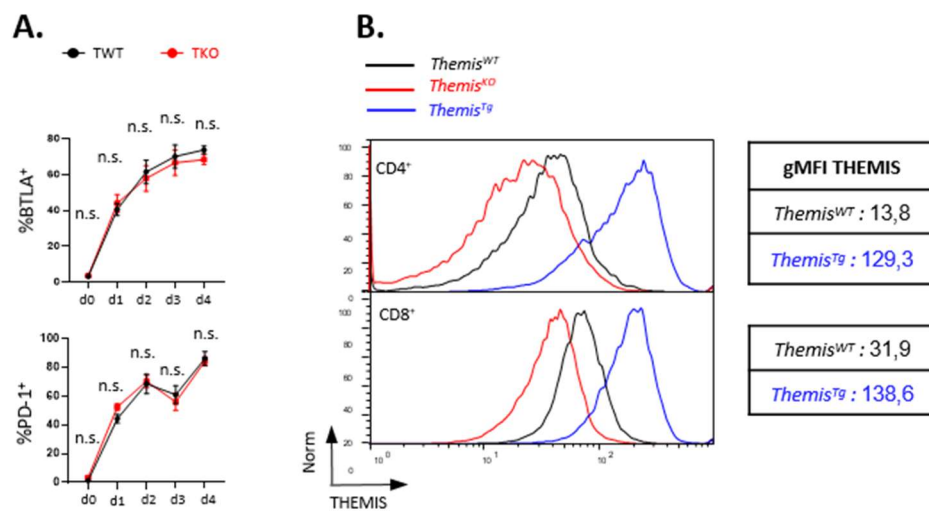


Figure S2. Expression of BTLA and THEMIS in CD4+ and CD8+ T cells. (A) Naïve CD44⁻ CD25⁻ CD4⁺ T cells from Themis^{TWT} and Themis^{TKO} mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. The curves represent the percentages of cells expressing BTLA and PD-1 as determined by flow cytometry at the indicated days (d) after stimulation. Data are mean \pm SEM and represent two independent experiments each including n = 3 mice per group. (B) Intracellular staining of THEMIS in CD4⁺ and CD8⁺ T cells isolated from Themis^{KO}, Themis^{WT} and Themis^{Tg} mice. Numbers represent the Δ MFI of THEMIS staining on the indicated T-cell subsets. Δ MFI of THEMIS is calculated by subtracting the gMFI of THEMIS in Themis^{KO} cells to the gMFI of THEMIS in Themis^{WT} and Themis^{Tg} cells.

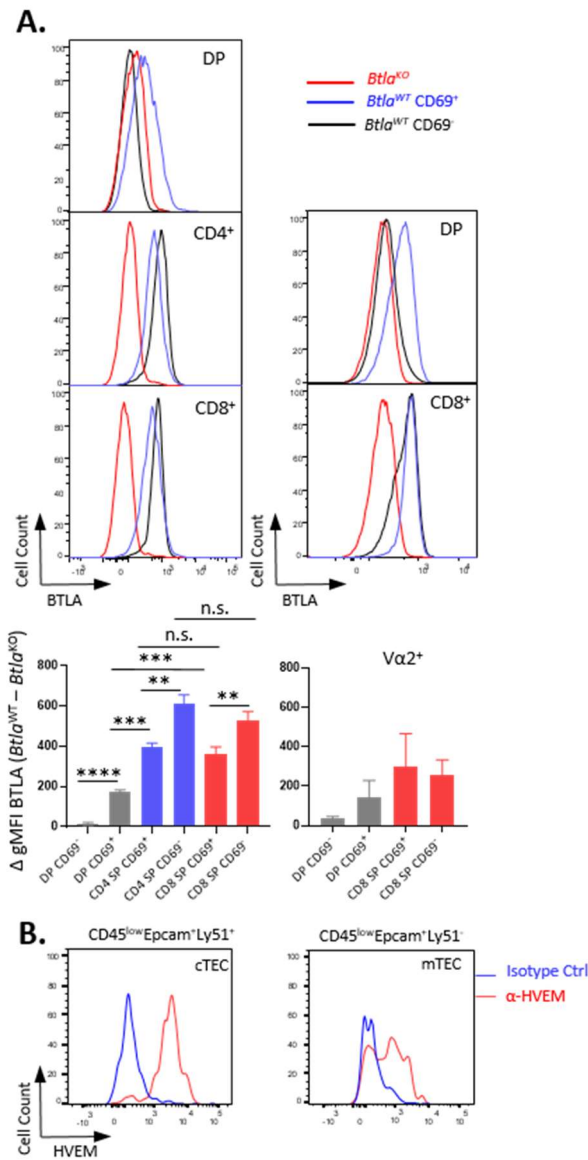


Figure S3. Expression level of BTLA and HVEM in thymocyte subsets and thymic epithelial cells. (A) Histogram graphs represent BTLA staining on the indicated thymocyte subsets from C57BL/6 (left histogram graphs) and OT-1-TCR transgenic (right histogram graphs) mice. Bar graphs represent the Δ MFI of BTLA staining on the indicated thymocyte subsets. Δ MFI is calculated by subtracting the gMFI of BTLA staining in *Btla*^{KO} mice to the gMFI of BTLA staining in wild-type mice. Data are mean \pm SEM and represent two independent experiments each including n = 3 mice per group. (B) The histogram graphs show HVEM surface expression on cortical (CD45^{low}Epcam⁺Ly51⁺) and medullary (CD45^{low}Epcam⁺Ly51⁻) thymic epithelial cells. Data are representative of two independent experiments each including n = 1-2 mice per group. Data were analyzed by unpaired two-tailed Mann-Whitney t test. *P < 0.05 and ***P < 0.001.

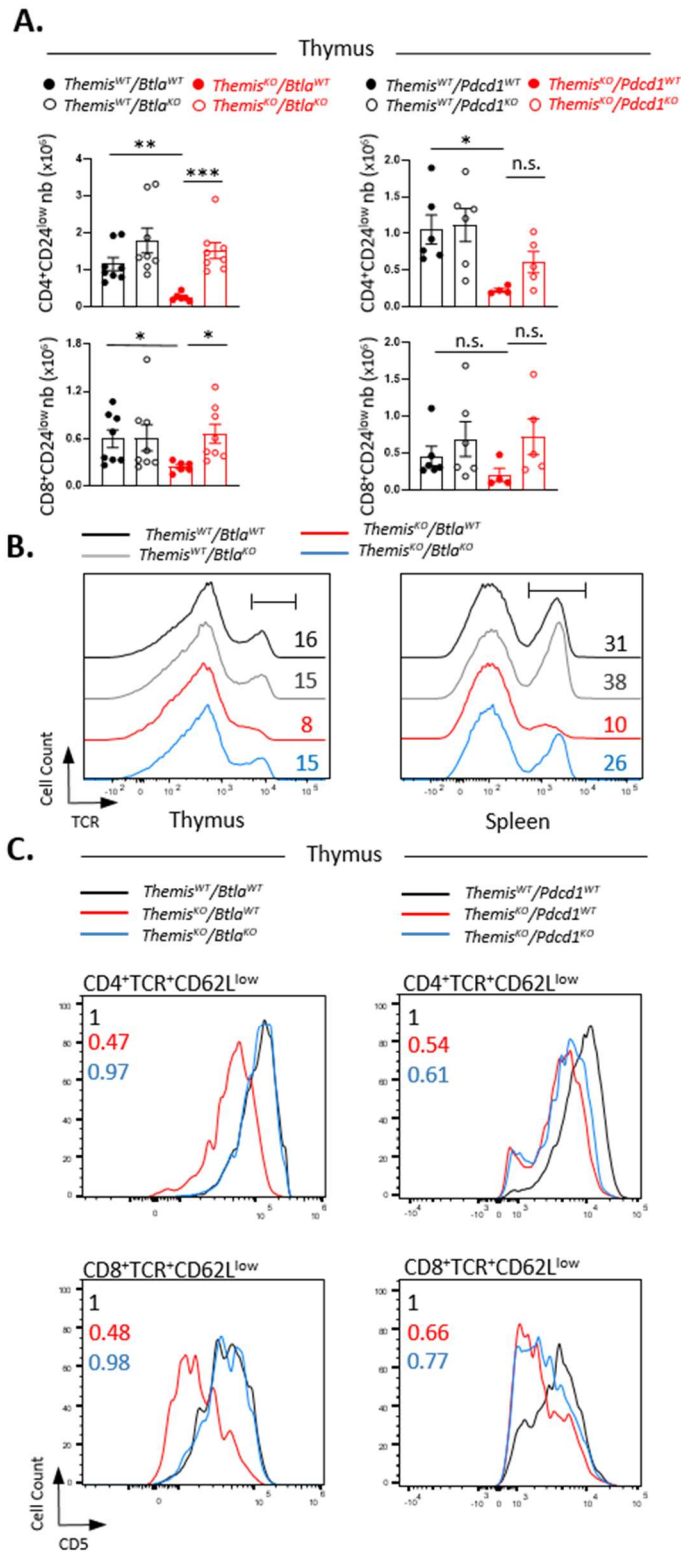


Figure S4. Deletion of BTLA restores thymocyte maturation and TCR signaling in *Themis*KO mice. (A) Bars graphs represent the numbers of CD24^{low} CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes from *Themis*^{WT}/*Btla*^{WT}, *Themis*^{KO}/*Btla*^{WT}, *Themis*^{WT}/*Btla*^{KO} and *Themis*^{KO}/*Btla*^{KO} mice and from *Themis*^{WT}/*Pcd1*^{WT}, *Themis*^{KO}/*Pcd1*^{WT}, *Themis*^{WT}/*Pcd1*^{KO} and *Themis*^{KO}/*Pcd1*^{KO} mice. Data are mean ± SEM and represent a pool of five independent experiments each including n = 1-2 mice per group. (B) Histogram graphs

represent the surface expression of the TCR on thymocytes and splenocytes from the indicated genotypes. Data are mean \pm SEM and represent a pool of five independent experiments each including n = 1-2 mice per group. (C) Histogram graphs represent the surface expression of CD5 on CD62LlowTCR+ CD4+ and CD8+ SP thymocytes from the indicated genotypes. Numbers represent the MFI of CD5 normalized to the MFI value on thymocytes from wild-type mice. Data were analyzed by unpaired two-tailed Mann-Whitney t test. *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001

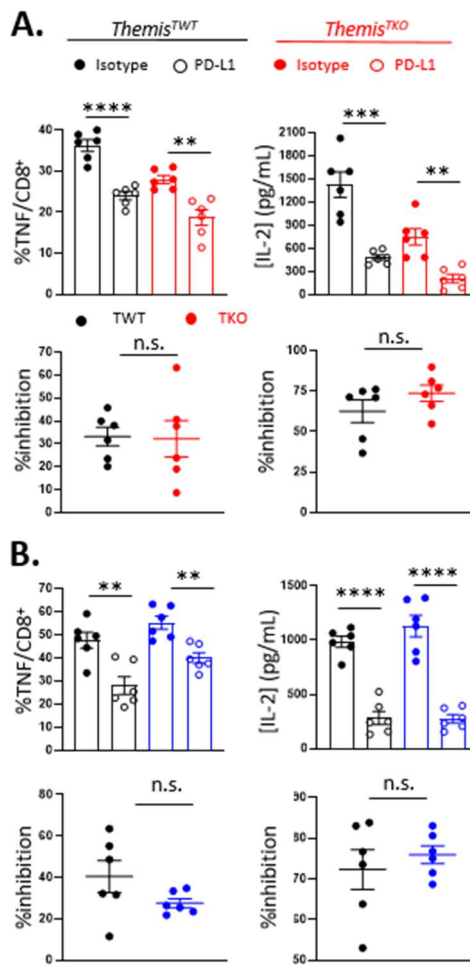


Figure S5. THEMIS does not regulate the ability of PD-1 to inhibit cytokine production in peripheral T cells. (A) Naïve CD44-CD25- CD8+ T cells from *Themis*^{TWT} and *Themis*^{TKO} mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of the indicated doses of plate bound recombinant PD-L1-Fc proteins or isotype control antibody. Bar graphs represent the percentages of cells that produced TNF α as determined by flow cytometry at 72 hours as well as the amount of IL-2 produced at 24 hours as measured by ELISA. Dot graphs represent the percentages of inhibition of each response by PD-1 in CD4+ T cells from *Themis*^{TWT} (black dots) and *Themis*^{TKO} (red dots) mice. Data are mean \pm SEM and represent two independent experiments each including n = 3 mice per group. (B) Naïve CD44-CD25- CD8+ T cells from *Themis*^{WT} and *Themis*^{Tg} mice were stained with CTV and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of plate bound recombinant PD-L1-Fc proteins or isotype control antibody. Bar graphs represent the percentages of cells that produced TNF α as determined by flow cytometry at 72 hours as well as the amount of IL-2 produced at 24 hours as measured by ELISA. Dot graphs represent the percentages of inhibition of each response by PD-1 in CD4+ T cells from *Themis*^{WT} (black dots) and *Themis*^{Tg} (blue dots) mice. Data are mean \pm SEM and represent two independent experiments each including n = 3 mice per group. Data were analyzed by unpaired two-tailed Mann-Whitney t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, and ****P < 0.0001

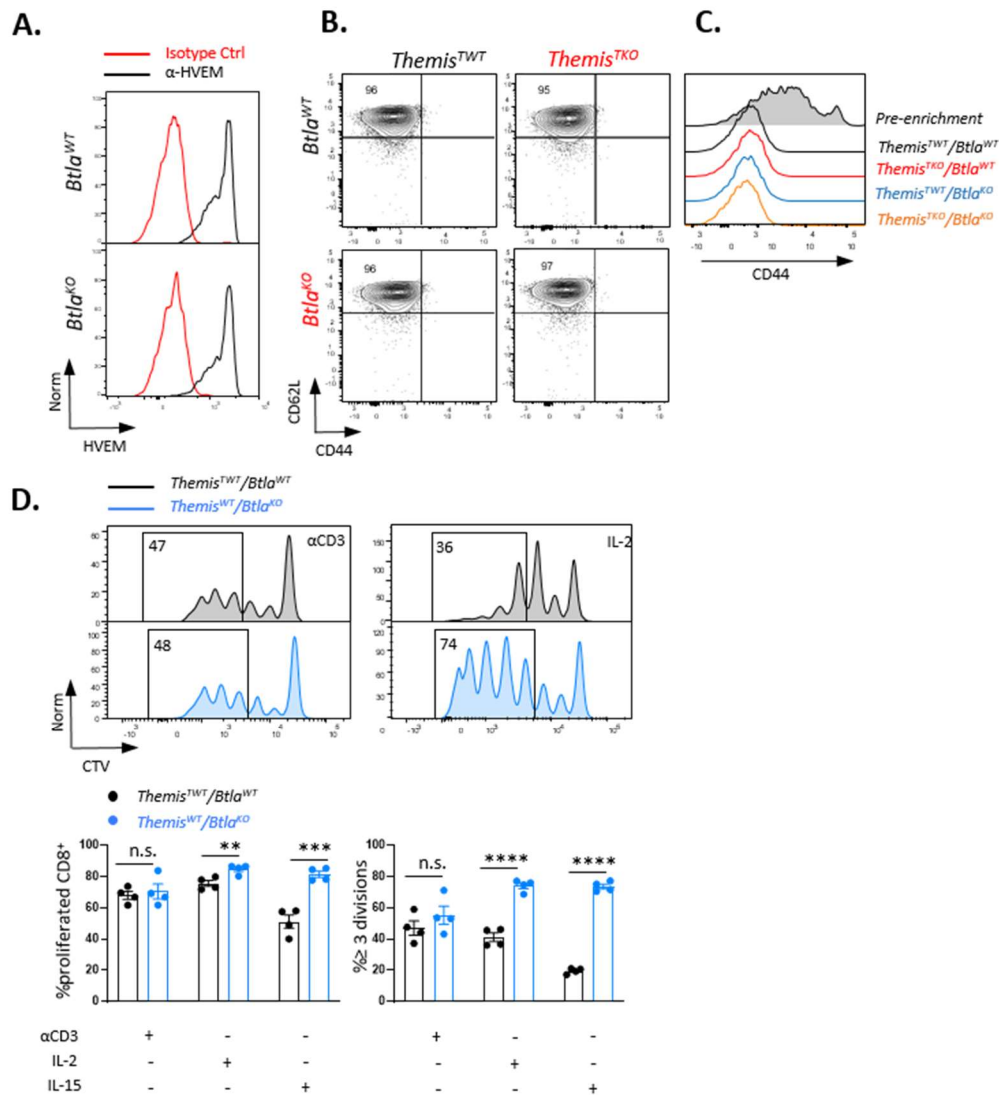


Figure S6. Deletion of BTLA does not modulate the proliferation of CD8+ T cells in response to TCR stimulation. (A) The histogram graphs show HVEM surface staining on CD8+ T cells from *Btla*^{WT} and *Btla*^{KO} mice stimulated for 7 days in medium containing IL-2. (B) Dot plots show CD62L versus CD44 surface staining on naïve CD8+ T cells purified with magnetic beads from the spleen and lymph nodes of *Themis*^{WT}/*Btla*^{WT}, *Themis*^{KO}/*Btla*^{WT}, *Themis*^{WT}/*Btla*^{KO} and *Themis*^{KO}/*Btla*^{KO} mice. (C) The histogram graphs show CD44 surface staining on CD8+ T cells from the indicated genotypes before and after enrichment of naïve CD8+ T cells. (D) Naïve CD44-CD25- CD8+ T cells from *Themis*^{WT}/*Btla*^{WT} and *Themis*^{WT}/*Btla*^{KO} mice were stained with CTV and cultured for 3 days with plate bound anti-CD3 antibodies (left histogram graphs) or for 7 days in medium containing IL-2 (right histogram graphs). Histogram graphs represent the CTV dilution in CD8+ T cells from mice of the indicated genotype. Bar graphs represent the percentages of cells that divided at least one time or that divided more than three times as represented by the gate in the CTV dilution histogram graphs. Data are mean ± SEM and represent two experiments including n = 2 mice per group. Data were analyzed by unpaired two-tailed Mann-Whitney t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001

Discussion

I. Relevance physiologique de l'axe THEMIS-BTLA

A. L'axe THEMIS-BTLA dans le développement thymique

Nos résultats montrent que THEMIS réprime la signalisation de BTLA afin de promouvoir la sélection positive des lymphocytes T dans le thymus. L'expression de BTLA est induite au cours de la sélection positive et se superpose à celle de THEMIS qui est progressivement diminuée après la sélection positive. Les raisons physiologiques de ce mécanisme de régulation stratifié demeurent incertaines. THEMIS dans le thymus atteint son pic d'expression dans les LT double positifs CD4⁺ et CD8⁺ TCR^{low}, et son expression diminue dans les DP post sélection positive TCR^{int} et TCR^{high} pour être maintenue à niveau faible dans les SP CD4⁺ et CD8⁺. Ainsi les souris THEMIS^{-/-} présentent une augmentation du nombre de DP et une diminution de SP. Ceci suggère que THEMIS agit principalement pendant le stade de la sélection positive. La stimulation *in vitro* de thymocytes DP issus de souris OT1 Tap1^{-/-} par le peptide OVA entraîne une diminution de l'expression de THEMIS, suggérant que l'expression de THEMIS est régulée négativement par la signalisation du TCR α/β ^{233,235}. Il est possible que l'expression de THEMIS soit modulée différemment selon le niveau d'affinité du ligand pour le TCR, et soit ainsi dépendante de l'intensité des signaux du TCR. L'expression de THEMIS a été inversement corrélée à celle de CD5, témoin moléculaire de la force du signal TCR. Plusieurs études montrent que l'expression de l'ARNm de THEMIS est induite dans les population DP CD5^{low}CD69^{low} et diminue dans les DP CD5^{high}CD69^{high}. Cependant l'expression protéique de THEMIS à l'inverse est augmentée dans les CD5^{high}CD69^{high}, et reste plus haute chez les CD69^{high} que les CD69^{low} même à la périphérie. Cette expression opposée de l'ARNm et de la protéine est expliquée par un processus de deubiquitylation par USP9X maintenant l'expression protéique de THEMIS après l'engagement du TCR. En absence de USP9X l'expression de THEMIS post sélection positive diminue, sans impact sur l'expression de l'ARNm. Ceci provoque également la diminution de la phosphorylation de SHP-1. De même l'ajout d'un inhibiteur de deubiquitylation P619 induit la diminution de l'expression protéique de THEMIS dépendante de la durée d'exposition. Ainsi un fort signal TCR inhibe l'expression de THEMIS, qui est maintenue par des deubiquitylases^{234,237}. Une autre étude compare les effets de THEMIS sur le flux calcique et la signalisation TCR en fonction du niveau d'affinité du peptide reconnu par le TCR. En utilisant des thymocytes provenant de souris OT1 et des

peptides de différentes affinités, les auteurs concluent que l'absence de THEMIS a plus de conséquences dans un contexte de stimulation avec les tétramères G4 et Q7, que dans le cas d'une stimulation avec le peptide OVA de forte affinité pour le TCR OT1. L'absence de THEMIS a également un plus fort effet dans le cas de stimulation courtes ²⁴¹. Ces données suggèrent que THEMIS promeut la sélection positive des thymocytes en stimulant les signaux TCR induits par des peptides de relativement faible affinité. La stimulation des thymocytes par des peptides de relativement forte affinité pourrait induire une diminution de l'expression de THEMIS et accroître les effets inhibiteurs de BTLA.

BTLA est également exprimé dans les DP au cours du développement thymique. Son expression a été décrite plus élevée dans les cellules CD69^{high} et drastiquement diminuée dans les souris TCR $\alpha^{-/-}$, impliquant son action au stade de la sélection du TCR α/β à l'instar de THEMIS. De même des travaux montrent une augmentation de son expression et de son association avec la chaîne ζ du TCR après stimulation du TCR par le peptide OVA. Contrairement à THEMIS, BTLA est donc induit après stimulation du TCR ^{252 253}. Il semblerait aussi que l'engagement de BTLA par HVEM soit associé à l'expression de CD5 à la périphérie, dans les DC et les Treg ²⁵⁴. Selon nos données, provenant de résultats non publiés, l'induction de BTLA dans les SP CD4⁺ et CD8⁺ CD69⁺ ne semble pas corrélée aux niveaux d'expression de CD5. (Figure 11). Ceci suggère que le niveau d'expression de BTLA augmente après la sélection positive mais varie peu selon la force des signaux du TCR (variation digitalisée). Dans des thymocytes stimulés par des CMH-peptides du soi de relativement forte affinité, l'expression de THEMIS serait diminuée ce qui permettrait à BTLA d'atténuer les signaux TCR, élicitant la sélection de lymphocytes ayant une capacité plus forte à reconnaître les CMH-peptides du soi. Ce mécanisme pourrait permettre d'élargir le répertoire TCR des thymocytes sélectionnés positivement augmentant ainsi la sensibilité et la réactivité du système immunitaire adaptatif en périphérie.

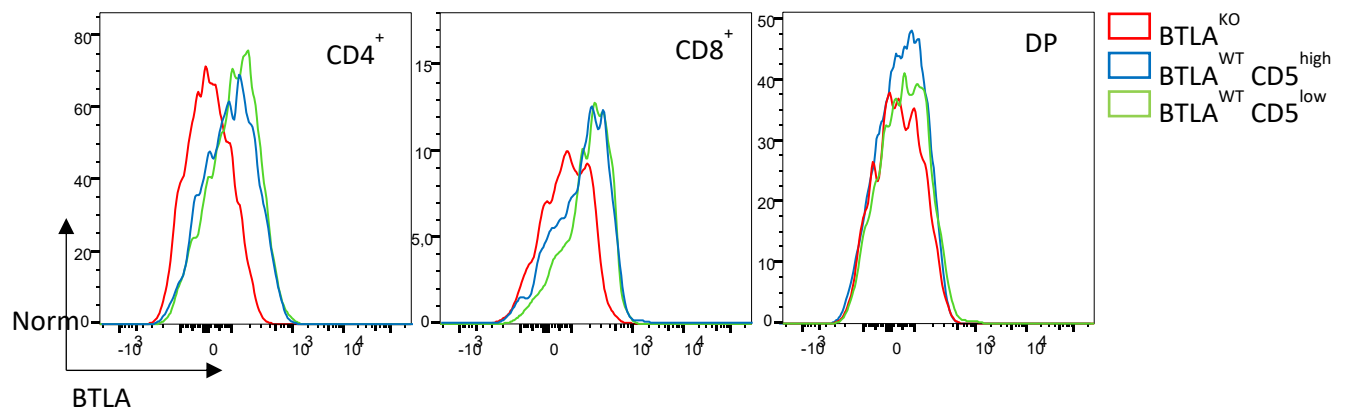


Figure 11. Expression de BTLA dans le thymus en fonction des niveaux d'expression de CD5. Des thymocytes provenant de souris sauvages ou déficientes pour BTLA ont été marquées pour le CD4, CD8, TCR, CD69 et CD5, et analysés par cytométrie en flux. Les courbes montrent, de gauche à droite des SP $CD4^+CD69^+$, SP $CD8^+CD69^+$, et des double positives $CD4^+CD8^+CD69^+$. Les courbes rouges représentent les thymocytes provenant des souris $BTLA^{KO}$. Les autres courbes des thymocytes provenant de souris sauvages présentant une forte expression de CD5 (courbes bleues) ou une faible expression de CD5 (courbes vertes).

B. L'axe THEMIS-BTLA dans le contrôle de l'homéostasie des lymphocytes T périphériques

Nos résultats indiquent que THEMIS bloque la capacité de BTLA à inhiber les réponses des LT naïfs à la périphérie induite par le TCR ou par les cytokines IL-2 et IL-15. À la périphérie, THEMIS est exprimé plus fortement dans les LT CD8⁺ que dans les LT CD4⁺ et la déficience en THEMIS entraîne une diminution des lymphocytes T CD8⁺ périphérique alors que le nombre de CD4⁺ n'est pas affecté ²³⁷. L'effet plus sélectif de THEMIS sur la population CD8⁺ pourrait donc être simplement lié au fait que THEMIS est plus exprimé dans ces cellules. D'autre part, les LT CD8⁺ dépendent de signaux différents de ceux dont dépendent les LT CD4⁺ pour leur survie et prolifération en condition d'homéostasie et l'impact de THEMIS sur ces signaux pourrait avoir des conséquences plus marquées sur le maintien des lymphocytes T CD8⁺ que sur celle des lymphocytes T CD4⁺.

1. THEMIS favorise-t-il le maintien des lymphocytes T CD8⁺ en stimulant la signalisation du TCR et celle induite par l'IL-2 et l'IL-15 ?

Nos résultats et ceux d'autres équipes montre que THEMIS stimule la prolifération des lymphocytes T naïfs induite par des stimulations sous-optimales du TCR en présence d'IL-7 et celle induite par des stimulations isolées d'IL-2 et d'IL-15 ²⁵⁵. La déficience en THEMIS n'a pas d'effet sur les signaux induit pas l'IL-7 seul. Ces résultats sont néanmoins basés sur des expériences *in vitro* et on ignore les mécanismes par lesquels THEMIS stimule l'homéostasie *in vivo*. On ne sait pas non plus si THEMIS agit de façon différente sur les lymphocytes naïfs et mémoires. La déficience en THEMIS entraîne une diminution du nombre de lymphocytes T CD8⁺ naïfs mais ne semble pas affecter le nombre lymphocytes CD8⁺ mémoires CD44^{high} ²⁴⁷. Néanmoins l'effet stimulateur de THEMIS sur la maintenance des lymphocytes CD8⁺ mémoires pourrait être masquée par une différenciation accrue des lymphocytes naïfs en lymphocytes CD44⁺, phénomène bien caractérisé dans les environnement lymphopénique. D'autre part, l'absence de THEMIS provoque une modification du répertoire TCR parmi les CD8⁺ périphériques. Le nombre de CD8⁺ présentant un TCR V α 3.2⁺ augmente dans les souris THEMIS^{-/-} et ces cellules ont une expression accrue de CD5, CD44 et CD122, correspondant à un phénotype mémoire. La réponse des V α 3.2⁺ à la stimulation *in vitro* IL-7, IL-18 est plus élevée que les V α 3.2⁻ et cette différence est accrue en absence de THEMIS. Des résultats

similaires sont observés *in vivo* dans un contexte lymphopénique, ainsi qu'après infection avec LM-OVA. Dans l'ensemble, les auteurs établissent que cette population Vα3.2⁺ mémoire est capable de s'expandre en condition lymphopénique due à l'absence de THEMIS²⁵⁶.

Le maintien des LT CD8⁺ à la périphérie requiert des signaux faibles provenant d'antigènes du soi présentés par le CMHI et des signaux induits par des cytokines, telles que l'IL-7, l'IL-2 et l'IL-15, liant les récepteurs dotés d'une chaîne γ. Les lymphocytes naïfs et les lymphocytes mémoires ne sont pas maintenus par les mêmes signaux. Les LT naïfs dépendent principalement de signaux TCR faibles et de signaux induits ainsi que de la signalisation IL-7, tandis que les LT mémoires (CD44^{high}CD122⁺IL-7R^{high}) sont surtout dépendant des cytokines IL-7 et IL-15, et aussi dans une moindre mesure de l'IL-2²⁵⁵. L'absence d'IL-15 entraîne une diminution du nombre de CD8⁺ mémoires. Une étude comparant les effets des cytokines IL-2 et IL-15 montre que dans le cas d'une stimulation *in vitro*, l'IL-15 stimule la prolifération de cellules CD44^{high} de manière drastiquement plus prononcée que l'IL-2. Cet effet est limité aux CD8⁺ et ne concerne pas les CD4⁺CD44^{high}. *In vivo*, l'analyse de l'incorporation du BrdU montre que des souris injectées avec l'IL-15 présentent un nombre supérieur de cellules CD8⁺CD44^{high} et CD122^{high} par rapport aux groupe témoin alors que les populations CD4⁺ ne semblent pas affectées. Il est admis que les population LT CD4⁺ ne dépendent pas de l'IL-15 pour leur maintien en périphérie. Il serait intéressant de vérifier si le défaut de prolifération homéostatique chez les souris THEMIS^{TKO} peut être restauré en injectant de l'IL-15. L'IL-2 induit une augmentation des nombres de CD8⁺CD44^{high} moins prononcée que celle induite par l'IL-15 et au contraire de l'IL-15 agit également dans les CD4⁺²⁵⁷. D'autres travaux comparent cette fois-ci les effets de l'IL-15 avec l'IL-7. Chez des souris β2m^{-/-} manquant l'interaction CMHI-peptide/TCR, les CD8⁺CD44^{high} prolifèrent, mais pas les CD8⁺CD44^{low} qui, concordant à leur statut de cellules naïves, ne peuvent pas se passer de signaux TCR. Il y a une diminution de la prolifération chez les populations CD44^{low} dans les souris IL-7^{-/-} et des populations CD44^{high} chez les souris IL-7^{-/-} IL-15^{-/-}²⁵⁸.

L'ensemble de ces données suggèrent que THEMIS promeut la maintenance des lymphocytes T naïfs en stimulant les signaux faibles de TCR nécessaire à la survie et à la prolifération homéostatique de ces cellules. Cette conclusion s'accorde bien avec les effets de THEMIS sur la sélection positive qui elle aussi dépend des interactions du TCR avec des antigènes de faible affinité. D'autre part, THEMIS pourrait également stimuler la maintenance des lymphocytes T

mémoires en stimulant les signaux déclenchés par l'IL-15 et dans une moindre mesure par l'IL-2 qui sont réprimés par SHP-1. L'absence d'IL-15 n'a par contre pas d'effet sur les Tregs, au contraire de l'IL-2. Au contraire, les naïves dépendantes de l'IL-7 subissent une perte de prolifération. Cet effet n'est pas visible dans les CD4⁺ qui ne dépendent ni de l'IL-7, ni de l'IL-15⁹⁷.

L'absence de THEMIS provoque une perte de prolifération dans un contexte de stimulation de CD8⁺ naïfs *in vitro*, dans le cas de stimulation par IL-2, et IL-15, mais pas IL-7 seul²⁵¹. Cependant nos résultats montrent une influence de THEMIS sur la capacité de BTLA à bloquer la prolifération en conditions de maintien de CD8⁺ naïfs, avec de l'IL-7 et de faibles doses d'anti-CD3.

2. *BTLA, un récepteur inhibiteur impliqué dans le contrôle de l'homéostasie des lymphocytes T CD8⁺*

Une étude montre que BTLA régule l'homéostasie des lymphocytes T CD8⁺ ainsi que la capacité des lymphocytes T CD8⁺ à monter une réponse mémoire lors d'une réponse immunitaire. Les lymphocytes T CD8⁺ naïfs déficients pour BTLA ont une capacité accrue à proliférer par rapport aux contrôles sauvages à proliférer après transfert dans des souris RAG^{-/-}. Ceci suggère que BTLA réprime la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD8⁺ naïfs. Le mécanisme par lesquels BTLA opèrent dans ce contexte restent à élucider. Cependant, nos résultats suggèrent que BTLA peut inhiber la prolifération des cellules induite par des stimulations sous-optimales du TCR induit et de l'IL-7.

Les souris déficientes pour BTLA ont une augmentation du nombre de cellules présentant un phénotype mémoire CD44^{high}CD122^{high}CD43^{low}. Un phénotype similaire est observé dans les souris HVEM, suggérant que l'effet régulateur de BTLA dans ce contexte dépend de son interaction avec HVEM. L'absence de BTLA dans des souris exprimant le TCR OT1 spécifique du peptide OVA entraîne une augmentation de cellules mémoires spécifiques de l'antigène après immunisation. BTLA ne semble pas agir sur l'expansion à court terme dans ces conditions. Son absence impacte plutôt les étapes tardives de la formation de CD8⁺ mémoires¹⁹⁹. Ceci pourrait être expliqué par l'inhibition de la production d'IL-2 par BTLA, qui provoquerait une diminution de l'expansion à plus long terme. Ceci implique que BTLA n'agit pas seulement en réprimant les signaux du TCR mais aussi ceux des récepteurs aux cytokines.

Il a déjà été montré que BTLA pouvait inhiber la voie de l'IL-7R chez les $\gamma\delta$, son absence rendant les cellules plus sensibles au traitement IL-7, et SHP-1 est connu comme régulateur négatif de plusieurs cytokines comme l'IL-2, IL-4 et IL-13^{259 260,261}.

Dans le contexte de mon travail, nous confirmons que BTLA n'agit pas seulement en réprimant les signaux du TCR mais agit également en réprimant la signalisation des récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15. Ceci suggère que BTLA inhibe le maintien de LT CD8⁺ mémoires en inhibant les signaux tardifs de l'IL-2 et de l'IL-15. Nos résultats indiquent que BTLA est capable d'inhiber ces signaux *in vitro* en absence de stimulation externe par l'ajout d'un anticorps agoniste ou de son ligand HVEM. Nous supposons que BTLA en culture est engagé par l'expression de son ligand en interaction trans intercellulaire.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que BTLA a pour rôle de limiter la formation de cellules CD8⁺ mémoires. Il est possible que BTLA opèrent ainsi pour limiter l'accumulation de cellules mémoires hautement réactive aux antigènes et contrôler la balance entre les populations naïves et mémoires. Plusieurs études montrent que BTLA contribue à promouvoir un état d'exhaustion des cellules. Cet état d'exhaustion semble avoir un rôle physiologique puisqu'il favorise le maintien de cellules spécifiques d'antigènes qui continue à répondre à des stimulations antigéniques de façon atténuée.

THEMIS aurait donc pour rôle de contrebalancer l'inhibition médiée par BTLA et de soutenir le maintien d'un pool de cellules naïves. Le rôle de THEMIS dans la régulation de la réponse mémoire n'a pas encore été étudié mais les données sur BTLA suggèrent que THEMIS pourrait stimuler la différenciation des cellules mémoires en bloquant les effets inhibiteurs de BTLA. Il est possible que THEMIS agisse différemment dans ce contexte selon l'affinité des TCR pour les CMH-peptides comme nous le proposons dans le thymus.

II. Mécanisme moléculaire

A. THEMIS et Grb2 dans le signalosome LAT

Notre modèle établit une interaction de THEMIS avec BTLA dans un contexte de recrutement de THEMIS et SHP-1 à Grb2, cependant THEMIS est aussi recruté à LAT par l'intermédiaire de Grb2. Des interactomes de THEMIS caractérisent Grb2 comme son partenaire principal. Grb2 s'associe à la région PRR1 de THEMIS via son domaine SH3. Ainsi l'absence de la région PRR

sur THEMIS provoque un défaut de sélection positive et diminue l'interaction de THEMIS avec SHP-1. L'interaction de THEMIS avec Grb2 est donc nécessaire pour l'association du complexe SHP-1-THEMIS impliqué dans le développement thymique ^{238,262}. L'interactome de THEMIS identifie également LAT ainsi que VAV1 comme partenaires prépondérant de THEMIS. Dans les thymocytes post-sélection déficient pour THEMIS, il y a une diminution de la phosphorylation de VAV1 et de P38 après stimulation par un anti-CD3 et anti-CD4. VAV1 est recruté par LAT, puis est déphosphorylé par SHP-1. Ainsi, THEMIS pourrait agir sur VAV1 en bloquant SHP-1 et empêchant la déphosphorylation de VAV1 à LAT. VAV1 est un élément capital de la signalisation du TCR, nécessaire pour la sélection positive et négative dans le thymus ¹⁴³. Des souris présentant des mutations sur les tyrosines responsables du recrutement de Grb2 et de GADS présentent un défaut de développement sévère des lymphocytes entre le stade DN et le stade DP ²⁶³. VAV1 est nécessaire à la phosphorylation de PLC γ 1, Akt et l'activation de Rac1. L'absence de THEMIS semble induire une diminution de l'abondance de Grb2 à la surface de la cellule, mais Grb2 est nécessaire pour le recrutement de THEMIS. En effet, l'absence du domaine PRR de THEMIS le liant à Grb2 empêche l'association de THEMIS à LAT ²³⁸. Cette interaction participe au développement des lymphocytes T d'une manière BTLA indépendante.

Nos résultats suggèrent que la répression des signaux inhibiteurs de BTLA joue cependant un rôle crucial dans l'effet de THEMIS sur le développement des lymphocytes T, la déficience en BTLA étant capable de restaurer une sélection positive efficace dans les souris Themis^{-/-}. Il est donc possible que THEMIS stimule la sélection positive par plusieurs mécanismes en accroissant l'activité de VAV1 qui est recruté à LAT et en bloquant la signalisation inhibitrice de BTLA.

B. Mécanisme du recrutement de THEMIS à BTLA

Mon travail de thèse suggère que Grb2 pourrait contribuer au recrutement de THEMIS à BTLA et favoriser ainsi l'inactivation de SHP-1 par THEMIS. Grb2 aurait donc un rôle stimulateur dans le contexte de son recrutement à BTLA. Une étude utilisant des mutants de BTLA sur le site de fixation à Grb2 montre une diminution des voies de signalisations AKT et MAPK après liaison de HVEM. Ces résultats suggèrent aussi un rôle activateur de Grb2 après son interaction à BTLA, avec un effet stimulateur de Grb2 sur l'activité de la voie PI3K-Akt augmentant la

production d'IL-2²⁶⁴. Ces résultats s'accordent avec notre modèle et suggèrent que les effets stimulateurs de Grb2 dans le contexte de son recrutement à BTLA pourraient dépendre de sa capacité à favoriser le recrutement de THEMIS à BTLA. Cette diminution des réponses Akt et MAPK dans les conditions où Grb2 n'est pas recruté pourrait ainsi être en partie provoquée par l'absence de régulation négative des inhibiteurs de BTLA.

L'expression de THEMIS et son activité semblent être associées à des conditions de faible stimulation du TCR. Il serait intéressant de déterminer si l'interaction de THEMIS avec BTLA est modulée selon la force des signaux du TCR. L'expression de THEMIS est diminuée après engagement du TCR alors que celle de BTLA est augmentée dans des conditions similaires de stimulation. Il serait donc aussi intéressant de réaliser une étude de la cinétique de recrutement de THEMIS à BTLA à des temps courts, avant que l'expression de THEMIS soit diminuée, et à des temps plus longs après activation, pour déterminer si l'interactome de BTLA est différent selon l'état d'activation des cellules. THEMIS pourrait ainsi promouvoir les signaux précoces de signalisation du TCR en bloquant la signalisation inhibitrice de BTLA pour faciliter l'activation cellulaire. BTLA pourrait exercer ses effets inhibiteurs à des temps plus tardifs, dans des conditions où THEMIS est moins exprimée, pour réguler l'expansion ou les réponses effectrices des cellules.

La présence des ROS dans la cellule semble déterminer la capacité de THEMIS à bloquer SHP-1. La phosphorylation de ZAP-70 dans des thymocytes est réduite en absence de THEMIS dans des conditions induisant des espèces réactives de l'oxygène mais pas dans des conditions où celles-ci sont peu induites. On peut ainsi supposer que l'effet répressif de THEMIS sur BTLA soit dépendant de la présence de ROS dans le milieu intracellulaire. Dans des conditions riches en ROS, THEMIS aurait une capacité forte à réprimer BTLA alors qu'à l'inverse, dans des conditions pauvres en ROS, SHP-1 serait faiblement oxydée et BTLA aurait des capacités inhibitrices renforcées.

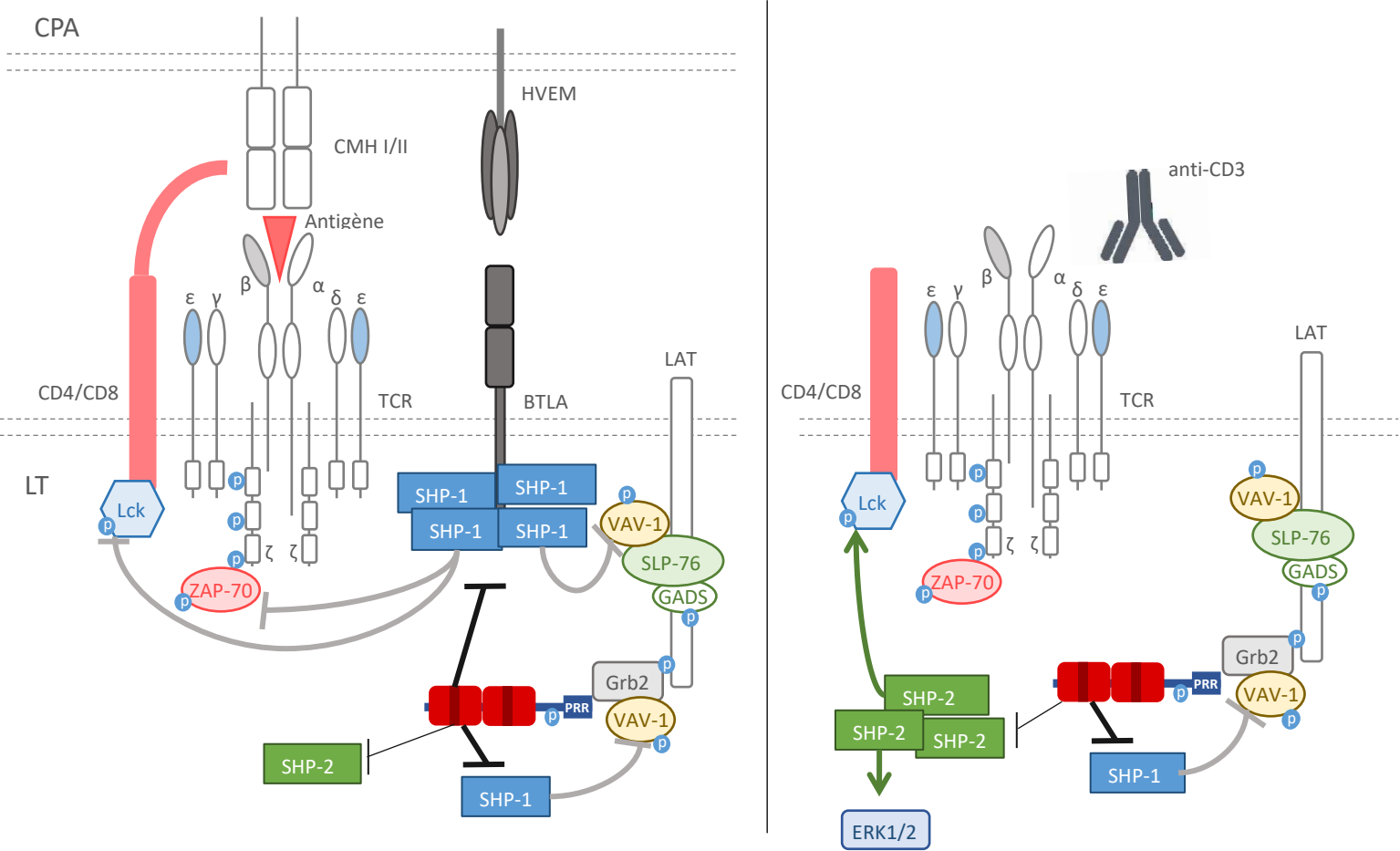
C. THEMIS et SHP-1

Nos travaux suggèrent que THEMIS opèrent comme un régulateur négatif de l'activité phosphatase de SHP-1 dans le contexte de son association avec BTLA et sont en accord avec le modèle dans lequel THEMIS fonctionne en réprimant l'activité de SHP-1. Pourtant, deux études suggèrent au contraire que THEMIS opère comme un co-activateur de SHP-1 et favorise son action inhibitrice. Un de ces articles suggère que Lck phosphoryle un motif contenant la tyrosine Y₃₄ de THEMIS, qui agit une fois phosphorylé comme un activateur allostérique de SHP-1. Un modèle conciliant les effets opposés de THEMIS sur SHP-1 est difficile à établir, et aucune explication structurale n'a pour l'instant été élaborée ^{241,265}.

L'absence de THEMIS après stimulation du TCR in vitro est le plus souvent associée à une augmentation de l'activation d'éléments de la signalisation TCR comme LCK, LAT et ERK. Il semble néanmoins que les effets de THEMIS sur la signalisation du TCR soit dépendant du contexte de stimulation lors des analyses in vitro. Dans les thymocytes et les lymphocytes T humains primaires, l'effets inhibiteurs de THEMIS sur la signalisation du TCR est principalement révélé lorsque les lymphocytes T sont stimulés par des antigènes de faible affinité. La déficience en THEMIS ne semble pas avoir d'effet par contre dans les lymphocytes T périphériques murins stimulés dans ces mêmes conditions. THEMIS inhibe la production d'IFN γ dans un contexte de polarisation Th1 mais exerce un effet stimulateur sur la production d'IFN γ lorsque les cellules effectrices sont stimulées par des cellules présentatrices d'antigène. Contrairement aux analyses in vitro, les analyses in vivo des effets de la déficience en THEMIS dans différents contextes soutiennent de façon quasi systématique l'hypothèse d'un effet stimulateur de THEMIS sur la signalisation du TCR. Les souris THEMIS^{-/-} ont un défaut combiné de sélection positive et négative, elles présentent une redirection des thymocytes restreint au CMH de classe II vers le lignage CD8⁺. Les thymocytes exprimant le TCR AND en combinaison avec un transgène reporter de la signalisation du TCR (Nur-77 GFP) montre une signalisation du TCR atténuée en absence de THEMIS. Les souris déficientes pour THEMIS dans les lymphocytes T périphériques développent des pathologies auto-immunes moins sévère et développent des réponses Th1 moins efficaces. Le défaut de développement des lymphocytes T et de maintenance des lymphocytes CD8⁺ en périphérie sont corrigés lorsque le gène codant pour SHP-1 est invalider, indiquant que la déficience en THEMIS est la conséquence d'une

In vivo : Engagement du TCR et de BTLA

In vitro : Stimulation du TCR seul



THEMIS favorise les signaux du TCR en bloquant préférentiellement les SHP-1 recrutés par BTLA

En absence d'engagement de BTLA, THEMIS bloque à la fois SHP-1 et SHP-2

Figure 12. Modèle de l'effet de THEMIS sur la signalisation du TCR en fonction de la présence des phosphatases SHP-1 et SHP-2. (À gauche) L'engagement de BTLA par son ligand induit le recrutement de phosphatases SHP-1. THEMIS bloque l'activité inhibitrice de SHP-1 après son recrutement à BTLA. (À droite) En situation de stimulation seule du TCR, SHP-1 n'est pas recruté par BTLA. THEMIS agit préférentiellement sur SHP-1 plutôt que SHP-2, et les signaux activateurs de SHP-2 sont ainsi prévalents sur les signaux inhibiteurs de SHP-1. *Figure adaptée de Mélique et al. Negative times negative equals positive, THEMIS sets the rule on thymic selection and peripheral T cell responses, Biomedical Journal, 2022*

activité augmentée de SHP-1 *in vivo* et donc vraisemblablement une atténuation des signaux du TCR²⁴⁷.

Nous supposons que les discordances observées entre les effets de THEMIS *in vitro* et ceux observés *in vivo* repose sur l'action différentes des phosphatases SHP-1 et SHP-2 sur la signalisation du TCR. (Figure 12) Dans un contexte de culture cellulaire *in vitro*, la stimulation par anti-CD3 permet l'engagement du TCR, mais pas celui de BTLA. Il est montré que SHP-1 en conditions *in vitro* de stimulation du TCR, agit de manière limitée sur la signalisation du TCR. THEMIS réprimerait à la place SHP-2, présent de manière libre dans le cytoplasme, et bloquerait ses effets activateurs. Au contraire, en contexte *in vivo* dans lequel BTLA est engagé par son ligand et recrute donc SHP-1, THEMIS bloquerait préférentiellement les signaux de SHP-1 par rapport à SHP-2. Nos résultats récents confirment que THEMIS est bien capable de réprimer l'activité inhibitrice du complexe SHP-1-BTLA.

Il est aussi possible que THEMIS puisse agir à la fois en tant que régulateur négatif, et régulateur positif de SHP-1 selon le contexte biologique. Il est connu que l'absence de Grb2 provoque un défaut dans le développement thymique. Les souris déficientes pour Grb2 subissent une diminution de la phosphorylation de plusieurs acteurs de l'activation cellulaire comme par exemple p38²⁶⁶. On pourrait supposer que l'absence de Grb2 empêche THEMIS d'agir sur l'activité phosphatase de SHP-1, et pourtant il y a toujours formation d'un complexe THEMIS-SHP-1 dans les thymocytes déficients pour Grb2²⁴⁴. Cette association de THEMIS et SHP-1 existe donc hors du contexte de leur association à Grb2, et l'inhibition de SHP-1 par THEMIS en absence de Grb2 ne suffit pas à rétablir la sélection positive. Il est donc possible que dans ce contexte, THEMIS n'inhibe pas les signaux de SHP-1 mais les favorise à la place. D'autre part, une étude récemment parue montre THEMIS comme activateur de SHP-1, et décrit cette activation comme nécessaire au développement des lymphocytes T CD4⁺, mais pas sur celle des lymphocytes T CD8⁺. De plus ce mécanisme n'est pas non plus impliqué dans le maintien post thymique des CD8⁺, qui dépend de signaux différents de ceux du TCR²⁶⁷. L'activation de SHP-1 par THEMIS décrite dans cette étude n'est donc pas impliquée dans les contextes de développement des LT CD8⁺ et de leur maintien en périphérie, contrairement au mécanisme que nous décrivons. Nos résultats montrent que l'inhibition de SHP-1 par THEMIS, dans le contexte de son association à BTLA, est essentielle pour le développement des LT CD4⁺, il est donc possible que THEMIS puisse induire à la fois des signaux inhibiteurs et activateurs sur SHP-1.

III. Transposition des résultats à d'autres contextes physiologiques et physiopathologiques et à d'autres récepteurs inhibiteurs

A. Contexte physiopathologique

Nos travaux montrent que THEMIS stimule l'activation et la différenciation des lymphocytes T en réprimant les fonctions inhibitrices de BTLA. Nous avons établi cette interaction dans un contexte physiologique de développement thymique de maintenance des lymphocytes T CD8⁺ dans lequel THEMIS joue un rôle important. Cependant THEMIS et BTLA interviennent dans d'autres contextes, physiologiques et physiopathologiques. Dans un contexte tumoral, l'expression de BTLA a été identifiée à la surface de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) et est associée à une réponse antitumorale atténuée dans de nombreux cas de cancer différents. Notamment, chez un cancer de la vésicule biliaire, BTLA a été identifié à la surface de TIL, et cette expression est associée à un mauvais pronostic, avec une survie plus faible²⁶⁸. Des résultats similaires ont été trouvés dans le cas du lymphome DLBCL, ainsi que le mélanome. Dans celui-ci, BTLA est exprimé à la surface de LT CD8⁺ spécifiques d'antigènes tumoraux. Ces cellules ont une capacité cytotoxique amoindrie en comparaison des lymphocytes T CD8⁺ n'exprimant pas BTLA. L'application d'un vaccin utilisant un peptide issu du mélanome provoque l'augmentation des fonctions cytotoxiques des CD8⁺ tumeur spécifiques, ainsi que la diminution de l'expression de BTLA à la surface de ces cellules^{269,270}. Des traitements contre le cancer, basés sur l'utilisation d'anticorps antagonistes ciblant BTLA ont récemment été développés pour des tests clinique. Il a été observé qu'un anticorps bloquant BTLA dans une étude clinique sur des patients atteints de carcinome ovarien augmente l'efficacité de la chimiothérapie²⁷¹. BTLA est donc impliqué dans la répression de la réponse antitumorale, et offre une cible possible pour des traitements en appoint ou non des traitements en cours. THEMIS a été peu étudié *in vivo* dans un contexte tumoral. Cependant, la déficience pour THEMIS provoque une augmentation de l'efficacité des TIL dans un modèle *in vitro* de culture tumorale en 3D. Les auteurs utilisent des cellules LT CD8⁺ au TCR transgénique OT1 reconnaissant le peptide OVA, ainsi que des tumeurs B16 présentant un peptide OVA ou un peptide Q4R7 possédant moins d'affinité que l'OVA pour le TCR OT1. Les CD8⁺ déficients pour

THEMIS provoque une mort de cellules cibles diminuée par rapport au CD8⁺ exprimant THEMIS. Cette différence est plus importante dans le cas du peptide Q4R7, ce qui concorde avec le modèle dans lequel THEMIS agit plus dans un contexte de reconnaissance peptidique de faible affinité. Cet effet de l'absence de THEMIS est cependant limité à une durée de culture courte (24h) et s'atténue lors d'une plus longue période, impliquant que l'action de THEMIS est régulée à long terme, ou que des phénomènes compensatoires se développent en son absence ²⁷².

D'autre part, dans un contexte de maladie infectieuse cette fois, l'expression de BTLA a été généralement associée avec de faibles réponses immunitaires contre les pathogènes. Par exemple, dans un modèle de Malaria expérimentale, la déficience en BTLA induit une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-5 ou l'IFN γ . Ceci est également associé à plus large échelle à une diminution à générale du nombre de parasites ²⁷³. Dans un autre modèle infectieux utilisant *Listeria monocytogenes*, les lymphocytes n'exprimant pas BTLA produisent plus de cytokines pro-inflammatoires après stimulation par *listeria* neutralisé. L'absence de BTLA réduit drastiquement le nombre d'UFC (Unité formant une colonie), tandis que l'absence de LIGHT à l'inverse augmente l'UFC, confirmant le rôle pivot de HVEM dans la transmission des signaux inhibiteurs de BTLA, mais induisant des signaux activant le réponse anti-infectieuse lors de son interaction avec LIGHT. Dans le cas de THEMIS, une mutation invalidante provoque une susceptibilité accrue au développement de la tuberculose, ces souris présentent des UFC plus élevées que chez les souris exprimant une protéine THEMIS fonctionnelle dans de nombreux organes comme la rate, les poumons, et le foie ²⁷⁴. Ainsi BTLA est décrit comme très impliqué dans le processus de réponse antitumorale, et réponse anti-infectieuse. Nous supposons donc que l'action régulatrice que THEMIS exerce sur BTLA pourrait être impliquée dans d'autres processus immunitaires que ceux décrit dans notre étude. Ainsi cette diminution d'activité cytotoxique des lymphocytes T contre les tumeurs et l'augmentation de la susceptibilité au développement de la tuberculose, observées en absence d'une forme fonctionnelle de THEMIS pourrait être due à une activité inhibitrice accrue de BTLA.

Des effets inverses peuvent être constatés dans un contexte de développement de maladies auto-immunes. En effet l'absence de BTLA provoque une susceptibilité plus forte au développement de l'EAE, dévoilant le rôle physiologique protecteur de BTLA contre le

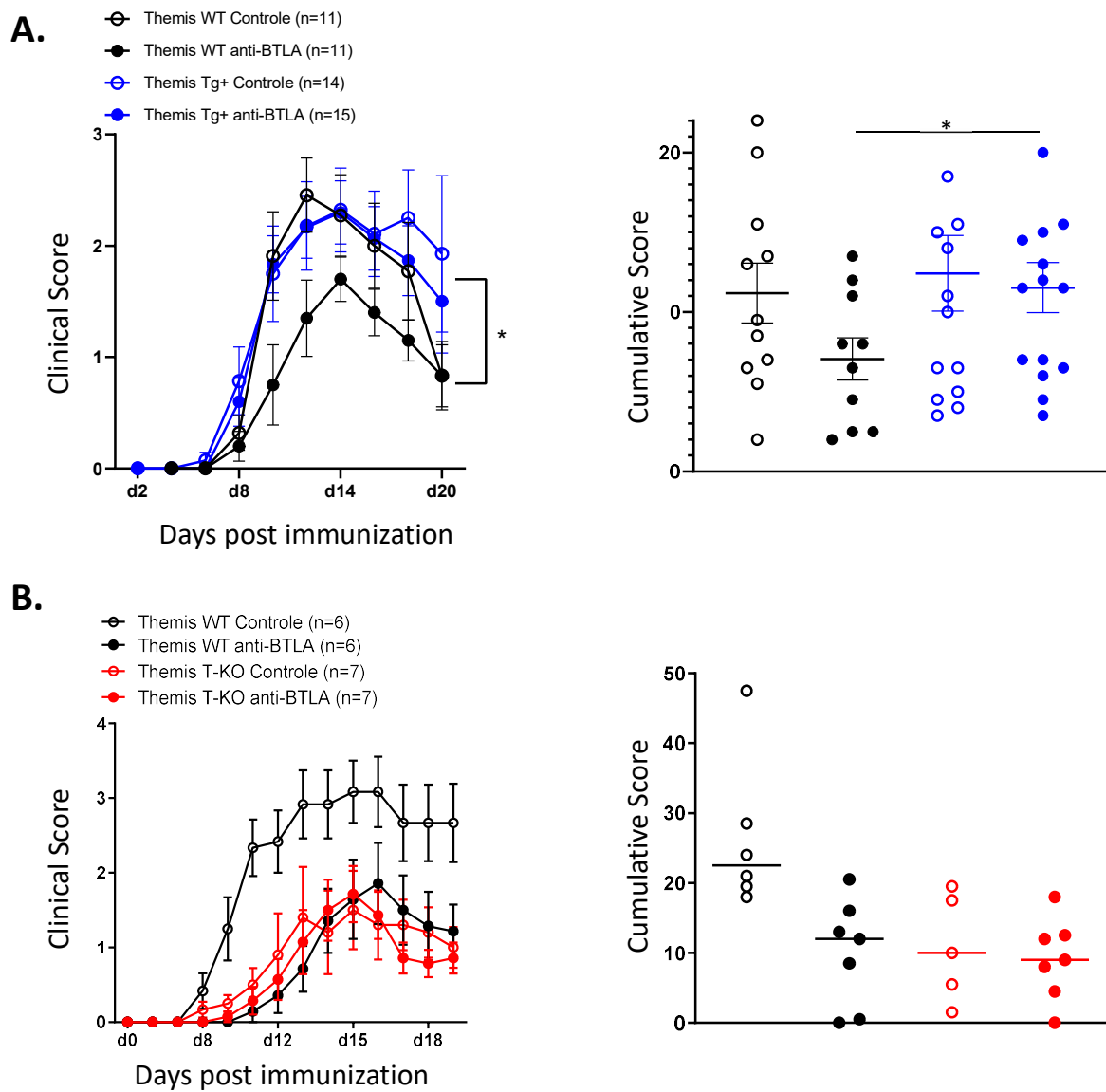


Figure 13. Effets de THEMIS sur BTLA dans un contexte d'EAE chez la souris. Des souris sauvages ou surexprimant THEMIS (A.), ou sauvage ou déficientes pour THEMIS (B.) ont été immunisées par injection de 100µg de peptide MOG₃₅₋₅₅ en présence d'adjuvant CFA, et injectées avec 200 ng de toxine pertussique. Les souris ont également été injectées avec du PBS (point vides) ou un anticorps agonist anti-BTLA (points remplis) à J0, tous les deux jours jusqu'à J14. À gauche, le score clinique d'EAE. À droite, le score cumulatif de chaque souris sur la durée de l'expérience. (A.) Les scores statistiques ont été réalisés par test ANOVA (à gauche), et Mann-Whitney t test (à droite). *P < 0.05.

développement de pathologie auto-immune Un rôle de BTLA dans les Tregs a été proposé, avec une perte de fonction effectrice dans les Tregs des souris déficientes pour BTLA, incluant la production de cytokine anti-inflammatoire comme l'IL-10²⁷⁵. Ceci concorde avec l'expression de BTLA associée à une atténuation de la susceptibilité au développement de maladies auto-immunes. Des souris déficientes pour BTLA sur le fond 129/sv développent spontanément une maladie auto-immune associée à une hépatite, avec une augmentation de production de cytokines inflammatoires et de l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD25 sur les splénocytes. Ceci est associé à un dysfonctionnement du foie, et une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ activés infiltrant le site inflammatoire. Une autre étude montre que l'expression de BTLA est augmentée dans les LT CD4⁺ infiltrant le foie chez des patients atteints d'hépatite B ACLF (Acute on-Chronic Liver Failure)^{208,276}. Cette augmentation de l'infiltration cellulaire pose la question de savoir si BTLA a également la capacité d'inhiber les LT activés à migrer vers les sites inflammatoires dans le contexte des maladies auto-immunes. BTLA inhibe les fonctions effectrices et induit un état épuisé des LT CD4⁺ dans ce contexte d'inflammation chronique, limitant leur production de cytokines inflammatoires IFN γ , IL-2 et TNF α , et réprimant l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD69.

La déficience en THEMIS dans les lymphocytes T périphériques diminue la susceptibilité au développement de l'EAE chez la souris. L'absence de THEMIS diminue la pathogénicité des lymphocytes CD4⁺ spécifique de l'antigène mais diminue également la capacité des cellules à migrer dans le cerveau. Nous supposons que la diminution de la pathogénicité des lymphocytes T CD4⁺ et de leur capacité à infiltrer le cerveau pourrait être due à l'activité inhibitrice exacerbée de BTLA en absence de THEMIS. Pour étudier l'interaction de THEMIS et BTLA dans l'EAE, nous avons utilisé l'anticorps agoniste de BTLA, également utilisé lors de nos expériences de stimulation cellulaire *in vitro*. L'engagement de BTLA a eu pour effet de diminuer le score clinique, le score maximum atteint par groupe, ainsi que l'incidence de développement de la maladie. À l'instar des réponses cellulaires *in vitro*, l'utilisation de cet anticorps chez des souris transgéniques surexprimant THEMIS n'as pas diminué les symptômes de la maladie, et les souris traitées avec l'anti-BTLA agoniste sont au même stade clinique que les souris transgéniques non traitées. (Figure 13A). Nous avons également utilisé des souris déficientes pour THEMIS dans les LT périphériques, afin d'établir si l'engagement de BTLA en absence de THEMIS aurait un effet plus drastique que chez les souris WT. Comme décrit précédemment, l'absence de THEMIS provoque une diminution de symptômes

importante comparé aux souris WT. Dans ce contexte, l'engagement de BTLA dans les souris WT a de nouveau restreint le développement de l'EAE. Cependant en absence de THEMIS, l'engagement de BTLA n'a pas d'effet. Nous supposons que l'absence de THEMIS induit déjà une forte activité inhibitrice de BTLA, provoquant cette diminution de symptômes, et que l'engagement supplémentaire de BTLA par un anticorps agoniste ne stimule pas davantage la signalisation inhibitrice de BTLA qui est peut-être déjà à son « maximum » (Figure 13B). Ces expériences demandent des études supplémentaires afin de déterminer l'action de l'anti-BTLA agoniste, et les effets à l'échelle cellulaire de l'interaction de THEMIS et BTLA dans un contexte d'auto-immunité.

B. Au-delà de BTLA : réguler les récepteurs inhibiteurs

Notre travail a permis de dévoiler un mécanisme moléculaire d'inhibition de checkpoint immunitaire contribuant à réguler le développement des lymphocytes T et leur maintenance. Ce mécanisme s'inscrit dans la lignée de plusieurs autres travaux dévoilant eux aussi des mécanismes de contrôle limitant les capacités inhibitrices des checkpoints immunitaires. La protéine SAP (SH2D1A) par exemple est décrite comme un régulateur de l'activité inhibitrice de PD-1. Dans un contexte d'arthrite rhumatoïde, l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T est augmentée en comparaison des patients sains. Il en est de même pour SAP, dont l'expression est particulièrement associée aux formes les plus sévères de la maladie. SAP se lie à CD28 sur sa tyrosine Y₁₇₃, qui est une des cibles préférentielles des signaux inhibiteurs de PD-1²⁷⁷. SAP est cependant aussi décrit comme indirectement associé à PD-1, via sa phosphatase SHP-2. Dans les cellules Jurkat, SAP est capable d'inhiber l'activité phosphatase de SHP-2, et la stimulation des cellules par PD-L2, ligand de PD-1 induit une inhibition accrue de la production d'IL-2 et de la prolifération en absence de SAP. De plus, l'induction d'une forte expression de SAP par transfection plasmidique réduit l'inhibition provoquée par PD-1 de l'expression de CD69, et la production d'IL-2 et d'IFN γ ²⁷⁸.

Un autre exemple décrit la restriction des signaux inhibiteurs de TIM-3 par la protéine Bat3. La signalisation de TIM-3 est induite par son interaction avec la galectine 9 qui induit la liaison de Bat3 à la queue cytoplasmique de TIM-3. L'expression ectopique de Bat3 dans des cellules

Th1 entraîne une diminution de la mort cellulaire normalement induite après engagement de TIM-3 par la galectine 9. En outre, lors d'expériences d'EAE avec transfert cellulaire de LT CD4⁺ 2D2 dans des souris RAG^{-/-}, les souris injectées avec des cellules Bat3⁺ présentent un score clinique plus élevé, ainsi qu'une production plus forte de cytokines pro-inflammatoires IL-2 et IFN γ . À l'inverse, les souris injectées avec des cellules Bat3⁻ développent un phénotype mémoire, ou un phénotype épuisé, avec une augmentation de l'expression de marqueurs d'épuisement comme le récepteur inhibiteur LAG-3, ou BLIMP1, suggérant que l'activité inhibitrice de Tim-3 est exacerbée en absence de Bat-3^{279 279}. Confirmant cette hypothèse l'effet anti-inflammatoire de la déficience en Bat3 observée dans l'EAE est abolie lorsque les souris Bat3^{-/-} sont aussi déficientes en Tim-3²⁸⁰.

Ainsi, SAP et Bat3 semblent jouer un rôle similaire à celui joué par THEMIS dans le contexte de BTLA. Toutes sont des protéines intracellulaires se liant à la région cytoplasmique de récepteurs inhibiteurs à l'issue de leur engagement, pour réprimer leurs signaux inhibiteurs et stimuler les signaux d'activation cellulaire. SAP et Bat3 fonctionnent cependant différemment de THEMIS et ne ciblent pas les mêmes protéines associées à leur récepteur. Ceci pose la question de savoir si chaque checkpoint immunitaire est doté de son propre système de régulation moléculaire adapté à chaque spécificité de signalisation ou si une même protéine régulatrice peut réprimer plusieurs récepteurs inhibiteurs. THEMIS agit principalement sur l'activité phosphatase de SHP-1, et de manière moindre, sur celle de SHP-2. D'après nos résultats, l'action de THEMIS sur SHP-2 est insuffisante pour influencer sur les signaux inhibiteurs de PD-1 dans le développement thymique et l'activation cellulaire *in vitro*. Il semble possible néanmoins que THEMIS puisse réguler les signaux d'autres récepteurs recrutant également la phosphatase SHP-1. Une étude récente montre par exemple que le récepteur CD27 est associé à SHP-1 ainsi qu'à la protéine TRAF2. L'engagement de CD27 par son ligand CD70 provoque son internalisation mais aussi le recrutement de SHP-1 pour former le complexe CD27-TRAF2-SHP-1. Ce complexe induit l'inhibition de la phosphorylation de Lck après son association à CD28 et une diminution de la phosphorylation de ERK. En absence de SHP-1, CD27 n'a plus la capacité d'inhiber la signalisation stimulatrice de CD28. Ce complexe induit également le développement d'un phénotype mémoire et épuisé comme dans le cas de TIM-3. Les auteurs de cette étude montrent que l'expression de THEMIS est partiellement diminuée après l'engagement de CD27²⁸¹. Il serait néanmoins intéressant d'analyser si la

signalisation de CD27 est modulée par THEMIS en utilisant les modèles de souris déficientes ou transgéniques utilisées dans mon travail de thèse. D'autres récepteurs tels que CEACAM1 et LAIR1 sont phosphorylés sur des motifs ITIM après stimulation et recrute SHP-1.

C. THEMIS-BTLA dans les lymphocytes B

BTLA n'est pas exclusivement exprimé dans les lymphocytes T. BTLA est aussi exprimé dans les cellules dendritiques, les NK, et surtout les lymphocytes B. BTLA agit aussi comme récepteur inhibiteur de l'activation des lymphocytes B en inhibant les signaux du BCR²⁵². L'expression de BTLA est régulée positivement au cours du développement des LB, bien que l'absence de BTLA n'induit pas de déficience dans le développement des lymphocytes B, à l'instar de son rôle dans le développement des lymphocytes T²⁸². Mais l'expression de BTLA étant beaucoup plus élevée dans les LB que dans les LT, la question se pose de savoir s'il possède un système de régulation intracellulaire similaire à celui observé dans les lymphocytes T. THEMIS1 est restreint aux lymphocytes T, mais une forme orthologue de THEMIS est exprimée dans les lymphocytes B, il s'agit de THEMIS2. THEMIS1 et THEMIS2 ont une structure et fonction similaire. En effet chez les souris déficientes pour THEMIS1, un transgène de THEMIS1, ou de THEMIS2 est capable de restaurer le défaut de sélection positive, incluant le nombre de cellules SP CD4⁺ et CD8⁺, et ce dans le thymus et en périphérie. THEMIS2 exerce donc les mêmes actions que THEMIS1 dans un contexte similaire. Les mêmes résultats sont obtenus chez des souris AND comportant un TCR reconnaissant le CMHII. Le nombre de CD4⁺ est restauré lorsque THEMIS2 est induit. Les deux protéines sont localisées à des endroits similaires de la cellule, dans le noyau, et dans le cytoplasme dans les thymocytes. Elles subissent une phosphorylation de leur tyrosine après engagement du TCR ou du BCR, et sont toutes deux recrutées par Grb2 à LAT. Ainsi le transgène de l'une ou l'autre dans les thymocytes THEMIS1^{-/-} restaure également des éléments de la signalisation TCR comme la phosphorylation de ERK, VAV1 et p38²⁸³. De telles similitudes impliquent la possibilité que THEMIS2 dans les lymphocytes B puisse occuper un rôle équivalent à celui de THEMIS1 dans les lymphocytes T, et réprime l'activité inhibitrice du BCR par BTLA.

D. THEMIS-BTLA chez l'Homme

Peu d'études portent sur le rôle de THEMIS chez l'Homme. Il est montré que THEMIS est bien phosphorylé après stimulation du TCR dans des cellules Jurkat, il est associé à Lck et LAT par l'intermédiaire de Grb2 et participe à la signalisation de SLP-76 dans ces cellules. Un shRNA de THEMIS ou de LAT ont le même effet de réduction de la production d'IL-2^{233,284}. THEMIS semble également promouvoir l'activité de ERK et de NFAT. Ainsi THEMIS paraît participer à la signalisation du TCR dans les cellules humaines d'une manière similaire aux cellules murines. D'un autre côté une étude présente le complexe SHP-1-THEMIS comme réprimant la signalisation activatrice du récepteur 4-1BB dans des lymphocytes T CAR (Chimeric Antigen Receptor). Il s'agit d'un modèle de cellules CAR ciblant la protéine membranaire CD19 exprimée sur de nombreuses cellules cancéreuses, et possédant une chaîne cytoplasmique appartenant au récepteur 4-1BB. Les auteurs associent l'expression du complexe SHP-1-THEMIS à une diminution de la phosphorylation de la tyrosine Y₁₄₂ du TCR CAR. Particulièrement, la phosphorylation du CAR augmente lors de l'utilisation d'un inhibiteur de phosphatase, ou d'un siRNA ciblant THEMIS. Il est cependant difficile de déterminer si THEMIS active ou réprime SHP-1 dans ce contexte, et si l'inhibition du signal du CAR observée n'est pas simplement due à l'action de SHP-1, indépendamment de THEMIS, le complexe THEMIS-SHP-1 n'étant pas associé à BTLA dans le contexte de l'étude²⁴³.

Dans un contexte clinique, il y a une caractérisation de THEMIS chez des patients atteints de maladie de Coélie, pathologie chronique inflammatoire de l'intestin. L'expression de THEMIS diminue chez les patients traités, pour atteindre un niveau similaire à celui des patients sains. THEMIS chez l'Homme serait donc également capable de promouvoir le développement de maladie auto-immune.

BTLA a été quant à lui caractérisé dans plusieurs contextes chez l'Homme. BTLA a été associé avec un pronostic défavorable et une réponse antitumorale réduite dans nombre de cancers, comme le cancer du poumon et le cancer de la vésicule biliaire²⁶⁸. BTLA réprime la réponse des LT CD8⁺ humains ciblant les antigènes tumoraux MiHA après greffe allogénique chez les patients. Le blocage de BTLA sur ces cellules augmente leur capacité à proliférer *ex vivo*, ainsi que leurs fonctions cytotoxiques comme la production de cytokines IFN γ et TNF α ²⁸⁵. Associé avec celui de PD-1 et TIM-3, le blocage de BTLA est aussi capable d'induire une augmentation de la prolifération et de la production de cytokines chez les lymphocytes T CD8⁺

spécifiques du peptide tumoral NY-ESO-1 ²⁸⁶. Chez les patients atteints d'une infection virale CMV, l'expression de BTLA augmente chez les LT CD8⁺ spécifiques du CMV juste après leur différenciation, et le blocage de BTLA induit également leur prolifération *in vitro* ²⁸⁷. Il serait intéressant de savoir si BTLA, dans ces contextes pathologiques, est régulé par THEMIS, et si le pronostic défavorable associé à l'expression de BTLA peut être corrélée à l'expression de THEMIS.

Conclusion et perspectives

Pour conclure, nos travaux ont montré que THEMIS est capable de réprimer la capacité de BTLA à inhiber l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ après leur stimulation *in vitro*. THEMIS a plus d'effet sur la signalisation inhibitrice de BTLA dans les LT CD8⁺ dans lesquels THEMIS est le plus exprimé, que les LT CD4⁺, suggérant que le niveau d'expression de THEMIS influe sur ces capacités à moduler les signaux inhibiteurs de BTLA. Il serait intéressant de comparer les niveaux d'expression de THEMIS et de BTLA dans d'autres sous populations effectrices et de les mettre en lien avec les capacités de THEMIS à bloquer BTLA.

Nous avons déterminé que THEMIS réprime les signaux inhibiteurs de BTLA dans le contexte du développement thymique, ce qui suggère que THEMIS favorise la sélection positive de thymocytes dont les signaux issus d'un TCR de faible affinité seraient autrement insuffisants pour leur survie. L'absence de BTLA dans les souris déficientes pour THEMIS rétablit la sélection positive, suggérant que le blocage de BTLA constitue le mécanisme d'action majoritaire de THEMIS dans le développement thymique. THEMIS stimule aussi la survie et la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ lors de stimulation à l'IL-2 et l'IL-15, indépendante du TCR. Dans ce contexte, l'absence de BTLA provoque une prolifération supérieure à celles des souris sauvages, suggérant que THEMIS ne réprime pas complètement les signaux inhibiteurs de BTLA dans les souris sauvages. Il serait intéressant d'utiliser des souris transgéniques pour déterminer si la surexpression de THEMIS est suffisante pour bloquer BTLA en stimulation dépendant de l'IL-2 et de l'IL-15, et si cette prolifération correspond à celle des souris BTLA^{KO}.

Nous n'avons pas observé d'effet de THEMIS sur les signaux inhibiteurs de PD-1 que ce soit dans un contexte d'activation des lymphocytes T *in vitro*, ou en utilisant des souris déficientes pour THEMIS et PD-1 dans le développement thymique. Les signaux inhibiteurs de PD-1 dépendant principalement de la phosphatase SHP-2, ces résultats concordent avec les études selon lesquelles THEMIS agit préférentiellement sur la phosphatase SHP-1. Il faudrait ainsi déterminer si THEMIS est également capable de bloquer d'autres récepteur co-inhibiteurs qui dépendent de SHP-1.

Ainsi cette étude caractérise un mécanisme de régulation modulant la signalisation inhibitrice de BTLA intracellulaire, agissant en aval de l'engagement de BTLA par son ligand.

Portfolio

Articles publiés et en cours de publication durant la thèse

THEMIS promotes T-cell development and maintenance by rising the signaling threshold of the inhibitory receptor BTLA, PNAS, 2024

Suzanne Mélique, Aurélie Vadel, Nelly Rouquié, Cui Yang, Cyrielle Bories, Coline Cotineau, Abdelhadi Saoudi, Nicolas Fazilleau, Renaud Lesourne,

THEMIS enhances the magnitude of normal and neuroinflammatory type 1 immune responses by promoting TCR-independent signals, Science Signaling, 2022

Cui Yang, Gaëtan Blaize, Rémi Marrocco, Nelly Rouquié, Cyrielle Bories, Mylène Gador, **Suzanne Mélique**, Emeline Joulia, Mehdi Benama, Anne S. Dejean¹, Hélène Daniels-Treffandier, Paul E. Love, Nicolas Fazilleau, Abdelhadi Saoudi, Renaud Lesourne

A selective LIS1 requirement for mitotic spindle assembly discriminates distinct T-cell division mechanisms within the T-cell lineage, eLife, 2022

Jérémy Argenty, Nelly Rouquié, Cyrielle Bories, **Suzanne Mélique**, Valérie Duplan-Eche, Abdelhadi Saoudi, Nicolas Fazilleau, Renaud Lesourne

Negative times negative equals positive, THEMIS sets the rule on thymic selection and peripheral T cell responses, Biomedical Journal, 2022

Suzanne Mélique, Cui Yang, Renaud Lesourne

Congrès

2022 – **Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie** (Nice) : Présentation de poster

2023 – **Congrès IUIS** (International Union of Immunological Societies) : Présentation orale

Activités au sein d'INFINITY

Représentante du collège Doctorant/Post-doctorant au Conseil d'Unité du centre :
Participation aux réunions du conseil, lien entre les étudiants et la direction

Organisation de séminaire de prestige au centre INFINITY : Invitation de chercheurs internationaux, organisation du séminaire et lien avec les étudiants

Fondation du groupe InFUNity au sein du centre : Organisation d'activités et évènements extrascientifiques, cohésion des membres du centre

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury. Je remercie les Pr. Daniel Olive, Dr. Laurence Bataille et Dr. Remy Bosselut pour le temps que vous avez passé à relire et évaluer ce manuscrit. Je remercie le Pr. Ayyoub d'avoir accepté la présidence de ce jury.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers mon directeur de thèse, le Dr. Renaud Lesourne, pour son investissement et sa patience, tout au long de ces dernières années. Tu m'as accueillie dans une équipe formidable pour travailler sur un beau projet et j'ai énormément appris sous ta direction. J'ai beaucoup de chance d'avoir eu l'opportunité de faire partie de cette aventure avec toi.

Merci à Loïc, pour son éternelle bienveillance, et pour son optimisme inspirant. Merci à Pierre et Isabelle pour leurs conseils avisés qui ont été déterminants à l'avancée de ce projet

Je souhaite également adresser mes remerciements sincères à mes collègues de laboratoire pour leur collaboration précieuse, leurs discussions stimulantes et leur camaraderie. Leurs idées, leurs critiques constructives et leur esprit d'équipe ont enrichi mon expérience de recherche et ont contribué de manière significative à l'aboutissement de ce projet.

Merci à Nelly, la maman du labo, qui m'a beaucoup appris dès mon arrivée et qui est une personne lumineuse toujours prête à aider. Merci d'avoir été à l'écoute et de m'avoir longtemps fait profiter de tes conseils pro et perso.

Merci Hélène, pour ton énergie inépuisable. Tu as été une amie à qui parler et avec qui passer de super soirées. Merci de m'avoir invitée dans ton chez toi cosy à Cahors, ces moments forment des souvenirs inoubliables.

Pas merci à Mathieu :), d'avoir été un camarade avec qui échanger mes doutes et mes appréhensions, en plus de partager l'amour de la littérature de science-fiction. Je te souhaite le meilleur, que ce soit pour ta fin de thèse, ou ta petite famille.

Nicolas, qui vient de démarrer tout étant déjà là depuis toujours, merci d'être une personne compréhensive, à qui j'ai définitivement pu parler de tout. Prend bien soin de l'appartement quand je serai partie ;)

Je remercie Kilian, avec qui j'ai partagé le meilleur bureau, ainsi que les nombreuses péripéties de cette folle aventure improbable que fut le cas : aquarium. J'espère que ton futur sera plein de super labos, de musique et de films d'horreurs.

Merci à Julien, qui n'a pas tardé à se faire une place capitale dans l'équipe, et qui prend le relais sur BTLA. Merci de tes échanges, des rigolades, je n'ai aucun doute sur le fait que tu vas faire une super thèse. Je te souhaite un bel avenir plein de résultats cools, de foot et de poires.

Merci à Guilhèn, que j'ai vu arriver en stage et qui a bien grandi :) Bravo pour l'obtention de ta quatrième année, qui sera faite de réussite et de sport. Je remercie Beatriz, qui se lance maintenant sur les manip souris. Merci de m'avoir fait profiter de ton expérience de

vétéran de thèse, et d'avoir partagé avec moi des super soirées et sorties. Merci à vous deux d'avoir été les seuls à avoir réussi à me faire faire du sport (peu il est vrai) en plus de 5 ans.

Merci à Léa, de sa bonne humeur. Merci des petites pauses discussions dans le bureau, et des soirées détente après le boulot. Je te lègue solennellement mon bureau pour faire une super thèse. Merci à Clément des discussions anime et jeux vidéo et des petites sorties.

Je voudrais aussi remercier les stagiaires de l'équipe. C'était super de passer les derniers mois avec vous. Les repas de fin de journée ont égayé ces dernières semaines.

Merci Alexandre pour ton enthousiasme, je suis sûre que tu vas déchirer en thèse l'année prochaine. Merci à Laurine et Marielle pour les moments passés, je vous souhaite le meilleur.

Merci à ma marraine de thèse Anne Astier, pour son extrême gentillesse, et d'avoir été là pour me conseiller et m'aider à un moment pivot pour prendre des décisions capitales.

Je voudrais ensuite bien sûr remercier les anciens du labo. Merci à Claire, qui a été ma co-thésarde pendant longtemps et avec qui j'ai eu la chance de partager (presque) toutes les étapes de cette aventure. Tu as été également une amie sur qui compter, aussi bien pour les discussions sérieuses que pour les parties de jeux rétro et pour passer un fabuleux nouvel an. Je te souhaite le plus grand succès à tous les niveaux.

Merci à Aurélie, qui a été une participante centrale de ce projet, et sans laquelle il n'aurait pas pu aboutir. Tu as été une camarade de projet comme une amie avec qui rigoler. Merci à Jérémy, de m'avoir montré des tips de cytométrie, et de m'avoir fait visiter la Belgique !

I would like to thank Cui, you taught me everything about most of the experiments I did during this thesis. You were a terrific THEMIS older sister, as well as a terrific friend to chat with about everything.

Un immense merci aux plateformes techniques, la zootechnie qui a permis un long travail sur de nombreuses lignées de souris, et la plateforme de cytométrie pour leur aide précieuse, leur assistance technique et leur expertise qui ont facilité la réalisation des expériences cruciales pour ce travail. Merci à Fatima, Anne Laure, Hugo et Valérie pour leur contribution indispensable à la réussite de cette thèse, et leur gentillesse.

Merci aux membres du plateau d'imagerie, avec qui, bien que n'ayant fait absolument aucune expérience de microscopie, j'ai passé la plupart de mon temps libre.

Je remercie énormément Simon, sans qui les dernières années auraient sans doute été plus ternes. Merci pour les innombrables sorties ciné, les concerts et les voyages aux quatre coins de la Belgique, d'avoir fait les 400 coups avec moi pendant plus de 4 ans maintenant. Merci d'avoir été un ami et confident précieux.

Un grand merci à Lhorane, d'avoir été une amie non moins précieuse. Merci pour les salons de thé, les soirées, les séjours jeux de société. Merci d'avoir été à l'écoute autant pour mes doutes que pour partager un verre de rhum :) Bon courage dans ton parcours et ta transformation en vraie adulte.

Merci à Sophie de sa bienveillance et de ses conseils pour m'avoir aidée et soutenue en période difficile.

Merci à Charlène, d'avoir partagé l'aventure InFUNity, et un super festival. Je te souhaite toute la réussite pour la fin de ta thèse et pour la suite.

Enfin, je suis profondément reconnaissante envers ma famille pour leur soutien inconditionnel, leur amour et leur encouragement tout au long de ce parcours. Leur présence et leur compréhension ont été mes sources d'inspiration et de réconfort, et je suis infiniment chanceuse d'avoir les meilleurs parents et les meilleurs frères.

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, je vous adresse mes plus sincères remerciements.

Bibliographie

1. Mariuzza RA, Agnihotri P, Orban J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *J Biol Chem*. 2020;295(4):914-925. doi:10.1016/S0021-9258(17)49904-2
2. Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(12):883-894. doi:10.1038/nri1977
3. Yannoutsos N, Wilson P, Yu W, et al. The role of recombination activating gene (RAG) reinduction in thymocyte development in vivo. *J Exp Med*. 2001;194(4):471-480. doi:10.1084/jem.194.4.471
4. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The Mechanism and Regulation of Chromosomal V (D) J Recombination. *Cell Press*. 2002;109(D):45-55.
5. Marie-Paule Lefranc*, Véronique Giudicelli, Chantal Ginestoux, Julia Bodmer¹, Werner Müller², Ronald Bontrop³, Marc Lemaitre⁴, Ansar Malik⁵ VB and DC. The international imMunoGeneTics database IMGT. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(1):1. doi:10.1016/S0145-305X(02)00094-0
6. Pannetier C, Cochet M, Darche S, Casrouge A, Zöller M, Kourilsky P. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor β chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(9):4319-4323. doi:10.1073/pnas.90.9.4319
7. Cabaniols JP, Fazilleau N, Casrouge A, Kourilsky P, Kanellopoulos JM. Most α/β T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Exp Med*. 2001;194(9):1385-1390. doi:10.1084/jem.194.9.1385
8. Mostoslavsky R, Alt FW, Rajewsky K. The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell*. 2004;118(5):539-544. doi:10.1016/j.cell.2004.08.023
9. Narin Osman, Helen Turner, Susan Lucas KR and DAC. The protein interactions of the immunoglobulin present in the T cell receptor t, subunits and the receptor family tyrosine-based activation motifs CD3 γ , δ and E chains. *Eur J Immunol*. Published online 1996:1063-1068.
10. DeFord-Watts LM, Tassin TC, Becker AM, et al. The Cytoplasmic Tail of the T Cell Receptor CD3 ϵ Subunit Contains a Phospholipid-Binding Motif that Regulates T Cell

- Functions. *J Immunol.* 2009;183(2):1055-1064. doi:10.4049/jimmunol.0900404
11. DeFord-Watts LM, Dougall DS, Belkaya S, et al. The CD3 ζ Subunit Contains a Phosphoinositide-Binding Motif That Is Required for the Stable Accumulation of TCR-CD3 Complex at the Immunological Synapse. *J Immunol.* 2011;186(12):6839-6847. doi:10.4049/jimmunol.1002721
 12. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):377-391. doi:10.1038/nri3667
 13. Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:571-606. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115601
 14. Bettini ML, Chou P, Guy CS, Lee T, Vignali KM, Vignali DAA. Cutting Edge: CD3 ITAM Diversity Is Required for Optimal TCR Signaling and Thymocyte Development. *J Immunol.* Published online 2017. doi:10.4049/jimmunol.1700069
 15. Ashouri JF, Weiss A. Endogenous Nur77 Is a Specific Indicator of Antigen Receptor Signaling in Human T and B Cells. *J Immunol.* 2017;198(2):657-668. doi:10.4049/jimmunol.1601301
 16. Shores EW, Tran T, Grinberg A, Sommers CL, Shen H, Love PE. Role of the multiple T cell receptor (tCR)- ζ chain signaling motifs in selection of the t cell repertoire. *J Exp Med.* 1997;185(5):893-900. doi:10.1084/jem.185.5.893
 17. Ardouin L, Boyer C, Gillet A, et al. Crippling of CD3- zeta ITAMs Does Not Impair T Cell Receptor Signaling. *Immunity.* 1999;10:409-420.
 18. Matthew L. Bettini*,1, Clifford Guy*, Pradyot Dash*, Kate M. Vignali*,3, David E. Hamm†, Jessica Dobbins‡, Etienne Gagnon‡,2, Paul G. Thomas*, Kai W. Wucherpfennig‡ and D, Vignali AA. Membrane association of the CD3 ϵ signaling domain is required for optimal T cell development and function. *J Immunol.* 2014;23(1):1-7. doi:10.4049/jimmunol.1400322.Membrane
 19. Dave VP, Cao Z, Browne C, et al. CD3 δ deficiency arrests development of the $\alpha\beta$ but not the $\gamma\delta$ T cell lineage. *EMBO J.* 1997;16(6):1360-1370. doi:10.1093/emboj/16.6.1360
 20. Gokturk B, Keles S, Kirac M, et al. CD3G gene defects in familial autoimmune thyroiditis. *Scand J Immunol.* 2014;80(5):354-361. doi:10.1111/sji.12200
 21. Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, et al. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-

- Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell*. 2015;163(4):975-987.
doi:10.1016/j.cell.2015.10.013
22. Nakagawa Y, Ohigashi I, Nitta T, et al. Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary T cell receptor α rearrangement in cortical thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(50):20572-20577. doi:10.1073/pnas.1213069109
 23. Florea BI, Verdoes M, Li N, et al. Activity-based profiling reveals reactivity of the murine thymoproteasome-specific subunit β 5t. *Chem Biol*. 2010;17(8):795-801. doi:10.1016/j.chembiol.2010.05.027
 24. Blaize G, Daniels-Treffandier H, Aloulou M, et al. CD5 signalosome coordinates antagonist TCR signals to control the generation of Treg cells induced by foreign antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(23):12969-12979. doi:10.1073/pnas.1917182117
 25. Azzam BHS, Grinberg A, Lui K, Shen H, Shores EW, Love PE. CD5 Expression Is Developmentally Regulated By T Cell Receptor (TCR) Signals and TCR Avidity. *J Exp Med*. 1998;188(12).
 26. Xing Y, Jameson SC, Hogquist KA. Thymoproteasome subunit- β 5T generates peptide-MHC complexes specialized for positive selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(17):6979-6984. doi:10.1073/pnas.1222244110
 27. Nakagawa T, Roth W, Wong P, et al. Cathepsin L: Critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science (80-)*. 1998;280(5362):450-453. doi:10.1126/science.280.5362.450
 28. Germain RN. t-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):309-322. doi:10.1038/nri798
 29. Anderson SJ, Levin SD, Perlmutter RM. Involvement of the protein tyrosine kinase p56lck in T cell signaling and thymocyte development. *Adv Immunol*. 1994;56:151-178. doi:10.1016/s0065-2776(08)60451-4
 30. Kuo CT, Leiden JM. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:149-187. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.149
 31. Chan SH, Cosgrove D, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell*. 1993;73(2):225-236. doi:10.1016/0092-8674(93)90225-F

32. Singer A, Adoro S, Park JH. Lineage fate and intense debate: Myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):788-801. doi:10.1038/nri2416
33. Brugnera E, Bhandoola A, Cibotti R, et al. Pillars Article: Coreceptor Reversal in the Thymus: Signaled CD4+8+ Thymocytes Initially Terminate CD8 Transcription Even When Differentiating into CD8+ T Cells. *Immunity*. 2000. 13: 59-71. *Immunity*. 2000;196(5):1985-1997. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26896482>
34. Suzuki H, Punt JA, Granger LG, Singer A. Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: A new perspective on thymic commitment and selection. *Immunity*. 1995;2(4):413-425. doi:10.1016/1074-7613(95)90149-3
35. Thomas Barthlott', Hubertus Kohler' HP and KE. Differentiation of CD4⁺CD8^{low} coreceptor- skewed thymocytes into mature CD8 single- positive cells independent of MHC class I recognition. *Eur J Immunol*. Published online 1997:1-12. doi:10.51202/9783186272089-1
36. Watanabe N, Arase H, Onodera M, Ohashi PS, Saito T. The Quantity of TCR Signal Determines Positive Selection and Lineage Commitment of T Cells. *J Immunol*. 2000;165(11):6252-6261. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6252
37. James W, Elston D TJ et al. Regulation of T Cell Receptor Expression in Immature CD4+CD8 + Thymocytes by p56 Lck Tyrosine Kinase: Basis for Differential Signaling by CD4 and CD8 in Immature Thymocytes Expressing Both Coreceptor Molecules. *J Exp Med*. 1993;178(November).
38. Basson MA, Bommhardt U, Cole MS, Tso JY, Zamoyska R. Cd3 ligation on immature thymocytes generates antagonist-like signals appropriate for CD8 lineage commitment, independently of T cell receptor specificity. *J Exp Med*. 1998;187(8):1249-1260. doi:10.1084/jem.187.8.1249
39. Sharp LL, Schwarz DA, Bott CM, Marshall CJ, Hedrick SM. The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity*. 1997;7(5):609-618. doi:10.1016/S1074-7613(00)80382-9
40. Chiang GG, Sefton BM. Specific Dephosphorylation of the Lck Tyrosine Protein Kinase at Tyr-394 by the SHP-1 Protein-tyrosine Phosphatase. *J Biol Chem*. 2001;276(25):23173-23178. doi:10.1074/jbc.M101219200

41. Yu Q, Erman B, Bhandoola A, Sharrow SO, Singer A. In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8⁺ T cells. *J Exp Med*. 2003;197(4):475-487. doi:10.1084/jem.20021765
42. Taniuchi I, Osato M, Egawa T, et al. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*. 2002;111(5):621-633. doi:10.1016/S0092-8674(02)01111-X
43. Woolf E, Xiao C, Fainaru O, et al. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(13):7731-7736. doi:10.1073/pnas.1232420100
44. Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):362-371. doi:10.1038/nri2297
45. Gray DHD, Seach N, Ueno T, et al. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood*. 2006;108(12):3777-3785. doi:10.1182/blood-2006-02-004531
46. Turner M, Mee PJ, Walters AE, et al. A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity*. 1997;7(4):451-460. doi:10.1016/S1074-7613(00)80367-2
47. DeVoss J, Hou Y, Johannes K, et al. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J Exp Med*. 2006;203(12):2727-2735. doi:10.1084/jem.20061864
48. Philip Brennecke^{1,2,5}, Alejandro Reyes^{3,5}, Sheena Pinto^{4,5}, Kristin Rattay^{4,5}, Michelle Nguyen^{1,2}, Rita Kuchler⁴, Wolfgang Huber^{3,6}, Bruno Kyewski^{4,6}, and Lars M. Steinmetz Strand Break Repair Leads to Ovarian Aging in Mice and Humans, 2013, *Sci Transl Me* 5(172):1-25. Single-cell transcriptome analysis reveals coordinated ectopic gene expression patterns in medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*. 2016;176(1):139-148. doi:10.1038/ni.3246.Single-cell
49. Laan M, Kisand K, Kont V, et al. Autoimmune Regulator Deficiency Results in Decreased Expression of CCR4 and CCR7 Ligands and in Delayed Migration of CD4⁺ Thymocytes. *J Immunol*. 2009;183(12):7682-7691. doi:10.4049/jimmunol.0804133
50. Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, et al. The Tumor Necrosis Factor Family Receptors RANK and CD40 Cooperatively Establish the Thymic Medullary Microenvironment and Self-

- Tolerance. *Immunity*. 2008;29(3):423-437. doi:10.1016/j.immuni.2008.06.015
51. Natalie Seach*, 2, Tomoo Ueno*, 2, Anne L. Fletcher*, Tamara Lowen*, Monika Mattesich†, 3, Christian R. Engwerda§, Hamish S. Scott‡, 4, Carl F. Ware¶, Ann P. Chidgey* DHD, Gray||, 5, and Richard L. Boyd* 6. The Lymphotoxin Pathway Regulates Aire-Independent Expression of Ectopic Genes and Chemokines in Thymic Stromal Cells. *J Immunol*. 2008;23(1):1-7.
 52. Danzl NM, Donlin LT, Alexandropoulos K. Regulation of medullary thymic epithelial cell differentiation and function by the signaling protein Sin. *J Exp Med*. 2010;207(5):999-1013. doi:10.1084/jem.20092384
 53. Stritesky GL, Xing Y, Erickson JR, et al. Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(12):4679-4684. doi:10.1073/pnas.1217532110
 54. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Review Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. Published online 2008:775-787. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009
 55. Eyerich S, Zielinski CE. Defining Th-cell subsets in a classical and tissue-specific manner: Examples from the skin. *Eur J Immunol*. 2014;44(12):3475-3483. doi:10.1002/eji.201444891
 56. Malik S, Awasthi A. Transcriptional control of Th9 cells: Role of Foxo1 in interleukin-9 induction. *Front Immunol*. 2018;9(MAY):1-11. doi:10.3389/fimmu.2018.00995
 57. Golnaz Vahedi¹, Hayato Takahashi¹, Shingo Nakayamada¹, Hong-wei Sun², Vittorio Sartorelli³, Yuka Kanno^{1,*},[^] and JJO. STATs Shape the Active Enhancer Landscape of T Cell Populations. *Cell*. 2012;23(4):1-7. doi:10.1016/j.cell.2012.09.044.STATs
 58. Noster R, Riedel R, Mashreghi MF, et al. IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci Transl Med*. 2014;6(241). doi:10.1126/scitranslmed.3008706
 59. Homey B, Alenius H, M Uuml Ller A, et al. CCL27|[ndash]|CCR10 interactions regulate T cell|[ndash]|mediated skin inflammation. *Nat Med*. 2002;8(2):157. <http://www.jci.org/articles/view/40926#B8%5Cnpapers3://publication/doi/doi:10.1038/nm0202-157>
 60. Davila ML, Xu M, Huang C, et al. CCL27 is a crucial regulator of immune homeostasis of the skin and mucosal tissues. *iScience*. 2022;25(6):104426. doi:10.1016/j.isci.2022.104426

61. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(2):233-240. doi:10.1084/jem.20041257
62. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KHG, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2006;203(7):1685-1691. doi:10.1084/jem.20060285
63. Poholek CH, Raphael I, Wu D, et al. Noncanonical STAT3 activity sustains pathogenic Th17 proliferation and cytokine response to antigen. *J Exp Med*. 2020;217(10). doi:10.1084/JEM.20191761
64. Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes. *J Immunol*. 2009;183(11):7169-7177. doi:10.4049/jimmunol.0901906
65. Wang Z, Hong J, Sun W, et al. Role of IFN- γ in induction of Foxp3 and conversion of CD4⁺CD25⁻ T cells to CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2434-2441. doi:10.1172/JCI25826
66. Nakayama T, Hirahara K, Onodera A, et al. Th2 cells in health and disease. *Annu Rev Immunol*. 2017;35:53-84. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052350
67. Zielinski CE. T helper cell subsets: diversification of the field. *Eur J Immunol*. Published online 2023:1-12. doi:10.1002/eji.202250218
68. Canaria DA, Yan B, Clare MG, et al. STAT5 Represses a STAT3-Independent Th17-like Program during Th9 Cell Differentiation. *J Immunol*. 2021;207(5):1265-1274. doi:10.4049/jimmunol.2100165
69. Ruterbusch M, Pruner KB, Shehata L, Pepper M. In Vivo CD4⁺ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:705-725. doi:10.1146/annurev-immunol-103019-085803
70. Yosuke Kumamoto¹, Melissa Linehan¹, Jason S. Weinstein¹, Brian J. Laidlaw¹, Joseph E. Craft^{1, 2} and Al. CD301b⁺ dermal dendritic cells drive T helper-2 cell mediated immunity. *Immunity*. 2013;39(4). doi:10.1016/j.immuni.2013.08.029.CD301b
71. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, et al. Transforming growth factor- β “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1341-1346. doi:10.1038/ni.1659
72. Upadhyaya B, Yin Y, Hill BJ, Douek DC, Prussin C. Hierarchical IL-5 Expression Defines a

- Subpopulation of Highly Differentiated Human Th2 Cells. *J Immunol*. 2011;187(6):3111-3120. doi:10.4049/jimmunol.1101283
73. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*. 2009;30(5):646-655. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.001
 74. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (80-)*. 2003;198(3):981-985. doi:10.1126/science.1079490
 75. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003;198(3):993-998. doi:10.1038/ni909
 76. Liu X, Zhang W, Han Y, et al. FOXP3 + regulatory T cell perturbation mediated by the IFN γ -STAT1-IFITM3 feedback loop is essential for anti-tumor immunity. *Nat Commun*. Published online 2023. doi:10.1038/s41467-023-44391-9
 77. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*. 2019;50(5):1132-1148. doi:10.1016/j.immuni.2019.04.011
 78. Locci M, Wu J, Arumemi F, et al. Activin A programs human TFH cell differentiation. *Nat Immunol*. 2017;17(8):976-984. doi:10.1038/ni.3494.Activin
 79. Zhang N, Bevan MJ. Review CD8 + T Cells : Foot Soldiers of the Immune System. *Immun Rev*. 2020;(January). doi:10.1016/j.immuni.2011.07.010
 80. Koh C, Lee S, Kwak M, Kim B, Chung Y. CD8 T-cell subsets : heterogeneity , functions , and therapeutic potential. *Exp Mol Med*. 2023;(November). doi:10.1038/s12276-023-01105-x
 81. Künzli M, Masopust D. CD4+ T cell memory. *Nat Immunol*. 2023;24(6):903-914. doi:10.1038/s41590-023-01510-4
 82. Henrickson SE, Perro M, Loughhead SM, et al. Antigen availability determines CD8+ T cell-dendritic cell interaction kinetics and memory fate decisions. *Immunity*. 2014;39(3):496-507. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.034.Antigen
 83. Zehn D, Lee SY, Bevan MJ. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature*. 2009;458(7235):211-214. doi:10.1038/nature07657
 84. Ratajczak W, Niedźwiedzka-Rystwej P, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Immunological memory cells. *Cent Eur J Immunol*. 2018;43(2):194-203. doi:10.5114/ceji.2018.77390
 85. Gerlach C, Moseman EA, Loughhead SM, et al. The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune

- Surveillance and Homeostasis. *Immunity*. 2016;45(6):1270-1284.
doi:10.1016/j.immuni.2016.10.018
86. Drouillard A, Neyra A, Mathieu A-L, et al. Human Naive and Memory T Cells Display Opposite Migratory Responses to Sphingosine-1 Phosphate. *J Immunol*. 2018;200(2):551-557. doi:10.4049/jimmunol.1701278
 87. Shioh LR, Rosen DB, Brdičková N, et al. CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P 1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*. 2006;440(7083):540-544. doi:10.1038/nature04606
 88. Kieper WC, Tan JT, Bondi-boyd B, et al. Overexpression of Interleukin (IL) -7 Leads to IL-15 – independent Generation of Memory Phenotype. *J Exp Med*. 2002;195(12). doi:10.1084/jem.20020067
 89. Jameson SC, Masopust D. Understanding subset diversity in T cell memory. *Immunity*. 2018;176(5):139-148. doi:10.1016/j.immuni.2018.02.010.Understanding
 90. Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, et al. Distribution and Compartmentalization of Human Circulating and Tissue-Resident Memory T Cell Subsets. *Immunity*. 2013;38(1):187-197. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.020
 91. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity*. 2008;29(6):848-862. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.002
 92. Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8):547-556. doi:10.1038/nri853
 93. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naïve T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(15):8732-8737. doi:10.1073/pnas.161126098
 94. Knop L, Deiser K, Bank U, et al. IL-7 derived from lymph node fibroblastic reticular cells is dispensable for naive T cell homeostasis but crucial for central memory T cell survival. *Eur J Immunol*. 2020;50(6):846-857. doi:10.1002/eji.201948368
 95. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol*. 2000;1(5):426-432. doi:10.1038/80868
 96. Nanjappa SG, Walent JH, Morre M, Suresh M. Effects of IL-7 on memory CD8+ T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(3):1027-1039. doi:10.1172/JCI32020

97. Goldrath AW, Sivakumar P V, Glaccum M, et al. Cytokine Requirements for Acute and Basal Homeostatic Proliferation of Naive and Memory CD8 α T Cells. *J Exp Med*. 2002;195(12). doi:10.1084/jem.20020033
98. Motoko Y. Kimura, Leonid A. Pobezinsky, Terry Guinter, Julien Thomas, Anthony Adams, Jung-Hyun Park, Xuguang Tai and AS. IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8 T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nat Immunol*. 2013;176(1):139-148. doi:10.1038/ni.2494.IL-7
99. Cho JH, Boyman O, Kim HO, et al. An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2. *J Exp Med*. 2007;204(8):1787-1801. doi:10.1084/jem.20070740
100. Becker TC, John Wherry E, Boone D, et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med*. 2002;195(12):1541-1548. doi:10.1084/jem.20020369
101. Prlic M, Blazar BR, Khoruts A, Zell T, Jameson SC. Homeostatic Expansion Occurs Independently of Costimulatory Signals 1 \square . *J Immunol*. Published online 2001.
102. Al G. . . et. A Closer Look at Homeostatic Proliferation of CD4 + T Cells: Costimulatory Requirements and Role in Memory Formation 1 \square . *J Immunol*. Published online 2001.
103. Tai T-S, Pai S-Y, Ho I-C. GATA-3 Regulates the Homeostasis and Activation of CD8+ T Cells. *J Immunol*. 2013;190(1):428-437. doi:10.4049/jimmunol.1201361
104. McNally A, Hill GR, Sparwasser T, Thomas R, Steptoe RJ. CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(18):7529-7534. doi:10.1073/pnas.1103782108
105. Li JC, Huston G, Swain SL. IL-7 Promotes the Transition of CD4 Effectors to Persistent Memory Cells. *J Exp Med*. 2003;198(12):1807-1815. doi:10.1084/jem.20030725
106. Jaleco S, Swainson L, Dardalhon V, Burjanadze M, Kinet S, Taylor N. Homeostasis of Naive and Memory CD4+ T Cells: IL-2 and IL-7 Differentially Regulate the Balance Between Proliferation and Fas-Mediated Apoptosis. *J Immunol*. 2003;171(1):61-68. doi:10.4049/jimmunol.171.1.61
107. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*. 1998;9(5):669-676. doi:10.1016/S1074-7613(00)80664-0
108. Judge AD, Zhang X, Fujii H, Surh CD, Sprent J. Interleukin 15 controls both proliferation

- and survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2002;196(7):935-946. doi:10.1084/jem.20020772
109. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12(6):492-499. doi:10.1038/ni.2035
 110. Betts MR, Nason MC, West SM, Rosa SC De, Migueles SA, Abraham J. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8 + T cells. *Blood*. 2006;107(12):4781-4789. doi:10.1182/blood-2005-12-4818
 111. Roberto Tinoco¹, Victor Alcalde¹, Yating Yang², Karsten Sauer² and EIZ. TGF- β Signaling in T cells is Essential for CD8 T Cell Suppression and Viral Persistence In Vivo. *Immunity*. 2009;31(1):145-157. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.015.TGF-
 112. Jenkins E, Whitehead T, Fellermeier M, Davis SJ, Sharma S. The current state and future of T-cell exhaustion research. *Oxford Open Immunol*. 2023;4(1). doi:10.1093/oxfimm/iqad006
 113. Beltra J, Manne S, Abdel-hakeem MS. Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity*. 2020;52(5):825-841. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.014.Developmental
 114. Khan O, Giles JR, Mcdonald S, et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion Omar. *Nature*. 2019;571(7764):211-218. doi:10.1038/s41586-019-1325-x.TOX
 115. Odorizzi PM, Pauken KE, Paley MA, Sharpe A, Wherry EJ. Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8 + T cells. *J Exp Med*. 2015;212(7):1125-1137. doi:10.1084/jem.20142237
 116. Shah K, Al-Haidari A, Sun J, Kazi JU. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1). doi:10.1038/s41392-021-00823-w
 117. Littman AW and DR. Signal Transduction by Lymphocyte Antigen Receptors Review. *Cell*. 1994;63(1622):109-111. doi:10.1038/063109a0
 118. Shi X, Bi Y, Yang W, et al. Ca²⁺ regulates T-cell receptor activation by modulating the charge property of lipids. *Nature*. 2013;493(7430):111-115. doi:10.1038/nature11699
 119. Mckeithan TW. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(11):5042-5046. doi:10.1073/pnas.92.11.5042
 120. Stepanek O, Prabhakar AS, Osswald C, et al. Coreceptor scanning by the T cell receptor provides a mechanism for T cell tolerance. *Cell*. 2014;159(2):333-345.

doi:10.1016/j.cell.2014.08.042

121. S. V, S. M, M. C, E. P, A. L. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature*. 1995;375(May):148-151.
122. Aleksic M, Dushek O, Zhang H, et al. Dependence of T Cell Antigen Recognition on T Cell Receptor-Peptide MHC Confinement Time. *Immunity*. 2010;32(2):163-174. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.013
123. Pielak RM, O'Donoghue GP, Lin JJ, et al. Early T cell receptor signals globally modulate ligand: receptor affinities during antigen discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(46):12190-12195. doi:10.1073/pnas.1613140114
124. Jiang N, Huang J, Edwards LJ, et al. Two-Stage Cooperative T Cell Receptor-Peptide Major Histocompatibility Complex-CD8 Trimolecular Interactions Amplify Antigen Discrimination. *Immunity*. 2011;34(1):13-23. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.017
125. Mingueneau M, Sansoni A, Grégoire C, et al. The proline-rich sequence of CD3 ϵ controls T cell antigen receptor expression on and signaling potency in preselection CD4+CD8+ thymocytes. *Nat Immunol*. 2008;9(5):522-532. doi:10.1038/ni.1608
126. Liu SK, Fang N, Koretzky GA, Mcglade CJ. The hematopoietic-specific adaptor protein Gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol*. Published online 1998:67-75.
127. Bommhardt U, Schraven B, Simeoni L. Beyond TCR signaling: Emerging functions of Lck in cancer and immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(14):1-18. doi:10.3390/ijms20143500
128. McNeill L, Salmond RJ, Cooper JC, et al. The Differential Regulation of Lck Kinase Phosphorylation Sites by CD45 Is Critical for T Cell Receptor Signaling Responses. *Immunity*. 2007;27(3):425-437. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.015
129. Zikherman J, Jenne C, Watson S, et al. CD45-Csk Phosphatase-Kinase Titration Uncouples Basal and Inducible T Cell Receptor Signaling during Thymic Development. *Immunity*. 2010;32(3):342-354. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.006
130. Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*. 2004;23(48 REV. ISS. 7):7990-8000. doi:10.1038/sj.onc.1208074
131. Housden HR, Skipp PJS, Crump MP, et al. Investigation of the kinetics and order of tyrosine phosphorylation in the T-cell receptor ζ chain by the protein tyrosine kinase

- Lck. *Eur J Biochem.* 2003;270(11):2369-2376. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03604.x
132. Noah Isakov,*§ Ronald L. Wange,* Wilson H. Burgess, S Julian D. Watts, Il Ruedi Aebersold 71 and Lawrence E. Samelson. ZAP-70 Binding Specificity to T Cell Receptor Tyrosine-based Activation Motifs: The Tandem SH2 Domains of ZAP-70 Bind Distinct Tyrosine-based Activation Motifs with Varying Affinity. *J Exp Med.* 1995;182(November):20-22.
 133. Horkova V, Drobek A, Mueller D, et al. Dynamics of the Coreceptor-LCK Interactions during T Cell Development Shape the Self-Reactivity of Peripheral CD4 and CD8 T Cells. *Cell Rep.* 2020;30(5):1504-1514.e7. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.008
 134. Yan Q, Barros T, Visperas PR, et al. Structural Basis for Activation of ZAP-70 by Phosphorylation of the SH2-Kinase Linker. *Mol Cell Biol.* 2013;33(11):2188-2201. doi:10.1128/mcb.01637-12
 135. Di Bartolo V, Malissen M, Dufour E, Sechet E, Malissen B, Acuto O. Tyrosine 315 determines optimal recruitment of ZAP-70 to the T cell antigen receptor. *Eur J Immunol.* 2002;32(2):568-575. doi:10.1002/1521-4141(200202)32:2<568::AID-IMMU568>3.0.CO;2-Q
 136. Sjölin-Goodfellow H, Frushicheva MP, Ji Q, et al. The catalytic activity of the kinase ZAP-70 mediates basal signaling and negative feedback of the T cell receptor pathway. *Sci Signal.* 2015;8(377):ra49. doi:10.1126/scisignal.2005596
 137. Katz ZB, Novotná L, Blount A, Lillemeier BF. A cycle of Zap70 kinase activation and release from the TCR amplifies and disperses antigenic stimuli. *Nat Immunol.* 2017;18(1):86-95. doi:10.1038/ni.3631
 138. Zhang W, Tribble RP, Zhu M, Liu SK, McGlade CJ, Samelson LE. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C- γ 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues: Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J Biol Chem.* 2000;275(30):23355-23361. doi:10.1074/jbc.M000404200
 139. Xiaolei Su, 1, 2* Jonathon A. Ditlev, 1, 3* Enfu Hui, 1, 2 Wenmin Xing, 1, 3 Sudeep Banjade, 1, 3 Julia Okrut, 1, 2 David S. King, 4 Jack Taunton, 1, 2 Michael K. Rosen, 1 3† Ronald D. Vale. Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;352(6285):595-599.
 140. Raab M, Lu Y, Kohler K, Smith X, Strebhardt K, Rudd CE. LFA-1 activates focal adhesion kinases FAK1/PYK2 to generate LAT-GRB2-SKAP1 complexes that terminate T-cell

- conjugate formation. *Nat Commun.* 2017;8(May):1-15. doi:10.1038/ncomms16001
141. Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA. SLP76 and SLP65: Complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(1):67-78. doi:10.1038/nri1750
142. Yablonski D, Kuhne MR, Kadlecsek T, Weiss A. Uncoupling of Nonreceptor Tyrosine Kinases from PLC- γ 1 in an SLP-76 – Deficient T Cell. *Science (80-)*. 1998;281(July):413-416.
143. Reynolds LF, Smyth LA, Norton T, et al. Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C- γ 1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med.* 2002;195(9):1103-1114. doi:10.1084/jem.20011663
144. Kania E, Roest G, Vervliet T, Parys JB, Bultynck G. IP3 receptor-mediated calcium signaling and its role in autophagy in cancer. *Front Oncol.* 2017;7(JUL):1-15. doi:10.3389/fonc.2017.00140
145. M. Vig^{1,*}, C. Peinelt², A. Beck², D. L. Koomoa², D. Rabah¹, M. Koblan-Huberson¹, S. Kraft¹, H. Turner², A. Fleig², R. Penner^{2,*} and J-PK. CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store- Operated Ca²⁺ Entry. *Science (80-)*. 2006;176(5):139-148. doi:10.1126/science.1127883.CRACM1
146. Macian F. NFAT proteins: Key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(6):472-484. doi:10.1038/nri1632
147. Baer A, Colon-Moran W, Xiang J, Stapleton JT, Bhattarai N. Src-family kinases negatively regulate NFAT signaling in resting human T cells. *PLoS One.* 2017;12(10):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0187123
148. Savignac M, Mellström B, Naranjo JR. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2007;454(4):523-533. doi:10.1007/s00424-007-0238-y
149. Zhong XP, Guo R, Zhou H, Liu C, Wan CK. Diacylglycerol kinases in immune cell function and self-tolerance. *Immunol Rev.* 2008;224(1):249-264. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00647.x
150. Balachandra K Gorentla^{1,*} and Xiao-Ping Zhong^{2 3}. T cell Receptor Signal Transduction in T lymphocytes Balachandra. *J Clin cell Immunol.* 2012;23(1):1-7. doi:10.4172/2155-9899.S12-005.T

151. Sadeghi Shaker M, Rokni M, Mahmoudi M, Farhadi E. Ras family signaling pathway in immunopathogenesis of inflammatory rheumatic diseases. *Front Immunol.* 2023;14(May):1-11. doi:10.3389/fimmu.2023.1151246
152. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591-619. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132706
153. Kaminuma O, Deckert M, Elly C, Liu Y-C, Altman A. Vav-Rac1-Mediated Activation of the c-Jun N-Terminal Kinase/c-Jun/AP-1 Pathway Plays a Major Role in Stimulation of the Distal NFAT Site in the Interleukin-2 Gene Promoter. *Mol Cell Biol.* 2001;21(9):3126-3136. doi:10.1128/mcb.21.9.3126-3136.2001
154. Clifford S. Guy¹, Kate M. Vignali¹, Jamshid Temirov², Matthew Bettini¹, Abigail E. Overacre¹, Matthew Smeltzer³, Hui Zhang³, Johannes B. Huppa⁴, Yu-Hwai Tsai⁵, Camille Lobry⁶, Jianming Xie⁷, Peter J. Dempsey⁵, Howard C. Crawford⁸, Iannis Aifantis⁶, Mark M. Davis¹ and DAAV. Distinct T cell receptor signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat Immunol.* 2013;176(3):139-148. doi:10.1038/ni.2538.Distinct
155. Lu HY, Bauman BM, Arjunaraja S, et al. The CBMopathies—a rapidly expanding spectrum of human inborn errors of immunity caused by mutations in the CARD11-BCL10-MALT1 complex. *Front Immunol.* 2018;9(SEP). doi:10.3389/fimmu.2018.02078
156. Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, Chen ZJ. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell.* 2004;14(3):289-301. doi:10.1016/S1097-2765(04)00236-9
157. David M. Rothwarf^{*†}, Ebrahim Zandi^{*†} GN& MK. IKK- β is an essential regulatory subunit of the I β B kinase complex. *Nature.* Published online 1998:1051-1054.
158. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF- κ B and the immune response. *Oncogene.* 2006;25(51):6758-6780. doi:10.1038/sj.onc.1209943
159. Sun SC. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* 2011;21(1):71-85. doi:10.1038/cr.2010.177
160. Delgoffe GM, Pollizzi KN, Waickman AT, et al. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol.* 2011;12(4):295-304. doi:10.1038/ni.2005
161. Lee K, Gudapati P, Dragovic S, et al. Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways.

- Immunity*. 2010;32(6):743-753. doi:10.1016/j.immuni.2010.06.002
162. Hamilton KS, Phong B, Corey C, et al. T cell receptor-dependent activation of mTOR signaling in T Cells Is Mediated by Carma1 and MALT1, but not Bcl10. *Sci Signal*. 2014;7(329):1-13. doi:10.1126/scisignal.2004983
163. Bai D, Ueno L, Vogt PK. Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer*. 2009;125(12):2863-2870. doi:10.1002/ijc.24748
164. Canovas B, Nebreda AR. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(5):346-366. doi:10.1038/s41580-020-00322-w
165. Li C, Beavis P, Palfreeman AC, Amjadi P, Kennedy A, Brennan FM. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is critical step for acquisition of effector function in cytokine-activated T cells, but acts as a negative regulator in T cells activated through the T-cell receptor. *Immunology*. 2011;132(1):104-110. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03345.x
166. Rincón M, Pedraza-Alva G. JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev*. 2003;192:131-142. doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00019.x
167. Takeuchi S, Takayama Y, Ogawa A, Tamura K, Okada M. Cbp Positively Regulates the Activity of the Carboxyl-terminal Src Kinase , Csk *. *J Biol Chem*. 2000;275(38):29183-29186. doi:10.1074/jbc.C000326200
168. Stone JD, Conroy LA, Byth KF, et al. Aberrant TCR-mediated signaling in CD45-null thymocytes involves dysfunctional regulation of Lck, Fyn, TCR-zeta, and ZAP-70. *J Immunol*. 1997;158(12):5773-5782. doi:10.4049/jimmunol.158.12.5773
169. D'Oro U, Sakaguchi K, Appella E, Ashwell JD. Mutational Analysis of Lck in CD45-Negative T Cells: Dominant Role of Tyrosine 394 Phosphorylation in Kinase Activity. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4996-5003. doi:10.1128/mcb.16.9.4996
170. Lorenz U. SHP-1 and SHP-2 in T cells: Two phosphatases functioning at many levels. *Immunol Rev*. 2009;228(1):342-359. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00760.x
171. Zhang Z, Shen K, Lu W, Cole PA. The Role of C-terminal Tyrosine Phosphorylation in the Regulation of SHP-1 Explored via Expressed Protein Ligation *. *J Biol Chem*. 2003;278(7):4668-4674. doi:10.1074/jbc.M210028200
172. Choi S, Lee J, Hatzihristidis T, et al. THEMIS increases TCR signaling in CD4+CD8+ thymocytes by inhibiting the activity of the tyrosine phosphatase SHP1. *Sci Signal*.

- 2023;16(784):1-25. doi:10.1126/scisignal.ade1274
173. Burshtyn DN, Yang W, Yi T, Long EO. A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem*. 1997;272(20):13066-13072.
doi:10.1074/jbc.272.20.13066
174. Plas DR, Johnson R, Pingel JT, et al. Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science (80-)*. 1996;272(5265):1173-1176.
doi:10.1126/science.272.5265.1173
175. Adap TS-, Kwon J, Qu C, Falahati R, Lee C, Williams MS. Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76–ADAP. 2005;24(13):2331-2341.
doi:10.1038/sj.emboj.7600706
176. Thanh V. Nguyen, Yuehai Ke, Eric E. Zhang and G-SF, It. Conditional Deletion of Shp2 Tyrosine Phosphatase in Thymocytes Suppresses Both Pre-TCR and TCR Signals. *J Immunol*. Published online 2006.
177. Brockdorff JL, Woetmann A, Mustelin T, et al. SHP2 regulates IL-2 induced MAPK activation, but not Stat3 or Stat5 tyrosine phosphorylation, in cutaneous T cell lymphoma cells. *Cytokine*. 2002;20(4):141-147. doi:10.1006/cyto.2002.1986
178. Huang Z, Coleman JM, Su Y, et al. SHP-1 regulates STAT6 phosphorylation and IL-4-mediated function in a cell type-specific manner. *Cytokine*. 2005;29(3):118-124.
doi:10.1016/j.cyto.2004.10.004
179. Carla C. Fowler*, Lily I. Pao†, Joseph N. Blattman*,‡ and PDG. SHP-1 in T cells limits the production of CD8 effector cells without impacting the formation of long-lived central memory cells. *J Immunol Methods*. 2010;23(1):1-7.
doi:10.4049/jimmunol.1001362.SHP-1
180. Johnson DJ, Pao LI, Dhanji S, Murakami K, Ohashi PS, Neel BG. Shp1 regulates t cell homeostasis by limiting il-4 signals. *J Exp Med*. 2013;210(7):1419-1431.
doi:10.1084/jem.20122239
181. Chemnitz JM, Parry R V, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*. 2004;173(2):945-954. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240681>
182. Schnell A, Huang L, Singer M, et al. Stem-like intestinal Th17 cells give rise to

- pathogenic effector T cells during autoimmunity. *Cell*. 2021;184(26):6281-6298.e23.
doi:10.1016/j.cell.2021.11.018
183. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development , maintenance , and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009;206(13):3015-3029. doi:10.1084/jem.20090847
184. Tan CL, Kuchroo JR, Sage PT, et al. PD-1 restraint of regulatory T cell suppressive activity is critical for immune tolerance. *J Exp Med*. 2021;218(1).
doi:10.1084/JEM.20182232
185. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(February):1-6.
doi:10.1038/nature04444
186. Paterson AM, Lovitch SB, Sage PT, et al. Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J Exp Med*. 2015;212(10).
doi:10.1084/jem.20141030
187. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science (80-)*. 1996;271(5256):1734-1736.
188. Yuan J, Adamow M, Ginsberg BA, et al. Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8 + T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(40):16723-16728.
doi:10.1073/pnas.1110814108
189. Yuan J, Gnjatic S, Li H, et al. CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(51):20410-20415. doi:10.1073/pnas.0810114105
190. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293-12297.
doi:10.1073/pnas.192461099
191. Juneja VR, Mcguire KA, Manguso RT, et al. PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J Exp Med*. Published online 2017:895-904.
192. Seng-Ryong Woo^{1,*}, Meghan E. Turnis^{1,*}, Monica V. Goldberg^{2,*}, Jaishree Bankoti¹, Mark Selby³, Christopher J. Nirschl², Matthew L. Bettini¹, David Gravano¹, Peter

- Vogel4, Chih Long Liu5, Stephanie Tangsombatvisit5, Joseph F. Grosso2, 6, George Netto7, Mat and DAAV. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* 2013;72(4):917-927. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1620.Immune
193. De Sousa Linhares A, Leitner J, Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P. Not All Immune Checkpoints Are Created Equal. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.01909
 194. Guy C, Mitrea DM, Chou PC, et al. LAG3 associates with TCR–CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor–Lck dissociation. *Nat Immunol.* 2022;23(5):757-767. doi:10.1038/s41590-022-01176-4
 195. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA-4. *Science (80-).* 2011;332(6029):600-603. doi:10.1126/science.1202947.Trans-endocytosis
 196. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol.* 2003;4(7):670-679. doi:10.1038/ni944
 197. Otsuki N, Kamimura Y, Hashiguchi M, Azuma M. Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344:1121-1127. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.242
 198. Gavrieli M, Watanabe N, Loftin SK, Murphy TL, Murphy KM. Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312(4):1236-1243. doi:10.1016/J.BBRC.2003.11.070
 199. Krieg C, Boyman O, Fu YX, Kaye J. B and T lymphocyte attenuator regulates CD8+ T cell-intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nat Immunol.* 2007;8(2):162-171. doi:10.1038/ni1418
 200. Wojciechowicz K, Spodzieja M, Lisowska KA, Wardowska A. The role of the BTLA-HVEM complex in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Cell Immunol.* 2022;376(May):104532. doi:10.1016/j.cellimm.2022.104532
 201. Oguro S, Ino Y, Shimada K, et al. Clinical significance of tumor-infiltrating immune cells focusing on BTLA and Cbl-b in patients with gallbladder cancer. *Cancer Sci.* Published online 2015. doi:10.1111/cas.12825

202. Thommen DS, Schreiner J, Müller P, et al. Progression of lung cancer is associated with increased dysfunction of T cells defined by coexpression of multiple inhibitory receptors. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(12):1344-1354. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0097
203. Ma J, Xie Y, Zhang H, et al. Poster Session Phase I study of the anti-BTLA antibody icatolimab as a single agent or in combination with toripalimab in relapsed / refractory lymphomas . Published online 2022:4477772. doi:10.1200/JCO.2022.40.16
204. Schilder RJ, Powderly JD, Park H, Bilen MA, Mckean M. Poster Session Phase Ia dose-escalation study of the anti-BTLA antibody icatolimab as a monotherapy in patients with advanced solid tumor . Published online 2022:4137900. doi:10.1200/JCO.2022.40.16
205. Choi J, Medikonda R, Saleh L, et al. Combination checkpoint therapy with anti-PD-1 and anti-BTLA results in a synergistic therapeutic effect against murine glioblastoma. *Oncoimmunology.* 2021;10(1):1-9. doi:10.1080/2162402X.2021.1956142
206. Cara L Haymaker^{1, y}, Richard C Wu^{1, 2, 3, 4, y}, Krit Ritthipichai^{1, 3}, Chantale Bernatchez^{1, 4}, Marie-Andr?ee Forget¹, Jie Qing Chen^{1, 5}, Hui Liu⁶, Ena Wang^{6, 7}, Francesco Marincola^{8, 9}, Patrick Hwu^{1, 5}, and Laszlo G RadvanyCara L Haymaker^{1, y}, Richard C and LGR. BTLA marks a less-differentiated tumor-infiltrating lymphocyte subset in melanoma with enhanced survival properties. *Oncoimmunology.* 2015;(August):1-15.
207. Albring JC, Sandau MM, Rapaport AS, et al. Targeting of B and T lymphocyte associated (BTLA) prevents graft-versus-host disease without global immunosuppression. *J Exp Med.* 2010;207(12):2551-2559. doi:10.1084/jem.20102017
208. Yoshihiro Oya^{1,#}, Norihiko Watanabe^{1,#}, Takayoshi Owada¹, Mie Oki¹, Koichi Hirose¹, Akira Suto¹, Shin-ichiro Kagami¹, Hiroshi Nakajima¹, Takashi Kishimoto², Itsuo Iwamoto³, Theresa L Murphy⁴, Kenneth M Murphy⁴ and YS. Development of Autoimmune Hepatitis-like Disease and Autoantibody Production to Nuclear Antigens in Mice Lacking B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA). *Arthritis Rheum.* 2009;58(8):2498-2510. doi:10.1002/art.23674.Development
209. Wang Y, Subudhi SK, Anders RA, et al. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell – mediated responses. *J Clin Invest.* 2005;115(3):711-717. doi:10.1172/JCI200522982.The

210. Gavrieli M, Murphy KM. Association of Grb-2 and PI3K p85 with phosphotyrosine peptides derived from BTLA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345:1440-1445. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.036
211. Magnuson A, Hultgren O, Lange A, Sunde J. Soluble B and T Lymphocyte Attenuator Correlates to Disease Severity in Sepsis and High Levels Are Associated with an Increased Risk of Mortality. *PLoS One*. Published online 2017:1-19. doi:10.1371/journal.pone.0169176
212. Takayoshi Owada,*[†] 1, Norihiko Watanabe,*[†] 1, 2, Mie Oki,* Yoshihiro Oya YS, Saito T, Iwamoto I, Theresa L. Murphy, Kenneth M. Murphy and HN. Activation-induced accumulation of B and T lymphocyte attenuator at the immunological synapse in CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87(March):1-8. doi:10.1189/jlb.0309138
213. Mintz MA, Felce JH, Chou MY, et al. The HVEM-BTLA Axis Restrains T Cell Help to Germinal Center B Cells and Functions as a Cell-Extrinsic Suppressor in Lymphomagenesis. *Immunity*. 2019;51(2):310-323.e7. doi:10.1016/j.immuni.2019.05.022
214. Arav-Boger R, Willoughby RE, Pass RF, et al. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor- α and β -chemokine receptors in congenital CMV disease. *J Infect Dis*. 2002;186(8):1057-1064. doi:10.1086/344238
215. Yu K, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Ebner R, Kwon BS. A Newly Identified Member of Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (TR6) Suppresses LIGHT-mediated Apoptosis* (Received). *J Biol Chem*. 1999;274(20):13733-13736. doi:10.1074/jbc.274.20.13733
216. Marsters SA, Ayres TM, Skubatch M, Gray CL, Rothe M, Ashkenazi A. Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF- κ B and AP-1. *J Biol Chem*. 1997;272(22):14029-14032. doi:10.1074/jbc.272.22.14029
217. Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, et al. LIGHT, a New Member of the TNF Superfamily, and Lymphotoxin α Are Ligands for Herpesvirus Entry Mediator. *Immunity*. 1998;8:21-30.
218. Wang J, Lo JC, Foster A, et al. The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *J Clin Invest*. 2001;108(12):1771-1780. doi:10.1172/JCI200113827

219. Cai G, Anumanthan A, Brown JA, Greenfield EA, Zhu B, Freeman GJ. CD160 inhibits activation of human CD4 + T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. 2008;9(2). doi:10.1038/ni1554
220. Tu TC, Brown NK, Kim T, et al. CD160 is essential for NK-mediated IFN- γ production. *J Exp Med*. 2015;212(3):415-429. doi:10.1084/jem.20131601
221. Cheung TC. Modulation of T Cell Proliferation Through the LIGHT-HVEM-BTLA Cosignaling Pathway. *Recent Pat DNA Gene Seq*. Published online 2009:177-182.
222. Battin C, Leitner J, Waidhofer-Söllner P, Grabmeier-Pfistershammer K, Olive D, Steinberger P. BTLA inhibition has a dominant role in the cis-complex of BTLA and HVEM. *Front Immunol*. 2022;13(August):1-16. doi:10.3389/fimmu.2022.956694
223. Rodriguez-barbosa JI, Schneider P, Weigert A, Rio M, Lee K. HVEM , a cosignaling molecular switch , and its interactions with BTLA , CD160 and LIGHT. *Cell Mol Immunol*. 2019;(April). doi:10.1038/s41423-019-0241-1
224. De Sousa Linhares A, Leitner J, Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P. Not All Immune Checkpoints Are Created Equal. *Front Immunol*. 2018;9(August):1-15. doi:10.3389/fimmu.2018.01909
225. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med*. 2012;209(6):1201-1217. doi:10.1084/jem.20112741
226. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-151. doi:10.1016/S1074-7613(00)80089-8
227. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science (80-)*. 2001;291(5502):319-322. doi:10.1126/science.291.5502.319
228. Nishimura BH, Honjo T, Minato N. Facilitation of α Selection and Modification of Positive Selection in the Thymus of PD-1 – deficient Mice. *J Exp Med*. 2000;191(5).
229. Keir ME, Latchman YE, Freeman GJ, Sharpe AH. Programmed Death-1 (PD-1):PD-Ligand 1 Interactions Inhibit TCR- Mediated Positive Selection of Thymocytes. *J Immunol*. 2005;175(11):7372-7379.

230. Marie Le Moine, Abdulkader Azouz, Guillem Sanchez Sanchez, ..., David Vermijlen, Fabienne Andris SG. Homeostatic PD-1 signaling restrains EOMES- dependent oligoclonal expansion of liver-resident II II Homeostatic PD-1 signaling restrains EOMES-dependent oligoclonal expansion of liver-resident CD8 T cells. *Cell Rep*. Published online 2023. doi:10.1016/j.celrep.2023.112876
231. Patrick MS, Oda H, Hayakawa K, et al. Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(38):16345-16350. doi:10.1073/pnas.0908593106
232. Kakugawa K, Yasuda T, Miura I, et al. A Novel Gene Essential for the Development of Single Positive Thymocytes. *Mol Cell Biol*. 2009;29(18):5128-5135. doi:10.1128/mcb.00793-09
233. Fu G, Vallée S, Rybakin V, et al. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat Immunol*. 2009;10(8):848-856. doi:10.1038/ni.1766
234. Johnson, Andy L., L. Aravind, Natalia Shulzhenko, Andriy Morgun, See-Young Choi, Tanya L. Crockford, Teresa Lambe, Heather Domaschenz, Edyta Kucharska, Lixin Zheng, Carola C. Vinuesa, Michael J. Lenardo, Christopher C. Goodnow⁴, Richard J. C and RHS. Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for completion of thymocyte positive selection. *Physiol Behav*. 2009;176(5):139-148. doi:10.1038/ni.1769.Themis
235. Lesourne R, Uehara S, Lee J, et al. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol*. 2009;10(8):840-847. doi:10.1038/ni.1768
236. Allen PM. Themis imposes new law and order on positive selection. *Nat Immunol*. 2009;10(8):805-806. doi:10.1038/ni0809-805
237. Garreau A, Blaize G, Argenty J, et al. Grb2-Mediated Recruitment of USP9X to LAT Enhances Themis Stability following Thymic Selection. *J Immunol*. 2017;199(8):2758-2766. doi:10.4049/jimmunol.1700566
238. Paster W, Brockmeyer C, Fu G, et al. GRB2-Mediated Recruitment of THEMIS to LAT Is Essential for Thymocyte Development. *J Immunol*. 2013;190(7):3749-3756. doi:10.4049/jimmunol.1203389
239. Paster W, Bruger AM, Katsch K, et al. A THEMIS:SHP1 complex promotes T-cell survival. *EMBO J*. 2014;34(3):393-409. doi:10.15252/embj.201387725

240. Okada T, Nitta T, Kaji K, et al. Differential function of Themis CABIT domains during T cell development. *PLoS One*. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0089115
241. Fu G, Casas J, Rigaud S, et al. Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature*. 2013;504(7480):441-445. doi:10.1038/nature12718
242. Mehta M, Brzostek J, Chen EW, et al. Themis-associated phosphatase activity controls signaling in T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(48):E11331-E11340. doi:10.1073/pnas.1720209115
243. Chuang Sun^{1,5}, Peishun Shou^{1,2,5}, Hongwei Du¹, Koichi Hirabayashi¹, Yuhui Chen¹, Laura E. Herring³, Sarah Ahn^{1,2}, Yang Xu¹, Kyogo Suzuki¹, Guangming Li¹, Ourania Tsahouridis¹, Lishan Su^{1,2}, Barbara Savoldo^{1,2,4} GD. THEMIS-SHP-1 Recruitment by 41BB tunes Lck-Mediated Priming of Chimeric Antigen receptor redirected T cells. *Cancer Cell*. 2020;176(5):139-148. doi:10.1016/j.ccell.2019.12.014.THEMIS-SHP1
244. Choi S, Warzecha C, Zvezdova E, et al. THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1. *Nat Immunol*. 2017;18(4):433-441. doi:10.1038/ni.3692
245. Zvezdova E, Mikolajczak J, Garreau A, et al. Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Sci Signal*. 2016;9(428):1-16. doi:10.1126/scisignal.aad1576
246. Gaud G, Lesourne R, Love PE. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(8):485-497. doi:10.1038/s41577-018-0020-8
247. Yang C, Blaize G, Marrocco R, et al. THEMIS enhances the magnitude of normal and neuroinflammatory type 1 immune responses by promoting TCR-independent signals. *Sci Signal*. 2022;1(July):1-13.
248. Prasad M, Brzostek J, Gautam N, Balyan R, Rybakin V, Gascoigne NRJ. Themis regulates metabolic signaling and effector functions in CD4⁺ T cells by controlling NFAT nuclear translocation. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(9):2249-2261. doi:10.1038/s41423-020-00578-4
249. Chang C-F, D'Souza WN, Ch'en IL, Pages G, Pouyssegur J, Hedrick SM. Polar Opposites: Erk Direction of CD4 T Cell Subsets. *J Immunol*. 2012;189(2):721-731. doi:10.4049/jimmunol.1103015
250. Brzostek J, Gautam N, Zhao X, et al. T cell receptor and cytokine signal integration in

- CD8+ T cells is mediated by the protein Themis. *Nat Immunol.* 2020;21(2):186-198.
doi:10.1038/s41590-019-0570-3
251. Liu Y, Cong Y, Niu Y, et al. Themis is indispensable for IL-2 and IL-15 signaling in T cells. *Sci Signal.* 2022;15(721). doi:10.1126/scisignal.abi9983
252. Han P, Goularte OD, Rufner K, Wilkinson B, Kaye J. An Inhibitory Ig Superfamily Protein Expressed by Lymphocytes and APCs Is Also an Early Marker of Thymocyte Positive Selection. *J Immunol.* 2004;172(10):5931-5939. doi:10.4049/jimmunol.172.10.5931
253. Wu T, Zhen Y, Zeng C, Yi H, Zhao Y. B and T lymphocyte attenuator interacts with CD3 f and inhibits tyrosine phosphorylation of TCR f complex during T-cell activation. *Immunol Cell Biol.* 2007;(May):590-595. doi:10.1038/sj.icb.7100087
254. Bourque J, Hawiger D. The BTLA – HVEM – CD5 Immunoregulatory Axis – An Instructive Mechanism Governing pTreg Cell Differentiation. 2019;10(May):1-5.
doi:10.3389/fimmu.2019.01163
255. Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. 2007;7:320-326. doi:10.1016/j.coi.2007.04.015
256. Prasad M, Wojciech L, Brzostek J, et al. Expansion of an Unusual Virtual Memory CD8+ Subpopulation Bearing V α 3.2 TCR in Themis-Deficient Mice. *Front Immunol.* 2021;12(April):1-16. doi:10.3389/fimmu.2021.644483
257. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and Selective Stimulation of Memory-Phenotype CD8 % T Cells In Vivo by IL-15. *Immunity.* 1998;8:591-599.
258. Tan JT, Ernst B, Kieper WC, Leroy E, Sprent J, Surh CD. Interleukin (IL) -15 and IL-7 Jointly Regulate Homeostatic Proliferation of Memory Phenotype CD8 z Cells but Are Not Required for Memory Phenotype CD4 z Cells. *J Exp Med.* 2002;195(12).
doi:10.1084/jem.20020066
259. Bekiaris V, Šedý JR, Macauley MG, Rhode-Kurnow A, Ware CF. The Inhibitory Receptor BTLA Controls $\gamma\delta$ T Cell Homeostasis and Inflammatory Responses. *Immunity.* 2013;39(6):1082-1094. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.017
260. Haque SJ, Harbor P, Tabrizi M, Yi T, Williams BRG. Shp-1 Is a Negative Regulator of IL-4- and IL-13-dependent Signal Transduction *. *J Biol Chem.* 1998;273(51):33893-33896. doi:10.1074/jbc.273.51.33893
261. Alto P, Branch M. Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor ; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus

- type I-transformed T cells. *PNAS*. 1998;95(March):3845-3850.
262. Mélique S, Yang C, Lesourne R. Negative times negative equals positive, THEMIS sets the rule on thymic selection and peripheral T cell responses. *Biomed J*. 2022;(xxxx). doi:10.1016/j.bj.2022.03.008
263. Nuñez-Cruz S, Aguado E, Richelme S, et al. LAT regulates $\gamma\delta$ T cell homeostasis and differentiation. *Nat Immunol*. 2003;4(10):999-1008. doi:10.1038/ni977
264. Ritthipichai K, Haymaker CL, Martinez M, et al. Multifaceted role of BTLA in the control of CD8+ T-cell fate after antigen encounter. *Clin Cancer Res*. 2017;23(20):6151-6165. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1217
265. Paster W, Bruger AM, Katsch K, et al. A THEMIS:SHP1 complex promotes T-cell survival. *EMBO J*. 2015;34(3):393-409. doi:10.15252/embj.201387725
266. Kyung I, Zhang J, Chiang YJ, Kole HK, Cronshaw DG, Zou Y. Grb2 functions at the top of the T-cell antigen receptor – induced tyrosine kinase cascade to control thymic selection. *PNAS*. Published online 2010:1-6. doi:10.1073/pnas.0905039107
267. Zhang J, Jiang Z, Zhang X, et al. THEMIS is a substrate and allosteric activator of SHP1 , playing dual roles during T cell development. *Nat sctructural Mol Biol*. 2024;31(January). doi:10.1038/s41594-023-01131-3
268. Oguro S, Ino Y, Shimada K, et al. Clinical significance of tumor-infiltrating immune cells focusing on BTLA and Cbl-b in patients with gallbladder cancer. *Cancer Sci*. 2015;106(12):1750-1760. doi:10.1111/cas.12825
269. Quan L, Lan X, Meng Y, et al. BTLA marks a less cytotoxic T-cell subset in diffuse large B-cell lymphoma with high expression of checkpoints. *Exp Hematol*. 2018;60:47-56.e1. doi:10.1016/j.exphem.2018.01.003
270. Derré L, Olive D, Speiser DE, et al. BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination. *JCI*. 2010;120(1):157-167. doi:10.1172/JCI40070.Src
271. Chen YL, Lin HW, Chien CL, et al. BTLA blockade enhances Cancer therapy by inhibiting IL-6/IL-10-induced CD19high B lymphocytes. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):1-14. doi:10.1186/s40425-019-0744-4
272. Gautam N, Wojciech L, Yap J, et al. Themis controls T cell activation , effector functions , and metabolism of peripheral CD8 + T cells. *Life Sci Alliance*. 2023;6(12):1-18. doi:10.26508/lsa.202302156

273. Adler G, Steeg C, Pfeffer K, et al. B and T Lymphocyte Attenuator Restricts the Protective Immune Response against Experimental Malaria. *J Immunol*. Published online 2013. doi:10.4049/jimmunol.1101456
274. Torre S, Faucher SP, Fodil N, et al. THEMIS is required for pathogenesis of cerebral malaria and protection against pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. 2015;83(2):759-768. doi:10.1128/IAI.02586-14
275. Jones A, Bourque J, Kuehm L, et al. Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells. *Immunity*. 2016;45(5):1066-1077. doi:10.1016/j.immuni.2016.10.008
276. Yu X, Yang F, Shen Z, et al. BTLA contributes to acute-on-chronic liver failure infection and mortality through CD4+ T-cell exhaustion. *Nat Commun*. 2024;15(1). doi:10.1038/s41467-024-46047-8
277. Sandigursky S, Philips M, Mor A. SAP interacts with CD28 to inhibit PD-1 signaling in T lymphocytes. *Clin Immunol*. Published online 2020. doi:10.1016/j.clim.2020.108485.SAP
278. Peled M, Tocheva AS, Sandigursky S, et al. Affinity purification mass spectrometry analysis of PD-1 uncovers SAP as a new checkpoint inhibitor. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115(3):E468-E477. doi:10.1073/pnas.1710437115
279. Manu Rangachari^{1, 10}, Chen Zhu^{1, 10}, Kaori Sakuishi¹, Sheng Xiao¹, Jozsef Karman^{1, 9}, Andrew Chen¹, Mathieu Angin², Andrew Wakeham³, Edward A Greenfield⁴, Raymond A Sobel⁵, Hitoshi Okada^{3, 6, 7}, Peter J McKinnon⁸, Tak W Mak³, Marylyn M Addo², Ana C Anders and VKK. Bat3 Protects T cell Responses by Repressing Tim-3-Mediated Exhaustion and Death. *Nat Med*. 2013;18(9):1394-1400. doi:10.1038/nm.2871.Bat3
280. Zhu C, Dixon KO, Newcomer K, et al. Tim-3 adaptor protein Bat3 is a molecular checkpoint of T cell terminal differentiation and exhaustion. *Sci Adv*. 2021;7(18). doi:10.1126/sciadv.abd2710
281. Jaeger-ruckstuhl CA, Lo Y, Fulton E, et al. Article Signaling via a CD27-TRAF2-SHP-1 axis during naive T cell activation promotes memory-associated gene regulatory networks II Signaling via a CD27-TRAF2-SHP-1 axis during naive T cell activation promotes memory-associated gene regulatory networks. Published online 2024:287-302. doi:10.1016/j.immuni.2024.01.011

282. Vendel AC, Calemene-Fenaux J, Izrael-Tomasevic A, Chauhan V, Arnott D, Eaton DL. B and T Lymphocyte Attenuator Regulates B Cell Receptor Signaling by Targeting Syk and BLNK. *J Immunol.* 2009;182(3):1509-1517. doi:10.4049/jimmunol.182.3.1509
283. Renaud Lesourne*, †, Ekaterina Zvezdova*, Ki-Duk Song*, ‡, Dalal El-Khoury*, Shoji Uehara*, Valarie A. Barr§, Lawrence E. Samelson§ and PEL. Interchangeability of Themis1 and Themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J Immunol.* 2012;78(2):711-716. doi:10.4049/jimmunol.1200123.Interchangeability
284. Brockmeyer C, Paster W, Pepper D, et al. T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *J Biol Chem.* 2011;286(9):7535-7547. doi:10.1074/jbc.M110.201236
285. Hobo W, Norde WJ, Schaap N, et al. B and T Lymphocyte Attenuator Mediates Inhibition of Tumor-Reactive CD8+ T Cells in Patients After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *J Immunol.* 2012;189(1):39-49. doi:10.4049/jimmunol.1102807
286. Fourcade J, Sun Z, Pagliano O, et al. CD8 + T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* 2012;72(4):887-896. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2637
287. Serriari N-E, Gondois-Rey F, Guillaume Y, et al. B and T Lymphocyte Attenuator Is Highly Expressed on CMV-Specific T Cells during Infection and Regulates Their Function. *J Immunol.* 2010;185(6):3140-3148. doi:10.4049/jimmunol.0902487

Annexes

Articles publiés en co-auteurs

Annexe 1: *THEMIS enhances the magnitude of normal and neuroinflammatory type 1 immune responses by promoting TCR-independent signals*, **Science Signaling, 2022**

Annexe 2: *A selective LIS1 requirement for mitotic spindle assembly discriminates distinct T-cell division mechanisms within the T-cell lineage*, **eLife, 2022**

Annexe 3: *Negative times negative equals positive, THEMIS sets the rule on thymic selection and peripheral T cell responses*, **Biomedical Journal, 2022**

IMMUNOLOGY

THEMIS enhances the magnitude of normal and neuroinflammatory type 1 immune responses by promoting TCR-independent signals

Cui Yang¹, Gaëtan Blaize^{1†}, Rémi Marrocco^{1†}, Nelly Rouquié^{1†}, Cyrielle Bories¹, Mylène Gador¹, Suzanne Mélique¹, Emeline Joulia¹, Mehdi Benamar¹, Anne S. Dejean¹, Hélène Daniels-Treffandier^{1,2}, Paul E. Love³, Nicolas Fazilleau¹, Abdelhadi Saoudi¹, Renaud Lesourne^{1*}

Signals that determine the differentiation of naïve CD4⁺ T helper (T_H) cells into specific effector cell subsets are primarily stimulated by cytokines, but additional signals are required to adjust the magnitude of T_H cell responses and set the balance between effective immunity and immunological tolerance. By inducing the post-thymic deletion of the T cell lineage signaling protein THEMIS, we showed that THEMIS promoted the development of optimal type 1 immune responses to foreign antigens but stimulated signals that favored encephalitogenic responses to self-neuroantigens. THEMIS was required to stimulate the expression of the gene encoding the transcriptional regulator T-BET and the production of the cytokine interferon- γ (IFN- γ), and it enhanced the ability of encephalitogenic CD4⁺ T cells to migrate into the central nervous system. Consistently, analysis of THEMIS expression in polarized CD4⁺ T cells showed that THEMIS was selectively increased in abundance in T_H1 cells. The stimulation of pre-differentiated effector CD4⁺ T cells with antigen-presenting cells revealed a stimulatory function for THEMIS on type 1 cytokine responses, similar to those observed *ex vivo* after immunization. In contrast, THEMIS exerted opposing effects on naïve CD4⁺ T cells *in vitro* by inhibiting the T cell receptor (TCR)-mediated signals that lead to T_H1 cell responses. These data suggest that THEMIS exerts TCR-independent functions in effector T cells, which increase the magnitude of normal and pathogenic T_H1 cell-mediated responses.

INTRODUCTION

One essential feature of the immune system is its ability to engage distinct defensive strategies that are adapted to various invading pathogens. This is partially dependent on CD4⁺ T helper (T_H) cells, which may differentiate from a so-called naïve state into distinct effector cell subsets with specialized immune functions, including T_H1, T_H2, T_H17, T follicular helper (T_{FH}), induced-regulatory T (iT_{reg}), and type 1 regulatory T (T_r1) cells. The lineage choice decision of T_H cells results from the complex integration of signaling events stimulated by the T cell antigen receptor (TCR), which recognizes self-peptide- or foreign peptide-bound major histocompatibility complex (pMHC) at the surface of antigen-presenting cells (APCs), and by a combination of cytokine receptors, which are stimulated specifically according to the cytokine milieu at the site of CD4⁺ T cell activation (1). In addition to these cell fate decision signals, additional signaling events triggered by the TCR and by costimulatory and coinhibitory receptors (2) contribute to regulate the magnitude of specific effector cell responses, thereby promoting effective immunity and preventing the development of potentially pathogenic inflammatory responses.

Thymocyte-expressed molecule involved in selection-1 (THEMIS; also referred to as THEMIS1) is a T cell lineage-specific protein that has an important role during T cell development (3–5). The phenotype of THEMIS-deficient mice shows that THEMIS is essential for

the positive selection of CD4⁺CD8⁺ [double-positive (DP)] thymocytes (3–5) and for their commitment to the CD4⁺ T cell lineage (5). THEMIS contains a C-terminal proline-rich sequence, which binds to the adaptor protein growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) (5, 6) and is required for the recruitment of THEMIS to the adaptor protein linker for the activation of T cells (LAT) after TCR engagement (5, 6), and two globular cysteine-containing all- β in THEMIS (CABIT) domains (4), which bind to the phosphatase domains of the tyrosine phosphatases Src homology phosphatase-1 (SHP-1) and SHP-2 (7).

Although THEMIS is well characterized as an important regulator of T cell development, the mechanism by which it operates in this context has remained the subject of nearly opposite interpretations (8). A first model posits that THEMIS dampens TCR signaling initiated by low-affinity, self-pMHC interactions, preventing the transmission of a strong signaling response to these stimuli that would trigger negative selection (9). THEMIS is speculated to function by promoting the activation of the phosphatase domains of SHP-1 and SHP-2 or by facilitating their recruitment to LAT, where they are brought into contact with their primary targets (9, 10). This model was mostly deduced from *in vitro* studies in which pre-selected “naïve” DP thymocytes were stimulated with low-affinity pMHC tetramers (9). A second model has been proposed in which THEMIS operates as an enhancer of TCR signaling, which enables thymocytes to reach the threshold for positive selection, thereby avoiding death by neglect (7, 11). In this model, THEMIS operates by blocking the catalytic function of the tyrosine phosphatase SHP-1, which has an inhibitory effect on TCR signaling (7). This action is mediated by the CABIT modules of THEMIS, which bind to the phosphatase domain of SHP-1 and promote or stabilize the oxidation of its catalytic cysteine residue, inhibiting the tyrosine phosphatase activity of SHP-1 (7). These enhancing effects of

Copyright © 2022
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim
to original U.S.
Government Works

Downloaded from https://www.science.org on March 19, 2024

¹Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), University of Toulouse, CNRS, INSERM, UPS, 31024 Toulouse, France. ²Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France. ³Section on Hematopoiesis and Lymphocyte Biology, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

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

†These authors contributed equally to this work.

THEMIS on TCR signaling were mainly deduced from in vivo observations of TCR signal—sensing mouse models (11) and complementation studies with SHP-1-deficient mice (7). Although the second model is more likely to explain the block in T cell development that is observed in THEMIS-deficient mice and although the repressing effect of THEMIS on SHP-1 and SHP-2 phosphatase activity is based on solid molecular evidence (7), the reasons for the apparently contradictory findings remain unexplained.

The role of THEMIS during thymic selection has been well characterized, yet less is known about its function in peripheral T cells. Conditional disruption of the gene encoding THEMIS at a late stage of T cell development with CRE recombinase transgenes driven by the distal *lck* promoter identified a positive role for THEMIS in controlling peripheral CD8⁺ T cell maintenance (12). The impaired homeostasis of peripheral CD8⁺ T cells in THEMIS-deficient mice is associated with attenuated cytokine receptor signaling involved in peripheral T cell maintenance and is rescued by deleting the gene encoding SHP-1 (12). Note that this effect is restricted to CD8⁺ T cells, because no effect of THEMIS on CD4⁺ T cell function was detected in that study (12).

Here, we identified a positive function for THEMIS in CD4⁺ T cell responses to self- and foreign antigens. Post-thymic disruption of the *Themis* gene, using Cre recombinase transgenes driven by the *hCD2* promoter, showed that THEMIS promoted T_H1 cell responses in vivo and enhanced the encephalitogenic responses of CD4⁺ T cells to a myelin-based antigen in a mouse model of central nervous system (CNS) autoimmunity. Although THEMIS exerted a positive function on T_H1 cell responses after antigen immunization and after the stimulation of effector T cells with APCs, we showed that THEMIS deficiency led to opposite outcomes in naïve CD4⁺ T cells after TCR stimulation, suggesting that the inhibitory effects of THEMIS on TCR signaling are overcome during immune responses by additional THEMIS-mediated signals that promote rather than repress T cell effector function.

RESULTS

THEMIS negatively regulates IFN- γ production by polarized T_H1 cells by repressing ERK1/2-mediated signaling

To evaluate the post-thymic functions of THEMIS in CD4⁺ T cells, we conditionally disrupted the *Themis* gene with two different Cre recombinase transgenes driven by the human *Cd2* and the distal *lck* promoters. In contrast to other *Cd2*- and *lck*-driven transgenes, these constructs are not active in most DP thymocytes and CD4 single-positive (CD4SP) thymocytes but are increased in expression mainly after thymic development in peripheral T cells (13, 14). THEMIS protein abundance was comparable in thymocytes from *Themis*^{fllox/fllox} (hereafter referred as to *Themis*-T^{WT}) and *Cd2-Cre Themis*^{fllox/fllox} (hereafter called *Themis*-T^{KO}) mice but was undetectable in peripheral *Themis*-T^{KO} CD4⁺ and CD8⁺ T cells (fig. S1A). Because THEMIS was detected in peripheral CD4⁺ T cells from *dLck-Cre Themis*^{fllox/fllox} mice (fig. S1B), we decided to mainly focus our analysis on the *Cd2*-driven knockout (KO) model. The proportions and numbers of DP and SP thymocytes and of peripheral CD4⁺ T cells observed in *Themis*-T^{KO} mice were comparable to those observed in *Themis*-T^{WT} mice (fig. S1C). The proportions and numbers of lymph node and splenic CD8⁺ T cells were slightly reduced in *Themis*-T^{KO} mice (fig. S1D), confirming previously published findings obtained in the *dLck-Cre Themis*^{fllox/fllox} model and indicating a role for THEMIS in the maintenance of peripheral

CD8⁺ T cells (12). The absence of THEMIS in peripheral T cells did not affect the proportions and numbers of Forkhead box P3 (FoxP3)⁺ T_{reg} cells (fig. S1E) and did not modify the percentage of CD62L^{lo}CD44^{hi} memory-like CD4⁺ T cells as compared to that in the *Themis*-T^{WT} group (fig. S1F).

Because THEMIS has been characterized as a regulator of TCR signaling, we first examined the effect of THEMIS deficiency on CD4⁺ T cell responses induced in vitro after TCR stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. TCR surface expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells was similar in *Themis*-T^{KO} and *Themis*-T^{WT} mice (fig. S1G). The viability and the ability of CD4⁺ T cells to proliferate in response to TCR stimulation were similar in *Themis*-T^{KO} and *Themis*-T^{WT} mice (Fig. 1A). TCR stimulation also resulted in

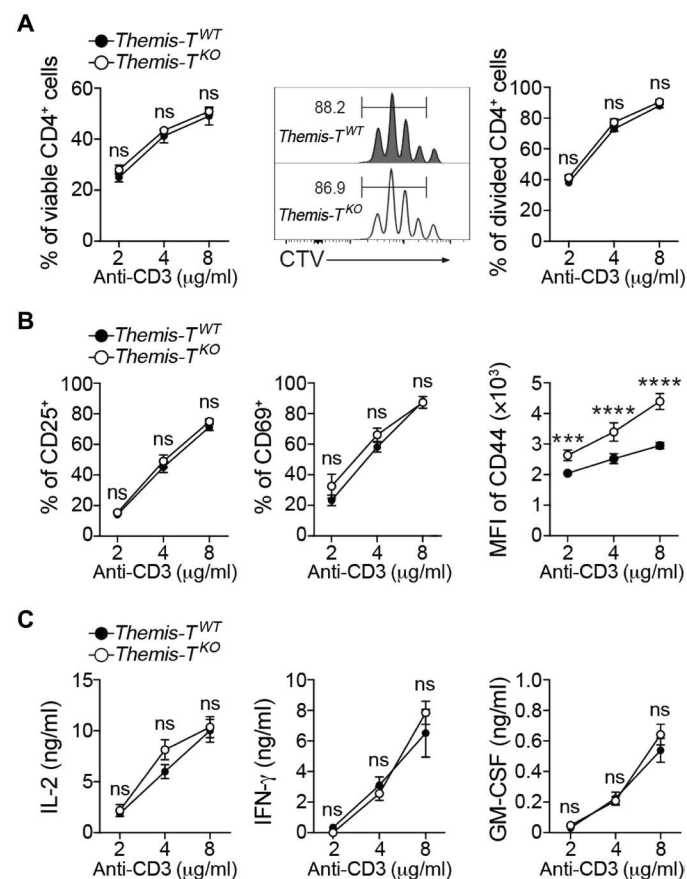


Fig. 1. THEMIS deficiency has a minimal effect on naïve CD4⁺ T cell responses after TCR stimulation. (A) Naïve CD62L^{hi}CD44^{hi}CD25^{lo}CD4⁺ T cells from *Themis*-T^{WT} and *Themis*-T^{KO} mice were stained with CTV and stimulated with the indicated concentrations of anti-CD3 antibody before the survival rate (left), and the proliferation (right) of the cells was determined by flow cytometry on day 3 after stimulation. Middle: Analysis of CTV dilution in viable CD4⁺ T cells. (B and C) Naïve CD62L^{hi}CD25^{lo}CD4⁺ T cells from *Themis*-T^{WT} and *Themis*-T^{KO} mice were stimulated with the indicated concentrations of anti-CD3 antibody. (B) The percentages of CD4⁺ T cells expressing cell surface CD25 (left) and CD69 (middle), as well as the mean fluorescence intensity (MFI) of CD44 staining on CD4⁺ T cells (right) were determined. (C) The amounts of IL-2 (left), IFN- γ (middle), and GM-CSF (right) secreted by the indicated cells were measured by ELISA. Data are means \pm SEM and are representative of at least three independent experiments, each including three or four mice per group. Data were analyzed by unpaired two-tailed Mann-Whitney *t* test. ****P* < 0.001 and *****P* < 0.0001; ns, not significant.

similar cell surface expression of the activation markers CD25 and CD69 on CD4⁺ T cells in the two groups of mice but led to the increased abundance of CD44 on the surface of *Themis-T^{KO}* mice (Fig. 1B), suggesting that THEMIS may have an inhibitory function on a restricted set of TCR-mediated responses in CD4⁺ T cells. THEMIS deficiency had no effect on the production of interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in a similar stimulating context (Fig. 1C and fig. S2A), indicating that THEMIS does not regulate the secretion of cytokines associated with primary CD4⁺ T cell activation. The absence of THEMIS had minimal effect on CD8⁺ T cell responses after TCR stimulation (fig. S2, B to D), confirming previous findings obtained in the *dLck-Cre Themis^{lox/flox}* mouse model (12).

We next investigated whether THEMIS influenced the polarization of CD4⁺ T cells into specific effector cell subsets. We first compared THEMIS abundance in CD4⁺ T cells stimulated in vitro for 3 and 5 days under T_H0-, T_H1-, T_H2-, and T_H17-polarizing conditions. THEMIS abundance was increased in T_H1 cells as compared to that in naïve CD4⁺ T cells and other polarized subsets (Fig. 2A). By contrast, THEMIS abundance in T_H0, T_H2, and T_H17 cells was comparable to that in naïve CD4⁺ T cells (Fig. 2A). We next analyzed the effect of THEMIS deficiency on the production of cytokines by CD4⁺ T cells stimulated under T_H1-, T_H2-, T_H17-, iT_{reg}-, and T_r1-polarizing conditions. We observed that THEMIS-deficient CD4⁺ T cells produced significantly greater amounts of IFN- γ under T_H1-polarizing conditions as compared to *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells (Fig. 2B). This difference was mostly detected when high concentrations of anti-CD3 antibodies were used, suggesting that THEMIS could be part of a negative feedback loop that may prevent the excessive and potentially detrimental effects of IFN- γ . This effect was specifically observed in T_H1-polarized cells, because the production of IFN- γ was not affected by THEMIS deficiency in T_H2- and T_H17-polarized cells (fig. S3A). The production of IL-13, IL-17, and IL-10 by CD4⁺ T cells polarized, respectively, under T_H2, T_H17, and T_r1 conditions and the abundance of FOXP3 in iT_{reg}-polarized CD4⁺ T cells were also comparable in *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* mice (Fig. 2B and fig. S3, B and C), indicating that THEMIS selectively represses the production of cytokines in CD4⁺ T cells polarized in the T_H1 subset. Accordingly, the absence of THEMIS also led to a moderate increase in tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by T_H1-polarized cells (fig. S3D), although no significant effects were observed on IL-2 secretion in similar experimental settings (fig. S3E). The abundances of the transcription factors T-Box expressed in T cells (T-BET) and Eomesodermin (EOMES) were similar in *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells polarized in T_H1 conditions (Fig. 2C), suggesting that THEMIS represses T_H1 cell responses rather than the differentiation program leading to the acquisition of the T_H1 cell lineage.

We next investigated the mechanism by which THEMIS inhibited the secretion of cytokines by T_H1 cells. The cell surface abundance of the IL-12 receptor (IL-12R) and the extent of phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) in response to IL-12 (15) were comparable in *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells (fig. S4, A and B), indicating that the increased secretion of T_H1 cytokines by *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells was not the consequence of enhanced IL-12R signaling. Because the binding of IFN- γ to its receptor (IFN γ R) stimulates a positive feedback loop in T_H1 cells (16), we analyzed whether the inhibitory effects of THEMIS on IFN- γ secretion were dependent on IFN γ R-mediated signaling. The cell surface amounts of IFN γ R were similar in *Themis-T^{KO}* and

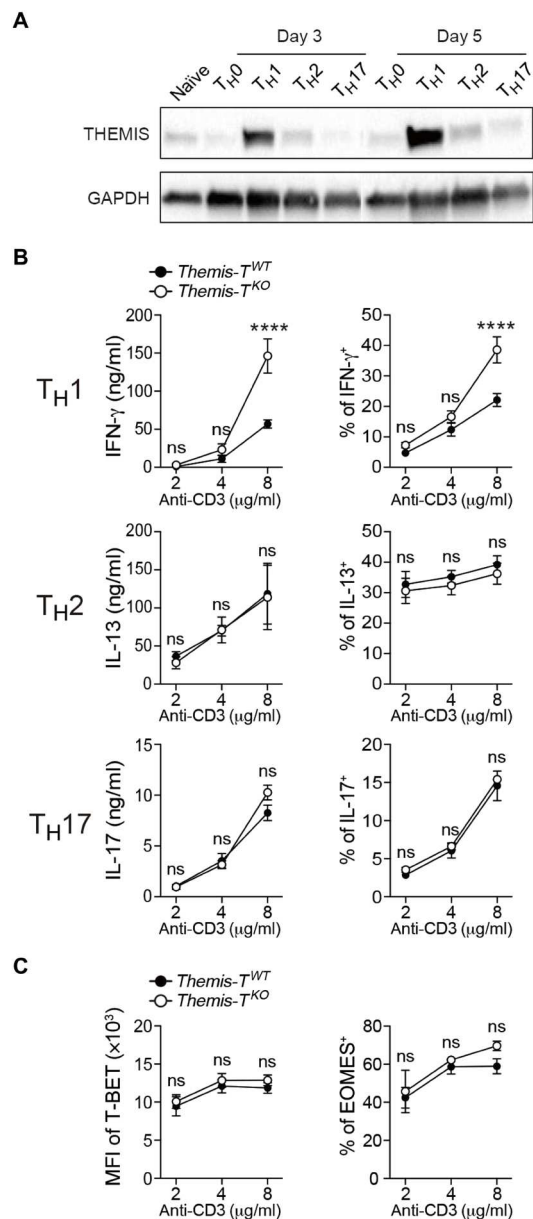


Fig. 2. THEMIS inhibits the production of IFN- γ by T_H1-polarized cells. (A to C) Naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with the indicated concentrations of anti-CD3 antibody in the presence of anti-CD28 antibody under T_H0-, T_H1-, T_H2-, and T_H17-polarizing conditions. (A) Total cytoplasmic extracts of naïve and the indicated polarized CD4⁺ T cell subsets on days 3 and 5 after activation were analyzed by Western blotting with antibodies against THEMIS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Data are representative of two independent experiments. (B) The amounts of IFN- γ (top), IL-13 (middle), and IL-17 (bottom) secreted by cells in T_H1-, T_H2-, and T_H17-polarizing conditions, respectively were determined by ELISA (left), whereas the percentages of cells positive for the indicated cytokines were determined by flow cytometry after intracytoplasmic staining (right). (C) Naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with the indicated concentrations of anti-CD3 antibody in the presence of anti-CD28 antibody under T_H1-polarizing conditions. The MFI of T-BET staining in CD4⁺ T cells (left) and the percentages of CD4⁺ T cells expressing EOMES (right) were determined by flow cytometry analysis after intracytoplasmic staining. Data are means \pm SEM and are representative of at least three independent experiments, each including three or four mice per group. Data were analyzed by unpaired two-tailed Mann-Whitney *t* test. *****P* < 0.0001.

Themis-T^{WT} CD4⁺ T cells (fig. S4C). The production of IFN- γ remained increased in *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T as compared to that in control cells when the IFN γ R was blocked with antagonistic antibodies (fig. S4D), suggesting that THEMIS operates independently of IFN γ R-mediated signaling.

THEMIS deficiency leads to a selective increase in the phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) after TCR stimulation in thymocytes (9, 11). Because ERK2 selectively enhances the production of T_H1 cytokines without affecting T-BET abundance (17), we speculated that THEMIS might negatively regulate T_H1 cell responses by repressing ERK2 activity. Confirming previous observations in thymocytes (9, 11), we found that the phosphorylation of ERK1/2 was increased in *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells as compared to that in control cells (Fig. 3, A and B). In comparison, the presence of THEMIS did not affect the extent of phosphorylation of the MAPK p38, indicative of the specific effect of THEMIS on TCR signaling pathways (Fig. 3, A and B). The abundances of phosphorylated SHP-1 and SHP-2 were decreased in *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells as compared to those in *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells (Fig. 3, A and B), suggesting that THEMIS inhibits ERK1/2 by regulating those phosphatases.

To address whether enhanced ERK activity could be responsible for the increased production of T_H1 cytokines by *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells, we next compared the responsiveness of *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells to ERK inhibition after TCR stimulation of CD4⁺ T cells in T_H1-polarizing conditions. The production of IFN- γ by CD4⁺ T cells was progressively decreased as the concentration of the MAPK kinase (MEK) inhibitor U0126 was increased, confirming the enhancing effect of ERK1/2-mediated signaling on IFN- γ production by T_H1 cells (Fig. 3C). By contrast, the production of TNF- α was unaffected by U0126, suggesting that ERK1/2-dependent signals regulate a restricted set of T_H1 cytokines (fig. S4E). Greater concentrations of inhibitor were required to inhibit the production of IFN- γ by 50% by *Themis-T^{KO}* T_H1 cells as compared to that in control cells (Fig. 3C), indicating that the increased activity of ERK1/2 enhanced the production of IFN- γ by *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells.

THEMIS promotes the expression of T-BET and enhances the secretion of IFN- γ by antigen-specific CD4⁺ T cells

To examine the in vivo relevance of our observations, we next analyzed CD4⁺ T cell responses after immunization of *Themis-T^{WT}* and

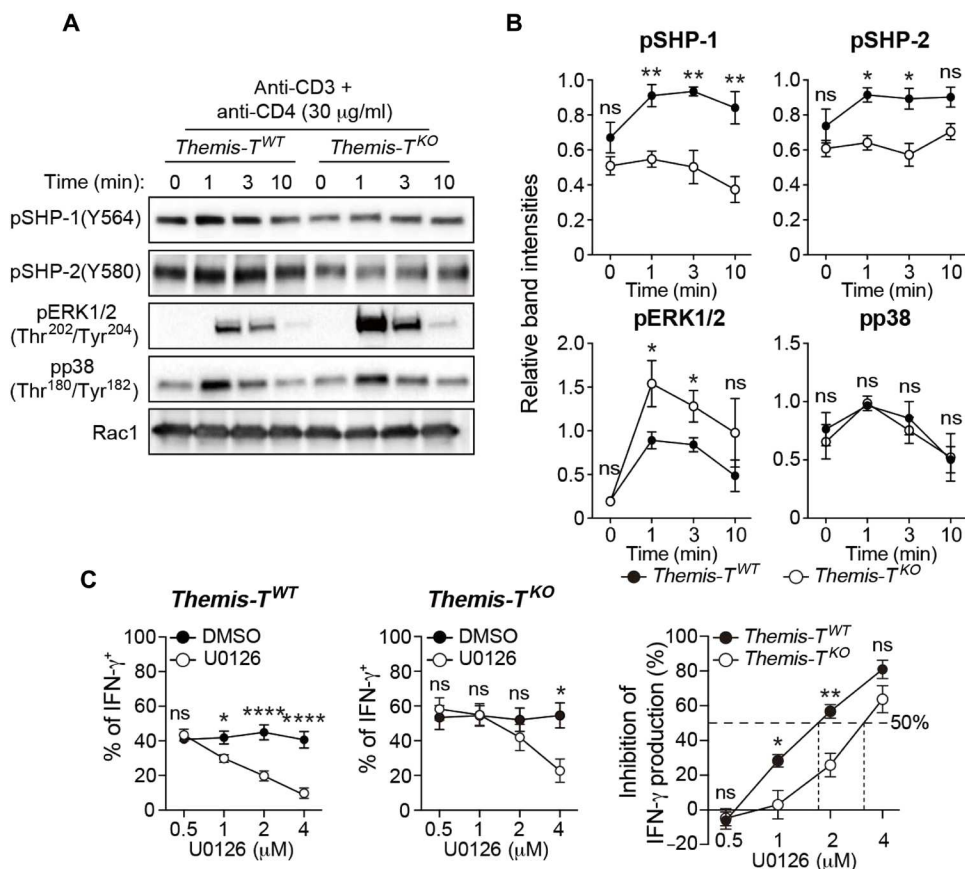


Fig. 3. THEMIS represses the production of IFN- γ by T_H1 cells by inhibiting ERK1/2-mediated signaling. (A) Total CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated anti-CD3 and anti-CD4 antibodies for the indicated times. Total cytoplasmic extracts of the cells were then analyzed by Western blotting with antibodies against phosphorylated forms of SHP-1 (Y564), SHP-2 (Y580), ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), and p38 (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²). (B) From the experiments represented by the blots in (A), the relative abundances of the indicated phosphorylated proteins were determined by calculating the ratios of the intensities of the bands corresponding to the indicated phosphorylated proteins to those corresponding to Rac1, the loading control. The y axes represent the means \pm SEM of the relative values calculated after normalization to the highest value in the *Themis-T^{WT}* cells. Data are representative of three to five independent experiments, each including one mouse of the indicated genotype. (C) Naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with anti-CD3 antibody under T_H1-polarizing conditions in the presence of the indicated concentrations of the MEK inhibitor U0126 or DMSO. The percentages of the *Themis-T^{WT}* (left) and *Themis-T^{KO}* (right) CD4⁺ T cells that were positive for IFN- γ were determined by flow cytometry analysis after intracytoplasmic staining. Right: Analysis of the percentage inhibition of IFN- γ production by CD4⁺ T cells after treatment with the indicated concentrations of U0126. Data are means \pm SEM and are representative of three independent experiments, each including three mice per group. Data were analyzed by unpaired two-tailed Mann-Whitney *t* test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and *****P* < 0.0001.

Themis-T^{KO} mice with a peptide variant of the I-E α chain immunodominant peptide 52-68 (EAWGALANKAVDKA, hereafter called the I-E α peptide) in the presence of the T_H1/T_H17-polarizing complete Freund's adjuvant (CFA). To track antigen-specific CD4⁺ T cells, we stained cells from the draining lymph nodes with the I-E α -pMHCII tetramer and first analyzed the expression of CD44, T-BET, and RAR-related orphan receptor gamma (ROR γ t). The percentages of CD4⁺ T cells expressing a high amount of CD44 and the percentages of CD44^{hi}CD4⁺ T cells positive for tetramer staining were similar in *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice, indicating that THEMIS did not substantially affect the activation or the clonal expansion of antigen-specific CD4⁺ T cells in this experimental setting (Fig. 4A).

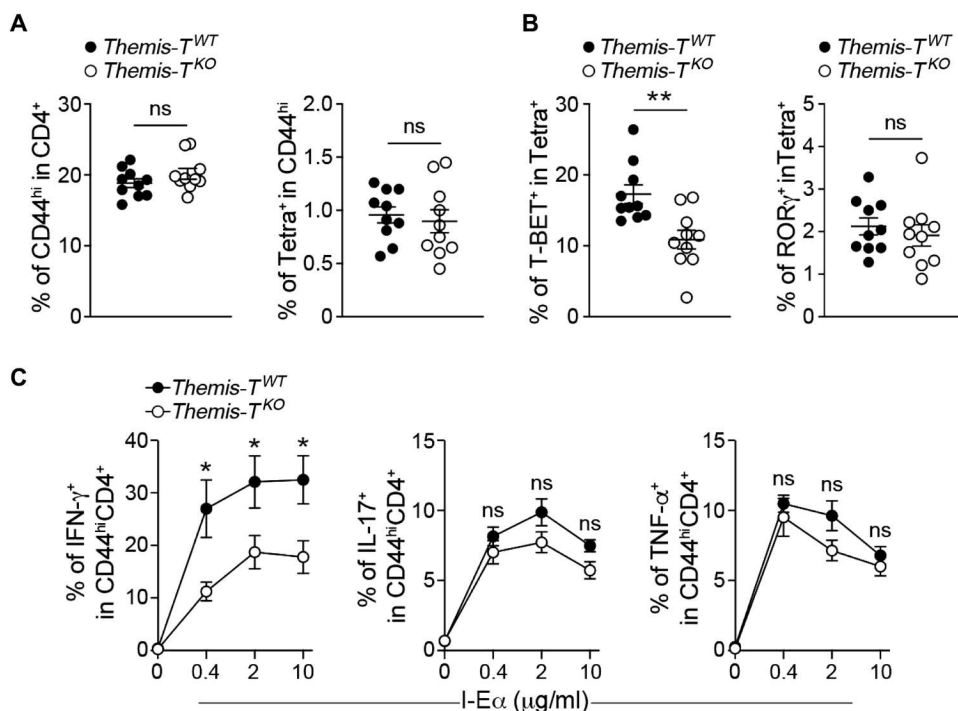


Fig. 4. THEMIS enhances TH1 cell responses to foreign antigens. (A and B) *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were immunized with the I-E α peptide in the presence of CFA. Draining lymph nodes were collected after 9 days, and the isolated cells were stained with I-E α -conjugated MHC tetramers. (A) Dot graphs represent the percentages of CD44^{hi} among CD4⁺ T cells and the percentages of tetramer⁺ (Tetra⁺) cells among CD44^{hi}CD4⁺ T cells as determined by flow cytometry. (B) Dot graphs represent the percentages of T-BET⁺ cells and ROR γ t⁺ cells among tetramer⁺ cells as determined by flow cytometry analysis after intracytoplasmic staining. (C) On day 9 after immunization, cells from the draining lymph nodes of the indicated mice were restimulated in vitro with the indicated concentrations of the I-E α peptide. Curves represent the percentages of cells positive for IFN- γ , IL-17, and TNF- α among the CD44^{hi}CD4⁺ T cells as determined by flow cytometry analysis after intracytoplasmic staining. Data are means \pm SEM and are representative of two (A and B) and three (C) independent experiments including five mice per group. Data were analyzed by unpaired two-tailed Mann-Whitney *t* test (A and B) or multiple *t* test (C). **P* < 0.05 and ***P* < 0.01.

The percentages of tetramer⁺CD4⁺ T cells expressing T-BET were decreased in *Themis-T^{KO}* mice as compared to those in *Themis-T^{WT}* mice (Fig. 4B). In comparison, the expression of ROR γ t in tetramer⁺CD4⁺ T cells was similar between *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice (Fig. 4B). The proportions of antigen-specific CD4⁺ T cells producing IFN- γ were decreased in *Themis-T^{KO}* mice in comparison to those in *Themis-T^{WT}* mice, whereas the absence of THEMIS had no significant effect on the percentages of cells producing IL-17 and TNF- α in the same experimental settings (Fig. 4C). Thus, in contrast with results indicating the inhibitory effects of THEMIS on responses in TH1-polarized cells, immunization of mice with a foreign antigen revealed a positive effect of THEMIS on the development of type 1 responses.

THEMIS enhances the susceptibility to the development of CNS autoimmunity

Initial studies of THEMIS suggested that it attenuates TCR signal strength in thymocytes in response to low- but not high-affinity TCR engagement (9), indicating that THEMIS might have a different influence on CD4⁺ T cells responses when cells are stimulated by self- rather than foreign antigens. To address this possibility, we examined the effect of THEMIS on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a well-characterized mouse model of multiple sclerosis. The disease was induced by immunizing

Themis-T^{KO} and *Themis-T^{WT}* mice with a peptide from the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) emulsified in CFA. The incidence and the clinical scores of EAE were decreased in the group of *Themis-T^{KO}* mice in comparison to those in the *Themis-T^{WT}* group (Fig. 5A). Although the *Cd2*-driven Cre transgene begins to be expressed at a relatively late stage of T cell development (13), we could not definitively exclude the possibility that the effect of THEMIS on EAE development could be the consequence of an altered selection of the TCR repertoire in the thymus. To evaluate this possibility, we conditionally disrupted the *Themis* gene in peripheral CD4⁺ T cells by administering tamoxifen to *Themis^{fllox/fllox}* mice expressing the *CD4-Cre^{ERT2}*-driven transgene (18) and analyzed the development of EAE in this model. The incidence and clinical scores of EAE were decreased in THEMIS-deficient mice similarly to what was observed in the *Cd2-Cre*-driven transgenic model (Fig. 5B). The numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells that migrated into the brain were decreased in THEMIS-deficient mice in comparison to those in littermate controls (Fig. 5, C and D). This was associated with increased numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the lymph nodes, whereas the numbers of cells recovered in the spinal cord were comparable between the two groups of mice (Fig. 5, C and D). Together, these

results indicate that THEMIS expression in T cells results in a higher susceptibility of mice to CNS inflammation.

THEMIS enhances the expression of T-BET and the production of IFN- γ and GM-CSF by encephalitogenic CD4⁺ T cells

To investigate further the mechanism by which THEMIS modulated the development of EAE and to avoid potential bias due to the perturbation of the TCR repertoire or to tamoxifen treatment, we adoptively transferred *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* CD62L^{high}CD25⁻CD4⁺ T cells expressing the MOG₃₅₋₅₅-specific TCR 2D2 and the CD45.1 allotypic marker into C57BL/6 mice and analyzed the development of EAE in recipient mice after immunization with MOG₃₅₋₅₅ in the presence of CFA. The incidence and the clinical scores of EAE were decreased in recipient mice that received *Themis-T^{KO}* 2D2⁺CD4⁺ T cells in comparison to those in the control group (Fig. 6A). The cumulative scores and the maximum scores were also reduced in recipient mice injected with *Themis-T^{KO}* 2D2⁺CD4⁺ T cells (Fig. 6A), suggesting that THEMIS enhances the encephalitogenic potential of CD4⁺ T cells in this model. The numbers of CD45.1⁺CD4⁺ T cells infiltrating the brain and the spinal cord were decreased in recipient mice injected with *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells 14 days after immunization (Fig. 6B). However,

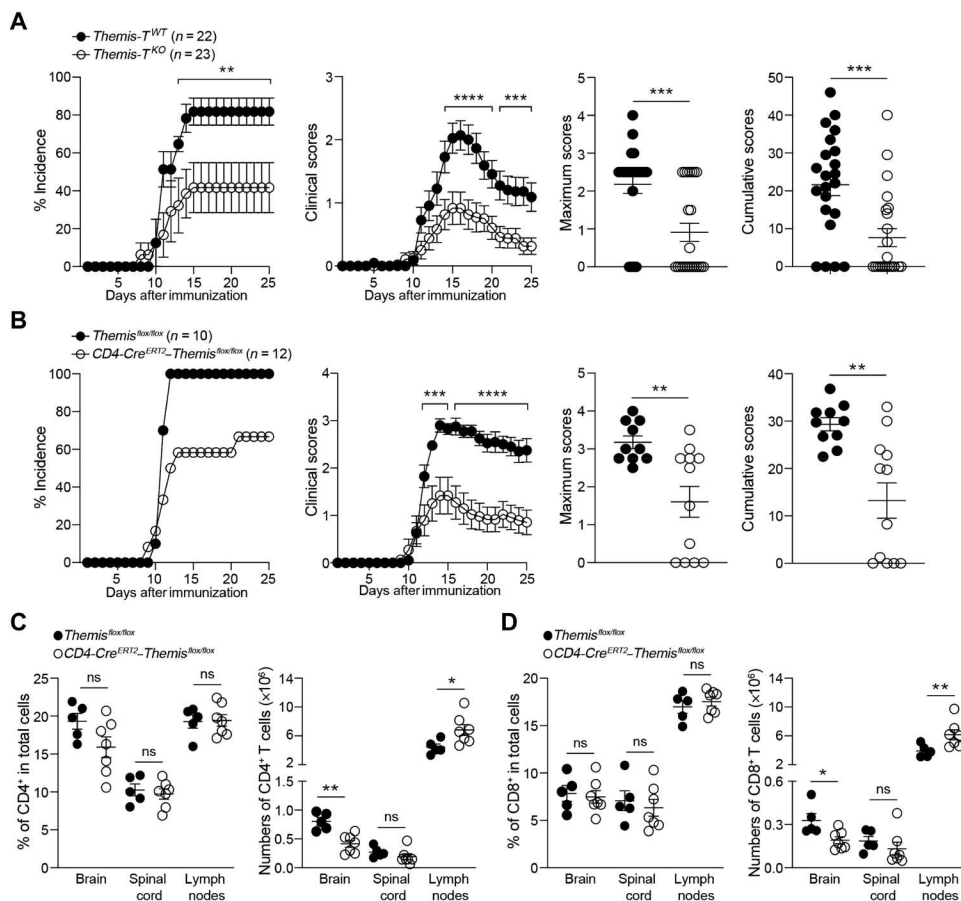


Fig. 5. THEMIS expression in CD4⁺ T cells is associated with an enhanced susceptibility of mice to the development of EAE. (A) *Themis-T^{WT}* (filled circles) and *Themis-T^{KO}* (open circles) mice were immunized with 50 μ g of the MOG_{35–55} peptide emulsified in CFA on day 0, and 200 ng of pertussis toxin was injected intravenously on days 0 and 2. Incidence, clinical scores, maximum scores, and cumulative clinical scores were calculated over the indicated times. Data are representative of four independent experiments including a total of 22 or 23 mice per group. (B) *Themis^{flox/flox}* (filled circles) and *CD4-Cre^{ERT2}-Themis^{flox/flox}* (open circles) mice were immunized with 200 μ g of MOG_{35–55} peptide emulsified in CFA on day 0, and 200 ng of pertussis toxin was injected intravenously on days 0 and 2. Incidence, clinical scores, maximum scores, and cumulative clinical scores were calculated over the indicated times. Data are representative of two independent experiments including a total of 10 to 12 mice per group. (C and D) Dot graphs represent the percentages and numbers of CD4⁺ (C) and CD8⁺ (D) T cells in the lymph nodes, brain, and spinal cord of *Themis^{flox/flox}* and *CD4-Cre^{ERT2}-Themis^{flox/flox}* mice that were immunized with MOG_{35–55}. Data are representative of two independent experiments, each including five to seven mice per group. Clinical scores and incidence were statistically analyzed by two-way ANOVA. An unpaired two-tailed Mann-Whitney *t* test was used for other analysis. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.0001.

similar percentages of 2D2⁺ T cells out of total CD4⁺ T cells were recovered in those organs, suggesting that THEMIS promoted the migration of encephalitogenic 2D2⁺CD4⁺ T cells and may also have facilitated the migration of endogenous CD4⁺ T cells through bystander effects (Fig. 6B).

To analyze whether THEMIS regulated the activation and differentiation of 2D2⁺ T cells, we performed a phenotypic analysis of lymph node CD45.1⁺CD4⁺ T cells before the onset of disease. The percentages and numbers of *Themis-T^{KO}* CD45.1⁺CD4⁺ T cells recovered from the draining lymph nodes were decreased in comparison to those in *Themis-T^{WT}* control cells, suggesting that THEMIS might be important for the maintenance or the clonal expansion of 2D2⁺ T cells (Fig. 6C). To examine whether THEMIS regulated the

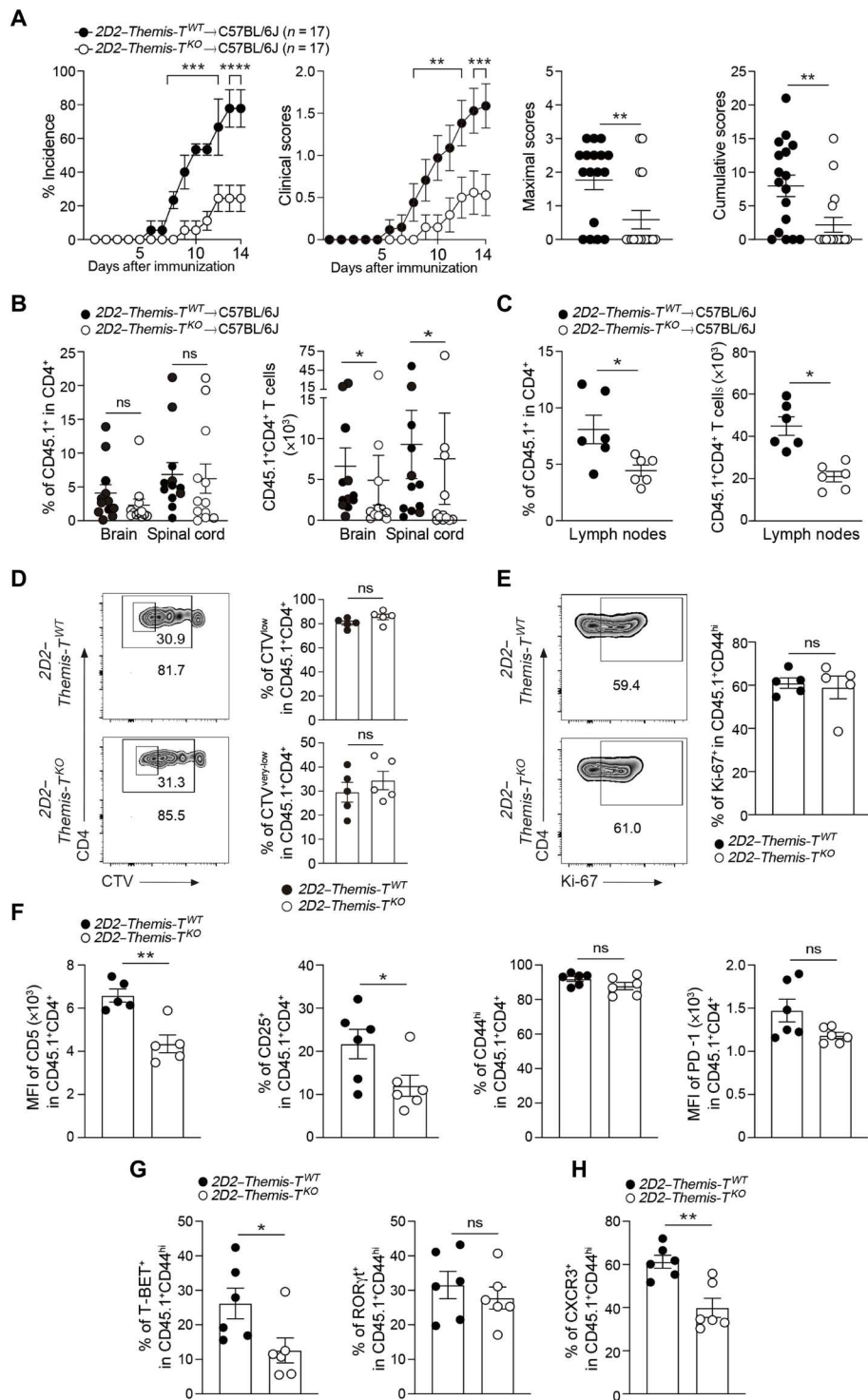
ability of CD4⁺ T cells to proliferate in response to MOG_{35–55} peptide, we injected *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* 2D2⁺CD45.1⁺CD4⁺ T cells stained with CellTrace Violet (CTV) into C57BL/6 mice and analyzed CTV staining in CD45.1⁺CD4⁺ T cells 3 days after immunization. The absence of THEMIS had no detectable effect on the percentages of CTV^{low} and CTV^{very-low} CD45.1⁺CD4⁺ T cells, indicating that THEMIS was not required for the proliferation of antigen-specific T cells (Fig. 6D). Confirming this observation, the percentages of 2D2⁺ T cells expressing the cell division marker Ki-67 were not affected by THEMIS deficiency (Fig. 6E). The expression of the TCR signaling sensor CD5 (19) was decreased in *Themis-T^{KO}* CD45.1⁺CD4⁺ T cells compared to that in WT controls, indicating a positive effect of THEMIS on TCR signaling during CD4⁺ T cell activation (Fig. 6F). Although the percentages of CD45.1⁺CD4⁺ T cells expressing the IL-2R α chain, CD25, were lower in the absence of THEMIS, the activation markers CD44 and programmed cell death protein 1 (PD-1) were expressed at similar amounts on *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* CD45.1⁺CD4⁺ T cells, indicating that THEMIS deficiency did not lead to an overall defect in CD4⁺ T cell priming in this model (Fig. 6F). We next analyzed the expression of T-BET and ROR γ t in CD45.1⁺CD4⁺ T cells to determine the effect of THEMIS on the generation of T_H1 and T_H17 cells. The percentages of CD45.1⁺CD4⁺ T cells expressing T-BET were decreased in the absence of THEMIS in comparison to those in control cells, whereas the expression of ROR γ t in CD45.1⁺CD4⁺ T cells was not affected by loss of THEMIS (Fig. 6G). The chemokine receptor CXCR3, whose expression is positively regulated by T-BET (20), was less abundant on

Themis-T^{KO} CD45.1⁺CD4⁺ T cells than on control cells (Fig. 6H).

We next examined the production of inflammatory cytokines by THEMIS-deficient, peripheral 2D2⁺CD4⁺ T cells in this model. To evaluate whether the strength of TCR stimulation could influence the effect mediated by THEMIS on CD4⁺ T cell responses, 2D2⁺ T cells were harvested from the lymph nodes 6 days after immunization and restimulated *in vitro* with MOG_{35–55} or with a peptide corresponding to the neurofilament medium polypeptide epitope (NF-M_{15–35}), which is also recognized by the 2D2 TCR but elicits a stronger stimulatory effect than that induced by MOG_{35–55} (21, 22). Contrasting again with previous results obtained after TCR stimulation, the percentages of 2D2⁺CD44^{hi} cells producing IFN- γ were decreased in the absence of THEMIS in response to MOG_{35–55} and

Fig. 6. THEMIS enhances the encephalitogenic potential of CD4⁺ T cells expressing the MOG₃₅₋₅₅-specific 2D2 TCR.

(A to C) C57BL/6J mice (CD45.2⁺) were injected intravenously with 2×10^5 naïve CD45.1⁺CD4⁺ T cells from 2D2-*Themis-T*^{WT} or 2D2-*Themis-T*^{KO} mice. The mice were then immunized on day 0 with 100 μ g of MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified in CFA and injected intravenously with 200 ng of pertussis toxin on days 0 and 2. (A) Incidence, clinical scores, maximum scores, and cumulative clinical scores were calculated over the indicated times. Data are representative of three independent experiments including a total of 17 mice per group. (B and C) The percentages and numbers of CD45.1⁺ cells and among CD4⁺ T cells in the brain and the spinal cord (B) and in the lymph nodes (C) on days 14 and 6 after immunization, respectively, were determined. Data in (B) represent two independent experiments including a total of 12 mice per group. Data in (C) are representative of four independent experiments, each including $n=6$ mice per group. **(D)** C57BL/6J mice (CD45.2⁺) were injected intravenously with 2×10^5 CTV-stained naïve CD45.1⁺CD4⁺ T cells from 2D2-*Themis-T*^{WT} (top) and 2D2-*Themis-T*^{KO} (bottom) mice. Mice were then immunized with 100 μ g of MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified in CFA on day 0 and injected intravenously with 200 ng of pertussis toxin on days 0 and 2. Cell proliferation was analyzed on day 3 after immunization. Left: CD4 versus CTV staining on CD45.1⁺ cells as determined by flow cytometry. Right: The percentages of divided and highly divided cells based on the gating strategy indicated in the contour plots. **(E to H)** C57BL/6J mice (CD45.2⁺) were injected intravenously with 2×10^5 naïve CD45.1⁺CD4⁺ T cells from 2D2-*Themis-T*^{WT} or 2D2-*Themis-T*^{KO} mice. The mice were then immunized on day 0 with 100 μ g of MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified in CFA and injected intravenously with 200 ng of pertussis toxin on days 0 and 2. (E) Left: CD4 versus Ki-67 staining on CD45.1⁺ cells as determined by flow cytometry. Right: The percentages of Ki-67⁺ cells among the CD45.1⁺CD44^{hi} cells. (F) The percentages of CD44^{hi} and CD25⁺ cells among CD45.1⁺CD4⁺ T cells, as well as the MFI values of CD5 and PD-1 on CD45.1⁺CD4⁺ T cells. (G) The percentages of CD45.1⁺CD4⁺ T cells expressing T-BET and ROR γ t as determined by flow cytometry. (H) The percentages of CD45.1⁺CD4⁺ T cells expressing cell surface CXCR3. For (D) to (H), data are representative of three to five independent experiments, each including five to seven mice per group. Clinical scores and incidence were statistically analyzed by two-way ANOVA. An unpaired two-tailed Mann-Whitney *t* test was used for the other analysis. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.0001.



NF-M₁₅₋₃₅ stimulation (Fig. 7A). The production of GM-CSF was also decreased in *Themis-T*^{KO} 2D2⁺CD44^{hi} T cells but only when cells were stimulated with low concentrations of MOG₃₅₋₅₅ (Fig. 7B). In comparison, the absence of THEMIS had no detectable effect on the production of IL-17 by 2D2⁺CD44^{hi} cells (Fig. 7C).

One discrepancy between the stimulation of naïve CD4⁺ T cells in vitro and the restimulation of effector CD4⁺ T cells ex vivo relies

on the nature of the TCR stimulations, which are based on anti-CD3 antibodies in vitro and on peptide presented by APCs ex vivo. To evaluate whether this could explain the difference between the data from our in vitro and in vivo experiments, we purified naïve CD4⁺ T cells expressing the 2D2 TCR from *Themis-T*^{KO} and *Themis-T*^{WT} mice and stimulated them with irradiated splenic cells in the presence of MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ peptides under T_H1-polarizing

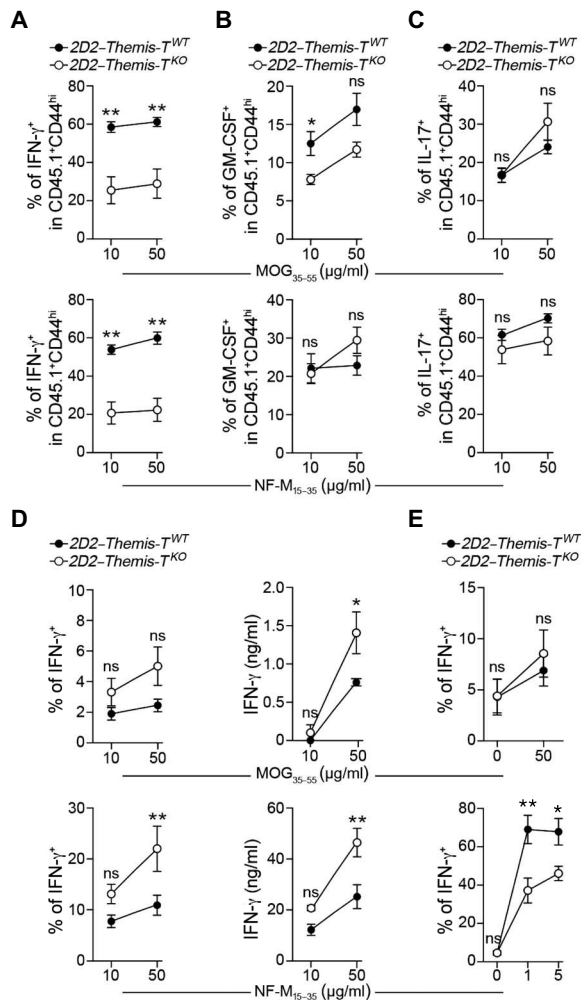


Fig. 7. THEMIS exerts opposing effects on IFN- γ production in effector CD4⁺ T cells and in T_H1-polarized cells stimulated with neuroantigens. (A to C) C57BL/6J mice (CD45.2⁺) were injected intravenously with 2×10^5 naïve CD45.1⁺CD4⁺ T cells from 2D2-*Themis*-T^{WT} and 2D2-*Themis*-T^{KO} mice. Mice were then immunized with 100 μ g of MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified in CFA. Cells were collected from the draining lymph nodes on day 6 after immunization and then stimulated with the indicated concentrations of MOG₃₅₋₅₅ (top) and NF-M₁₅₋₃₅ (bottom). The percentages of CD45.1⁺CD44^{hi}CD4⁺ T cells expressing IFN- γ (A), GM-CSF (B), and IL-17 (C) were determined by flow cytometry analysis. Data are means \pm SEM and are representative of five independent experiments, each including five mice per group. (D) Naïve CD62L^{hi}CD25⁺CD4⁺ T cells from 2D2-*Themis*-T^{WT} and 2D2-*Themis*-T^{KO} mice were stimulated with the indicated concentrations of MOG₃₅₋₅₅ and NF-M₁₅₋₃₅ in the presence of irradiated splenocytes under T_H1-polarizing conditions. The percentages of cells positive for IFN- γ were determined by flow cytometry analysis after intracytoplasmic staining (left), and the amounts of IFN- γ secreted by the cells were determined by ELISA (right). Data are means \pm SEM and are representative of two independent experiments, each including three or four mice per group. (E) Naïve CD62L^{hi}CD25⁺CD4⁺ T cells from 2D2-*Themis*-T^{WT} and 2D2-*Themis*-T^{KO} mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies under T_H1-polarizing conditions for 2 days. Cells were rested for 24 hours in the presence of IL-2 and restimulated with the indicated concentrations of MOG₃₅₋₅₅ (top) and NF-M₁₅₋₃₅ (bottom) in the presence of irradiated splenocytes under T_H1-polarizing conditions. The percentages of cells positive for IFN- γ were determined by flow cytometry analysis after intracytoplasmic staining. Data are means \pm SEM and are representative of two independent experiments, each including three or four mice per group. Data were analyzed by unpaired two-tailed Mann-Whitney *t* test. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01.

conditions. The ability of 2D2⁺ T cells to proliferate in response to MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ was not affected by THEMIS deficiency (fig. S5A). Confirming previous data obtained with antibody-based stimulations, the percentages of 2D2⁺ T cells producing IFN- γ and TNF- α were increased in the absence of THEMIS as compared to those in control cells (Fig. 7D and fig. S5B). The inhibitory effect of THEMIS on IFN- γ production was mostly observed at high concentrations of peptides and seemed more pronounced with NF-M₁₅₋₃₅ than with MOG₃₅₋₅₅, supporting the idea that THEMIS might be part of a negative feedback loop that is engaged upon strong TCR stimulation. The abundance of T-BET was comparable in *Themis*-T^{KO} and *Themis*-T^{WT} CD4⁺ T cells (fig. S5C). Last, the absence of THEMIS did not significantly affect the percentages of 2D2⁺ cells producing IL-17 when cells were polarized in T_H17 conditions (fig. S5D). These results indicate that THEMIS exerts dual inhibitory and enhancing effects on CD4⁺ T cell responses and that the enhancing effects predominate in the physiological context of immune responses against self- and foreign antigens.

The analyses of cytokine secretion after immunization with MOG₃₅₋₅₅ or I-Ea peptides were performed on effector CD4⁺ T cells. By contrast to naïve T cells, effector T cells express various inhibitory receptors that are increased in abundance after T cell activation and engage SHP-1 and SHP-2 (23–26). Because THEMIS exerts an inhibitory effect on the phosphatase activities of SHP-1 and SHP-2 (7), we hypothesized that THEMIS deficiency might lead to different outcomes in naïve and effector CD4⁺ T cells and might enhance T_H1 cell responses exclusively in effector cells by blocking the inhibitory function of those receptors. To investigate this possibility, we stimulated 2D2⁺ *Themis*-T^{KO} and *Themis*-T^{WT} naïve CD4⁺ T cells with anti-CD3 antibodies in polarizing conditions to generate T_H1 effector cells. After a 24-hour resting period, the CD4⁺ T cells were restimulated by irradiated splenic cells incubated with MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ in the presence of a T_H1-polarizing milieu. In those conditions, the percentages of cells producing IFN- γ and the abundance of T-BET were increased after restimulation of *Themis*-T^{WT} CD4⁺ T cells with NF-M₁₅₋₃₅ peptide but were only modestly affected by restimulation with MOG₃₅₋₅₅ (Fig. 7E and fig. S5E). The percentages of 2D2⁺ T cells producing IFN- γ and the abundance of T-BET were decreased in the absence of THEMIS as compared to those in *Themis*-T^{WT} control cells, resulting in similar outcomes to what we observed with effector T cells after immunization *ex vivo* (Fig. 7E and fig. S5E). Together, those results suggest that THEMIS stimulates TCR-independent signals in effector CD4⁺ T cells that overcome its inhibitory effect on TCR signaling and exerts a stimulatory effect on type 1 responses.

DISCUSSION

Nearly opposite functions have been assigned to THEMIS to explain its role in T cell development (8). Whereas *in vitro* studies of DP thymocytes suggest that THEMIS could prevent “misplaced” negative selection events by negatively regulating TCR signals elicited by weak TCR stimulation (9), *in vivo* studies are indicative of an enhancing role of THEMIS on TCR signaling, which enables thymocytes to reach the threshold for positive selection and prevent death by neglect (7, 11). One potential interpretation to explain this discrepancy is that THEMIS may promote different outcomes according to the context of stimulation, operating as a negative regulator of T cell responses when TCR signals emanate exclusively

from the TCR and as an enhancer of those responses when TCR signals integrate multiple regulatory inputs stimulated by additional environmental stimuli. Biochemically speaking, THEMIS would operate similarly in both contexts, by repressing the phosphatase activities of SHP-1 and SHP-2, but the consequence of this effect might be different according to how these phosphatases are respectively engaged by the TCR and by additional receptors, such as coinhibitory and cytokine receptors.

Accordingly, here, we showed that THEMIS deficiency led to nearly opposite consequences for CD4⁺ T cell responses according to the context of stimulation. THEMIS negatively regulated the production of IFN- γ and TNF- α when naïve CD4⁺ T cells were polarized under T_H1 conditions. The inhibitory effect of THEMIS was restricted to T_H1 cell-mediated responses because the absence of THEMIS did not affect the priming of naïve CD4⁺ T cells nor their differentiation into T_H2 and T_H17 cells. The effect of THEMIS on T_H1 cell responses was associated with a selective increase in the abundance of THEMIS in T_H1 cells, supporting the idea that THEMIS operates as a specific regulator of type 1 responses. T-BET and EOMES were increased in expression normally in the absence of THEMIS after stimulation of naïve CD4⁺ T cells under T_H1-polarizing conditions, indicating that THEMIS regulates T_H1 cell responsiveness to TCR stimulation rather than the ability of naïve CD4⁺ T cells to differentiate into this subset. Paralleling this relatively narrow modulatory effect of THEMIS on T_H1 cell responses, we showed that THEMIS preferentially inhibited the phosphorylation of ERK1/2 but had no detectable effect on the phosphorylation of p38 upon TCR stimulation or on the phosphorylation of STAT4 upon IL-12R stimulation. The effects of *Erk2* conditional disruption in CD4⁺ T are relatively symmetrical to those observed in THEMIS-deficient CD4⁺ T cells, leading to a specific decrease in IFN- γ production by polarized T_H1 cells, which is associated with the absence of a detectable effect on T-BET and on T_H2- or T_H17-mediated responses (17), suggesting that the selective effect of THEMIS on T_H1 cytokine responses might also be the consequence of a targeted effect of THEMIS on ERK2 activity. Supporting this possibility, an inhibitor of ERK1/2 activation was less efficient at repressing IFN- γ production by THEMIS-deficient CD4⁺ T cells than it was at repressing IFN- γ production by control CD4⁺ T cells. Note that the inhibition of ERK1/2 activation had no detectable effect on the production of TNF- α by T_H1-polarized cells, suggesting that the regulatory effect of THEMIS on the production of this cytokine might be dependent on alternative signaling pathways.

Previous analyses of TCR signaling in *Themis*^{-/-} thymocytes showed that THEMIS exerts uncoupled and dual outcomes on TCR-mediated signaling events by, on the one hand, repressing the phosphorylation of ERK1/2 induced by weak TCR stimulation (9, 11) and, on the other hand, by enhancing the activity of Vav1 independently of the strength of TCR stimulation (11). The molecular explanation of this combined effect is not yet resolved but may rely on the type of SHPs that interact with THEMIS. THEMIS binds to and directly inhibits SHP-1 and SHP-2, with its inhibitory effect on SHP-2 being less pronounced than that on SHP-1 (7). SHP-1 appears to have an exclusively inhibitory role in T cell signaling by dephosphorylating key positive regulators of TCR signaling, including VAV1 (27–29). By contrast, SHP-2 has been ascribed both inhibitory and activating roles depending on the substrate and the context of its recruitment to the plasma membrane. Whereas SHP-2 is described as a negative regulator of TCR- and CD28-mediated

signaling events after its recruitment to the inhibitory receptor PD-1 (23, 30, 31), SHP-2 is associated with a positive function on TCR signaling when TCR signals do not integrate additional stimulatory inputs (32, 33). Inactivation of SHP-2 catalytic function in Jurkat cells (32) and conditional disruption of *Ptpn11*, the gene encoding SHP-2, in thymocytes (33) result in impaired TCR-induced ERK activation, suggesting that the repressing effect of THEMIS on ERK1/2 activity may be the consequence of the inhibitory effect of THEMIS on SHP-2 catalytic function and that, by contrast, the activating effect of THEMIS on Vav1 may result from the inhibition of SHP-1.

The THEMIS-mediated inhibition of the phosphatase activity of SHP-1 is associated with the enhanced phosphorylation of SHP-1 in THEMIS-deficient thymocytes, presumably due to reduced auto- or trans-dephosphorylation by SHP-1 (7, 9). We observed that THEMIS positively regulated the phosphorylation of SHP-2 in CD4⁺ T cells, supporting the possibility that THEMIS represses the phosphatase activity of SHP-2 in those cells and thereby inhibits T_H1 cytokine responses. Although we also detected the decreased phosphorylation of SHP-1 in THEMIS-deficient CD4⁺ T cells, this was not associated with any detectable decrease in CD4⁺ T cell responses. This suggests that the functional outcomes resulting from THEMIS-mediated SHP-2 inhibition could be predominant over those resulting from SHP-1 inhibition in these settings. Although several reports identified an inhibitory function for SHP-1 in CD4⁺ T cell responses in vivo (34–37), the conditional deletion of *Ptpn6*, the gene encoding SHP-1, has a minimal effect on CD4⁺ T cell responses in vitro when TCR signals emanate exclusively from TCR crosslinking (35, 37, 38), suggesting that SHP-1 might operate more effectively when recruited to inhibitory receptors (23, 25, 39), which might enrich SHP-1 in the proximity of TCR signaling complexes or in the context of cytokine receptor signaling (35, 37, 40) rather than through negative feedback loops triggered by the TCR itself. This might explain why THEMIS-mediated positive effects on TCR signaling are not revealed in naïve T cells, which, in contrast to effector T cell subsets, express relatively low amounts of the inhibitory receptors that recruit SHP-1 and SHP-2 (2).

We found that the effect of THEMIS on CD4⁺ T cell responses was nearly the opposite in vivo when mice were immunized with self- or foreign antigens. THEMIS exacerbated autoimmunity after immunization with a myelin-derived antigen and enhanced the encephalitogenic potential of 2D2⁺CD4⁺ T cells. This was associated with a positive effect of THEMIS on the secretion of IFN- γ and, to a lesser extent, on the secretion of GM-CSF by 2D2⁺CD4⁺ T cells. Similar to our in vitro findings, THEMIS did not substantially affect the molecular and cellular events associated with naïve CD4⁺ T cell priming or with the development of efficient T_H17 cell responses. The presence of THEMIS was associated with an increased abundance of T-BET in MOG- and I-E α -specific CD4⁺ T cells, suggesting that THEMIS might be important in vivo for the differentiation of naïve CD4⁺ T cells into type 1 effector cells in contrast to its selective effect observed in vitro on T_H1 cell responsiveness. T-BET is required to promote full pathogenic responses during the development of EAE (41, 42) and may operate, at least partly, by inducing the secretion of IFN- γ , which promotes pathogenesis at the early phase of the disease (43, 44). The reduced susceptibility of THEMIS-deficient mice to develop EAE might thus result from the inefficient increase in T-BET abundance, which may consequently affect the amount of IFN- γ produced by encephalitogenic CD4⁺ T cells.

The absence of THEMIS was also associated with decreased numbers of encephalitogenic CD4⁺ T cells in the brain, suggesting that THEMIS might favor the migration of autoreactive CD4⁺ T cells into the CNS. T-BET is required for the optimal migration of CD4⁺ T cells to inflammatory sites by controlling the attachment of CD4⁺ T cells to P-selectin and by increasing the cell surface abundance of chemokine receptors, such as C-X-C motif chemokine receptor 3 (CXCR3) (20). Accordingly, the surface expression of CXCR3 was reduced in THEMIS-deficient CD4⁺ T cells, suggesting that THEMIS may enhance CD4⁺ T cell migration into the CNS through a T-BET-mediated process.

Together, our findings identify THEMIS as a positive regulator of type 1 responses in the context of immune responses to foreign antigen and CNS autoimmunity. The differentiation of naïve CD4⁺ T cells into distinct T_H subsets is regulated not only by cytokine costimulation but also by the magnitude of TCR signaling events, which are contingent on antigen loads, on the affinity of the TCR for pMHC complex and on additional input signals that emanate from costimulatory and coinhibitory receptors. Several pieces of evidence suggest that stronger TCR signals are required for the differentiation of naïve CD4⁺ T cells into the T_H1 lineage than are required for differentiation into the T_H2 lineage (45, 46), suggesting that THEMIS might operate in CD4⁺ T cells similarly as in thymocytes, by enabling the TCR signaling threshold required for the efficient development of type 1 responses to be reached. Accordingly, the abundance of the TCR signaling sensor CD5 was reduced on antigen-specific CD4⁺ T cells after immunization with MOG_{35–55}. Because opposite outcomes for THEMIS deficiency on TCR signaling were obtained in naïve CD4⁺ T cells in the context of TCR stimulation with anti-CD3 antibodies, this suggests that THEMIS might enhance TCR signals in vivo independently of the TCR itself, possibly by regulating receptors found at the surface of effector cells that would recruit SHP-1 or SHP-2. Accordingly, the stimulation of predifferentiated, effector CD4⁺ T cells with APCs revealed a stimulatory function for THEMIS on type 1 cytokine responses, similar to those observed ex vivo after immunization. This possibility may explain why in vitro studies, which exclusively focused on isolated TCR stimulation, may have failed to identify THEMIS as a positive regulator of T cell responses.

MATERIALS AND METHODS

Mice

For the generation of *Themis*-T^{KO} mice, embryonic stem cells from the European Conditional Mouse Mutagenesis (EUCOMM) program (clone HEPD0712-6-H05) were used to generate *Themis*^{fllox/fllox} mice in which the fourth exon of *Themis* was surrounded by two *loxP* sites. These mice were bred with *hCD2-cre* transgenic mice (www.jax.org/strain/027406) in which the human *Cd2* promoter directs the expression of the CRE recombinase at late stages of T cell development in mature CD4 and CD8 SP thymocytes. *Themis*^{fllox/fllox} mice were also bred with *CD4-Cre*^{ERT2} transgenic mice, which contain a tamoxifen-inducible CRE under the control of the *Cd4* promoter (www.jax.org/strain/022356). *Themis*-T^{KO} were crossed with transgenic mice expressing the 2D2 TCR (47). All the experiments were conducted with sex- and age-matched mice between 8 and 12 weeks old housed under specific pathogen-free conditions at the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) animal facility (US-006; accreditation number A-31 55508 delivered by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice). All experimental protocols were approved by a ministry-approved ethics committee

(CEEA-122) and followed the French and European regulations on care and protection of the laboratory animals (EC Directive 2010/63).

Antibodies

For CD4⁺ T cell purification, anti-B220 (RA3-6-B2), anti-CD11b (M1/70), anti-MHC class II (m5-114), anti-FcγRs (2.4G2), NK1.1 (83PK136), anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (SN-H59), and anti-CD25 (PC61) monoclonal antibodies were generated in our laboratory. For stimulation and cell culture, anti-CD3ε (145-2C11) and anti-CD28 (37.51) antibodies were from BioLegend. Recombinant murine IL-2, IL-12p70, IL-6, transforming growth factor-β (TGF-β), and IL-27 were from PeproTech. Neutralizing anti-IL-4 (BVD4-ID11) and anti-IFN-γ (XMG1.2) antibodies were from BD Biosciences. The MEK inhibitor U0126 was from Cell Signaling Technology. For enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis, anti-IFN-γ (AN-18), anti-IL-2 (JES6-1A12), anti-GM-CSF (MP1-22E9), and anti-IL-17 (TC11-18H10) capture antibodies and biotin anti-IFN-γ (XMG 1.2), anti-IL-2 (JES6-SH4), anti-GM-CSF (MP1-31G6), and anti-IL-17 (TC11-8H4) detection antibodies were from BD Biosciences. Anti-IL-13 (eBio13A) capture and biotin anti-IL-13 (eBio1316H) detection antibodies were from eBioscience. For immunoprecipitations and Western blotting analysis, anti-THEMIS (06-1328) and anti-Rac (23A8) antibodies were from EMD Millipore. Anti-pERK (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), anti-pSHP-1 (Tyr⁵⁶⁴), anti-pSHP-2 (Tyr⁵⁸⁰), and anti-pp38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and goat anti-mouse antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. For cell sorting and flow cytometry analysis, anti-CD4 (RM 4-5), anti-GM-CSF (MP1-22E9), and anti-IL-10 (JES5-16E3) antibodies were from BioLegend; anti-CD8α (53-6.7), anti-TCRβ (H57-597), anti-CD25 (PC61.5), anti-CD44 (IM7), anti-CD69 (H1.2F3), anti-EOMES (Dan1Imag), anti-T-BET (4B10), anti-IL-13 (eBio13A), anti-RORγt (B2D), anti-FOXP3 (FJK-16 s), anti-CXCR3 (CXCR3-173), anti-PC-1 (J43), anti-IFNγR (2E2), anti-pSTAT4 (4LURPIE), and anti-granzyme B (NGZB) antibodies were from eBioscience. Anti-CD62L (MEL-14), anti-IFN-γ (XMG1.2), anti-TNF-α (MP6-XT22), anti-IL-17 (TC11-18H10), and anti-Ki-67 (B56) antibodies were from BD Biosciences. Anti-CD45.1 (A20), anti-TCR Vα3.2 (REA359), and anti-TCR Vβ11 (REA657) were from Miltenyi Biotec.

Flow cytometry and cell sorting

For flow cytometry analysis, single-cell suspensions from the thymus, spleen, or lymph nodes were incubated with diluted eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher Scientific) in phosphate-buffered saline (PBS), 1% fetal calf serum, and 2 mM EDTA before undergoing staining with fluorochrome-conjugated antibodies. Intracellular staining was performed with the FOXP3 staining buffer kit (eBioscience) according to the manufacturer's instructions before data acquisition on a BD LSR II flow cytometer and analysis with the FlowJo software. Purification of naïve CD62L^{hi} CD25⁻ CD4⁺ and CD8⁺ T cells was performed by cell sorting with a FACSaria SORP (BD Biosciences).

Cell culture

For proliferation assays, naïve CD62L^{hi} CD25⁻ CD4⁺ T cells were labeled with 2 μM CTV (Life Technologies) for 15 min at 37°C and cultured in 96-well plates coated with varying concentrations of anti-CD3 antibodies at a density of 1 × 10⁶ cells/ml. The incorporation of CTV was measured by flow cytometry after 3 days

of culture. For polarization assays, naïve CD4⁺ T cells were stimulated for 3 (T_{H1} and iT_{reg}), 4 (T_{H1}), or 5 days (T_{H2} and T_{H17}) with the appropriate concentrations of anti-CD3 antibodies and with soluble anti-CD28 antibody (1 µg/ml) in the presence of the different cytokines and neutralizing antibody cocktails, such as, IL-12 (10 ng/ml) and anti-IL-4 (10 µg/ml) for T_{H1} cells; IL-4 (20 ng/ml) and anti-IFN-γ (6 µg/ml) for T_{H2} cells; IL-6 (20 ng/ml), TGF-β (2 ng/ml), anti-IFN-γ (6 µg/ml), and anti-IL-4 (10 µg/ml) for T_{H17} cells; IL-27 (50 ng/ml) for T_{H1} cells; and TGF-β (0.25 ng/ml) and IL-2 (1 ng/ml) for iT_{reg} cells. For the analysis of cytokine production by flow cytometry, cells were restimulated for 4 hours with phorbol 12-myristate 13-acetate (500 ng/ml), ionomycin (1 µg/ml), and GolgiPlug (1 µg/ml; BD Biosciences). To analyze STAT4 phosphorylation, naïve CD4⁺ T cells were stimulated for 2 days with anti-CD3 (2 µg/ml) and anti-CD28 (1 µg/ml) antibodies. Cells were rested in RPMI 1640 at 37°C overnight and stimulated with the appropriate concentrations of IL-12 at 37°C for 40 min. For in vitro stimulation of 2D2⁺CD4⁺ T cells, naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice expressing the 2D2 TCR were labeled with CTV and cultured in T_{H1}- or T_{H17}-polarizing conditions with MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ (at 10 or 50 µg/ml) in the presence of irradiated splenocytes from C57BL/6J mice (1 × 10⁵ cells per well). For the in vitro analysis of effector cells, naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice expressing the 2D2 TCR were stimulated for 2 days in T_{H1}-polarizing conditions with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. After a 24-hour resting period in the presence of IL-2, the cells were restimulated with MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ in the presence of irradiated splenocytes from C57BL/6J mice (4 × 10⁵ cells per well).

Enzyme-linked immunosorbent assay

Enzyme immunoassays were used to measure the concentrations of cytokines in cell culture medium. Briefly, 96-well plates were coated for 2 hours at 37°C with anti-IFN-γ, anti-IL-13, anti-IL-17, or anti-GM-CSF in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6). Culture medium or standards were incubated for 2 hours at 37°C. The plates were then incubated for 90 min with a secondary biotinylated antibody specific for each cytokine, which was followed by a 20-min incubation with streptavidin-conjugated alkaline phosphatase at 37°C. Last, plates were revealed by alkaline phosphatase substrate, and the absorbance was measured at 450 and 540 nm.

Immunization of mice with I-Eα peptide

Mice were immunized subcutaneously on each side at the base of the tail with 4 µg of peptide I-Eα (EAWGALANKAVDKA from GeneCust) in CFA (Sigma-Aldrich). CD4⁺ T cell populations from the draining lymph nodes were analyzed 9 days after immunization. For staining of antigen-specific cells, I-Eα-I-Ab tetramers were obtained from the National Institutes of Health Tetramer core facility. Overall, cells at 1 × 10⁸/ml were first stained at room temperature for 2 hours with an optimal concentration of tetramer. Cell staining for additional markers was then performed as described earlier. To measure cytokine production, 6 × 10⁶ cells from the draining lymph nodes were stimulated with the appropriate concentration of the I-Eα peptide overnight and incubated with GolgiPlug for 90 min.

EAE model

For active EAE, *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were immunized with 50 µg of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Covalab) emulsified with CFA containing *Mycobacterium tuberculosis* (1 mg/ml; Difco). Pertussis

toxin (200 ng; List Biological Laboratories) was given through intravenous injection on days 0 and 2 after immunization. *CD4-Cre^{ERT2}-Themis^{fllox/flox}* mice were treated by oral gavage with 5 mg of tamoxifen for 3 days and rested for 2 weeks before immunization with 200 µg of MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified with CFA containing *M. tuberculosis* (4 mg/ml). Pertussis toxin (200 ng) was given intravenously on days 0 and 2 after immunization. Analysis of CD4⁺ and CD8⁺T cells in the lymph nodes, the brain, and the spinal cord was performed on day 28 after immunization. Clinical scores were evaluated blindly on a five-stage scale from 0 to 5. For active EAE after adoptive transfer, naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD45.1⁺CD4⁺ T cells were purified from the lymph nodes and splenocytes of *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice expressing the 2D2 TCR. Cells (2 × 10⁵) in PBS were injected intravenously into C57BL/6J mice (CD45.2⁻) 1 day before immunization with 100 µg of MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified with CFA containing *M. tuberculosis* (1 mg/ml). Analysis of CD45.1⁺CD4⁺ T cells in the brain and the spinal cord was performed on day 14 after immunization. For in vivo analysis of cell proliferation, 2D2⁺CD4⁺ T cells were stained with CTV and injected intravenously into C57BL/6J mice 1 day before immunization with MOG₃₅₋₅₅ peptide. The dilution of CTV was evaluated on day 3 after immunization. The phenotype of the CD45.1⁺CD4⁺ T cells from the draining lymph nodes was analyzed by flow cytometry on day 6 after immunization. For the analysis of cytokine production, 1 × 10⁶ cells isolated from the draining lymph nodes were cultured in the presence of MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ peptides (10 and 50 µg/ml, respectively) for 2 days and then incubated with GolgiPlug (1 µg/ml) for 4 hours.

Western blotting analysis

To analyze TCR signaling, CD4⁺ T cells were resuspended at a density of 1 × 10⁷ cells per 50 µl and incubated at 37°C for 10 min before being stimulated. Antibody complexes were prepared at a 2× 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. Cells were stimulated with 50 µl of antibody complexes (60 µg/ml) for the times indicated in the figure legends. Cell lysates were prepared by resuspension in 1 ml of ice-cold lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 1 mM EDTA, and protease inhibitor tablets (Roche)] for 20 min at 4°C. Lysates were cleared by centrifugation at 18,000g for 15 min at 4°C. For Western blotting analysis, proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes according to standard protocols. Membranes were blocked with 5% milk in tris-buffered saline containing Tween at 0.05% 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 chemiluminescence solution (Sigma-Aldrich) for 5 min in the dark, and luminescence was captured with a Bio-Rad XRS⁺ imager. Band intensities were quantified with Bio-Rad ImageLab software. Values from the quantitated bands were normalized for loading differences with Rac1 as a control. The intensity values at each time point were normalized to the highest intensity value obtained for WT controls in each individual experiment.

Statistical analysis

Data are presented as means ± SEM. Statistical analysis were performed by unpaired *t* test. The Mann-Whitney *t* test was used for

nonparametric tests. For clinical score and incidence in EAE, a two-way analysis of variance (ANOVA) method was used for calculating statistical differences. *P* values of <0.05 were considered statistically significant and are labeled as follows: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.001.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.science.org/doi/10.1126/scisignal.abl5343

Figs. S1 to S5

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

- J. Zhu, H. Yamane, W. E. Paul, Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
- L. Chen, D. B. Flies, Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242 (2013).
- G. Fu, S. Vallee, V. Rybakina, M. V. McGuire, J. Ampudia, C. Brockmeyer, M. Salek, P. R. Fallen, J. A. Hoerter, A. Munshi, Y. H. Huang, J. Hu, H. S. Fox, K. Sauer, O. Acuto, N. R. 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. Domaschensz, E. M. Kucharska, L. Zheng, C. G. Vinuesa, M. J. Lenardo, C. C. Goodnow, R. J. Cornall, R. H. Schwartz, Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat. Immunol.* **10**, 831–839 (2009).
- R. Lesourne, 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).
- W. Paster, C. Brockmeyer, G. Fu, P. C. Simister, B. de Wet, A. Martinez-Riaño, J. A. Hoerter, S. M. Feller, C. Wülfing, N. R. Gascoigne, O. Acuto, GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J. Immunol.* **190**, 3749–3756 (2013).
- S. Choi, C. Warzecha, E. Zvezdova, J. Lee, J. Argenty, R. Lesourne, L. Aravind, P. E. Love, THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1. *Nat. Immunol.* **18**, 433–441 (2017).
- S. Choi, R. Cornall, R. Lesourne, P. E. Love, THEMIS: Two models, different thresholds. *Trends Immunol.* **38**, 622–632 (2017).
- G. Fu, J. Casas, S. Rigaud, V. Rybakina, F. Lambalez, J. Brzostek, J. A. Hoerter, W. Paster, O. Acuto, H. Cheroutre, K. Sauer, N. R. Gascoigne, Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* **504**, 441–445 (2013).
- M. Mehta, J. Brzostek, E. W. Chen, D. W. H. Tung, S. T. Chen, S. Sankaran, J. Yap, V. Rybakina, N. R. J. Gascoigne, Themis-associated phosphatase activity controls signaling in T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E11331–E11340 (2018).
- E. Zvezdova, J. Mikolajczak, A. Garreau, M. Marcellin, L. Rigal, J. Lee, S. Choi, G. Blaize, J. Argenty, J. Familiades, L. Li, A. Gonzalez de Peredo, O. Burlet-Schiltz, P. E. Love, R. Lesourne, Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Sci. Signal.* **9**, ra51 (2016).
- J. Brzostek, N. Gautam, X. Zhao, E. W. Chen, M. Mehta, D. W. H. Tung, Y. L. Chua, J. W. Yap, S. H. Cho, S. Sankaran, V. Rybakina, G. Fu, N. R. J. Gascoigne, T cell receptor and cytokine signal integration in CD8(+) T cells is mediated by the protein Themis. *Nat. Immunol.* **21**, 186–198 (2020).
- M. S. Vacchio, L. Wang, N. Bouladoux, A. C. Carpenter, Y. Xiong, L. C. Williams, E. Wohlfert, K. D. Song, Y. Belkaid, P. E. Love, R. Bosselut, A ThPOK-LRF transcriptional node maintains the integrity and effector potential of post-thymic CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **15**, 947–956 (2014).
- D. J. Zhang, Q. Wang, J. Wei, G. Baimukanova, F. Buchholz, A. F. Stewart, X. Mao, N. Killeen, Selective expression of the Cre recombinase in late-stage thymocytes using the distal promoter of the Lck gene. *J. Immunol.* **174**, 6725–6731 (2005).
- W. E. Thierfelder, J. M. van Deursen, K. Yamamoto, R. A. Tripp, S. R. Sarawar, R. T. Carson, M. Y. Sangster, D. A. A. Vignali, P. C. Doherty, G. C. Grosveld, J. N. Ihle, Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* **382**, 171–174 (1996).
- A. A. Lighvani, D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul, J. J. O'Shea, T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 15137–15142 (2001).
- C. F. Chang, W. N. D'Souza, I. L. Chen, G. Pages, J. Pousyssegur, S. M. Hedrick, Polar opposites: Erk direction of CD4 T cell subsets. *J. Immunol.* **189**, 721–731 (2012).
- K. Aghajani, S. Keerthivasan, Y. Yu, F. Gounari, Generation of CD4Cre^{ERT2} transgenic mice to study development of peripheral CD4-T-Cells. *Genesis* **50**, 908–913 (2012).
- 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).
- G. M. Lord, R. M. Rao, H. Choe, B. M. Sullivan, A. H. Lichtman, F. W. Luscinskas, L. H. Glimcher, T-bet is required for optimal proinflammatory CD4(+) T-cell trafficking. *Blood* **106**, 3432–3439 (2005).
- G. Krishnamoorthy, A. Saxena, L. T. Mars, H. S. Domingues, R. Mentele, A. Ben-Nun, H. Lassmann, K. Dornmair, F. C. Kurschus, R. S. Liblau, H. Wekerle, Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* **15**, 626–632 (2009).
- K. M. Rosenthal, L. J. Edwards, J. J. Sabatino, J. D. Hood, H. A. Wasserman, C. Zhu, B. D. Evavold, Low 2-dimensional CD4 T cell receptor affinity for myelin sets in motion delayed response kinetics. *PLOS ONE* **7**, e32562 (2012).
- J. Cely-Gutierrez, P. Blattmann, Y. Zhai, N. Jarmuzynski, K. Ruminski, C. Gregoire, Y. Ounoughene, F. Fiore, R. Aebbersold, R. Roncagalli, M. Gstaiger, B. Malissen, Quantitative interactomics in primary T cells provides a rationale for concomitant PD-1 and BTLA coinhibitor blockade in cancer immunotherapy. *Cell Rep.* **27**, 3315–3330.e7 (2019).
- R. J. Lebbink, T. de Ruiter, A. Verbrugge, W. S. Bril, L. Meyaard, The mouse homologue of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 is an inhibitory receptor that recruits Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-2, but not SHP-1. *J. Immunol.* **172**, 5535–5543 (2004).
- N. Watanabe, M. Gavrieli, J. R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S. K. Loftin, M. A. Hurchla, N. Zimmermann, J. Sim, X. Zang, T. L. Murphy, J. H. Russell, J. P. Allison, K. M. Murphy, BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* **4**, 670–679 (2003).
- M. Colonna, F. Navarro, T. Bellón, M. Llano, P. García, J. Samaridis, L. Angman, M. Cella, M. López-Botet, A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1809–1818 (1997).
- I. Rhee, A. Veillette, Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat. Immunol.* **13**, 439–447 (2012).
- C. C. Stebbins, C. Watzl, D. D. Billadeau, P. J. Leibson, D. N. Burshstyn, E. O. Long, Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6291–6299 (2003).
- S. Mesecke, D. Urlaub, H. Busch, R. Eils, C. Watzl, Integration of activating and inhibitory receptor signaling by regulated phosphorylation of Vav1 in immune cells. *Sci. Signal.* **4**, ra36 (2011).
- T. Okazaki, A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, T. Honjo, PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 13866–13871 (2001).
- E. F. Hui, J. Cheung, J. Zhu, X. L. Su, M. J. Taylor, H. A. Wallweber, D. K. Sasmal, J. Huang, J. M. Kim, I. Mellman, R. D. Vale, T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* **355**, 1428–1433 (2017).
- J. A. Frearson, D. R. Alexander, The phosphotyrosine phosphatase SHP-2 participates in a multimeric signaling complex and regulates T cell receptor (TCR) coupling to the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in Jurkat T cells. *J. Exp. Med.* **187**, 1417–1426 (1998).
- T. V. Nguyen, Y. Ke, E. E. Zhang, G. S. Feng, Conditional deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in thymocytes suppresses both pre-TCR and TCR signals. *J. Immunol.* **177**, 5990–5996 (2006).
- I. S. Mauldin, K. S. Tung, U. M. Lorenz, The tyrosine phosphatase SHP-1 dampens murine Th17 development. *Blood* **119**, 4419–4429 (2012).
- T. Kamata, M. Yamashita, M. Kimura, K. Murata, M. Inami, C. Shimizu, K. Sugaya, C. R. Wang, M. Taniguchi, T. Nakayama, src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* **111**, 109–119 (2003).
- C. S. Deng, A. Minguela, R. Z. Hussain, A. E. Lovett-Racke, C. Radu, E. S. Ward, M. K. Racke, Expression of the tyrosine phosphatase Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 determines T cell activation threshold and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **168**, 4511–4518 (2002).
- D. J. Johnson, L. I. Pao, S. Dhanji, K. Murakami, P. S. Ohashi, B. G. Neel, Shp1 regulates T cell homeostasis by limiting IL-4 signals. *J. Exp. Med.* **210**, 1419–1431 (2013).
- E. R. Mercadante, U. M. Lorenz, T cells deficient in the tyrosine phosphatase SHP-1 resist suppression by regulatory T cells. *J. Immunol.* **199**, 129–137 (2017).
- J. G. Sathish, J. Walters, J. C. Luo, K. G. Johnson, F. G. LeRoy, P. Brennan, K. P. Kim, S. P. Gygi, B. G. Neel, R. J. Matthews, CD22 is a functional ligand for SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase-1 in primary T cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 47783–47791 (2004).
- D. Johnson, L. Pao, S. Dhanji, K. Murakami, B. Neel, P. Ohashi, Shp1 regulates T cell homeostasis by antagonizing IL-4 signaling. *J. Immunol.* **190**, (2013).
- E. Bettelli, B. Sullivan, S. J. Szabo, R. A. Sobel, H. Glimcher, V. K. Kuchroo, Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **200**, 79–87 (2004).

42. A. E. Lovett-Racke, A. E. Rocchini, J. Choy, S. C. Northrop, R. Z. Hussain, R. B. Ratts, D. Sikder, M. K. Racke, Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes. *Immunity* **21**, 719–731 (2004).
43. R. Naves, S. P. Singh, K. S. Cashman, A. L. Rowse, R. C. Axtell, L. Steinman, J. D. Mountz, C. Steele, P. De Sarno, C. Raman, The interdependent, overlapping, and differential roles of type I and II IFNs in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **191**, 2967–2977 (2013).
44. R. Furlan, E. Brambilla, F. Ruffini, P. L. Poliani, A. Bergami, P. C. Marconi, D. M. Franciotta, G. Penna, G. Comi, L. Adorini, G. Martino, Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* **167**, 1821–1829 (2001).
45. H. Yamane, J. Zhu, W. E. Paul, Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4⁺ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *J. Exp. Med.* **202**, 793–804 (2005).
46. N. van Panhuys, F. Klauschen, R. N. Germain, T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4(+) T cell polarization In Vivo. *Immunity* **41**, 63–74 (2014).
47. E. Bettelli, M. Pagany, H. L. Weiner, C. Lington, R. A. Sobel, A. K. Kuchroo, Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.* **197**, 1073–1081 (2003).

Acknowledgments: We acknowledge the technical assistance provided by personnel of the INSERM U5006 Anexplo/creffre animal facility. Flow cytometry experiments were performed at

the INFINITY center core facility connected to the “Toulouse Réseau Imagerie” network. We thank F.-E. L’Faqihi, V. Duplan, and A.-L. Iscache for technical assistance and cell sorting.

Funding: This work was supported by INSERM; the Foundation ARSEP; the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); the Agence Nationale de la Recherche (ANR-20-CE15-0002 and ANR-20-CE15-0005); the Intramural Research Program of the Eunice Kennedy Shriver, National Institute of Child Health and Human Development; a Marie Curie International Reintegration Grant (to R.L.); the China Scholarship Council (a PhD fellowship for C.Y.); and the French Ministry of Higher Education and Research (PhD fellowships for G.B., R.M., E.J., and S.M.).

Author contributions: C.Y., G.B., N.R., S.M., E.J., M.B., and H.D.-T. performed in vitro and in vivo experiments with the *Cd2-Cre Themis^{flax/flax}* model. R.M. performed EAE experiments with the *CD4-Cre^{ERT2}-Themis^{flax/flax}* model. C.B. and M.G. analyzed T cell responses after immunization with I-E α peptides. P.E.L. generated the *Themis^{flax/flax}* mice. A.S.D., N.F., A.S., and R.L. designed the experiments and analyzed the data. R.L. wrote the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data associated with this study are available in the paper or the Supplementary Materials.

Submitted 20 July 2021

Resubmitted 1 February 2022

Accepted 22 June 2022

Published 12 July 2022

10.1126/scisignal.abl5343

A selective LIS1 requirement for mitotic spindle assembly discriminates distinct T-cell division mechanisms within the T-cell lineage

Jérémy Argenty, Nelly Rouquié, Cyrielle Bories, Suzanne Mélique, Valérie Duplan-Eche, Abdelhadi Saoudi, Nicolas Fazilleau, Renaud Lesourne*

Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), INSERM UMR1291, CNRS UMR5051, University Toulouse III, Toulouse, France

Abstract The ability to proliferate is a common feature of most T-cell populations. However, proliferation follows different cell-cycle dynamics and is coupled to different functional outcomes according to T-cell subsets. Whether the mitotic machineries supporting these qualitatively distinct proliferative responses are identical remains unknown. Here, we show that disruption of the microtubule-associated protein LIS1 in mouse models leads to proliferative defects associated with a blockade of T-cell development after β -selection and of peripheral CD4+ T-cell expansion after antigen priming. In contrast, cell divisions in CD8+ T cells occurred independently of LIS1 following T-cell antigen receptor stimulation, although LIS1 was required for proliferation elicited by pharmacological activation. In thymocytes and CD4+ T cells, LIS1 deficiency did not affect signaling events leading to activation but led to an interruption of proliferation after the initial round of division and to p53-induced cell death. Proliferative defects resulted from a mitotic failure, characterized by the presence of extra-centrosomes and the formation of multipolar spindles, causing abnormal chromosomes congression during metaphase and separation during telophase. LIS1 was required to stabilize dynein/dynactin complexes, which promote chromosome attachment to mitotic spindles and ensure centrosome integrity. Together, these results suggest that proliferative responses are supported by distinct mitotic machineries across T-cell subsets.

*For correspondence: renaud.lesourne@inserm.fr

Competing interest: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 22

Preprinted: 25 May 2022

Received: 13 May 2022

Accepted: 11 December 2022

Published: 15 December 2022

Reviewing Editor: Sarah Russell, Peter MacCallum Cancer Centre, Australia

© Copyright Argenty *et al.* This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Editor's evaluation

This paper reports a fundamental finding that the requirement for the dynein binding protein, Lis1, is differentially required by different T cell lineages. The paper provides compelling evidence that the regulation of cell division and subsequent fate differs across T cell lineages. This work will be of interest to researchers focussed on T cell biology and mitosis.

Introduction

Proliferation enables the expansion, differentiation, and maintenance of T cells at different stages of their life cycle. It is required for the rapid growth of antigen-specific T cells, which is important for efficient control of infection. In this context, the initiation of cell division is primarily driven by signals triggered by the T-cell antigen receptor (TCR), which recognizes self or foreign peptides bound to the major histocompatibility complex (pMHC) at the surface of antigen-presenting cells (APCs). Proliferation is also important during T-cell development as it enables the expansion of immature CD4-CD8-thymocytes (referred to as double-negative [DN] thymocytes) that have successfully rearranged the

TCR β -chain and their differentiation into CD4+CD8+thymocytes (referred to as double-positive [DP] thymocytes) (Kreslavsky et al., 2012; Pénit et al., 1995). At these stages, proliferation is mainly driven by coordinated signaling events triggered by the pre-TCR and by the Notch receptor (Ciofani et al., 2004; Maillard et al., 2006). Slow proliferative events are also induced in peripheral T cells to maintain a functional and diversified pool of lymphocytes. Such homeostatic proliferation is triggered in response to TCR stimulation by self-pMHC ligands and to specific cytokines (Sprent and Surh, 2011).

CD4+ T helper cells and CD8+ cytotoxic T cells harbor different proliferative characteristics in response to TCR stimulation. CD4+ T cells require repeated TCR stimulation to efficiently divide and show a relatively restricted expansion rate following antigen priming, while CD8+ T cells divide rapidly after single TCR stimulation (Foulds et al., 2002; Seder and Ahmed, 2003). Cell division is associated to the acquisition of effector function in CD8+ T cells (Chang et al., 2007; Arsenio et al., 2014). The fate decision between the effector and memory lineages in CD8+ T cells has been proposed to occur as early as the first round of division through asymmetric divisions (Arsenio et al., 2014), which enables the unequal partitioning of cell fate determinants in daughter cells (Chang et al., 2007). The role of cell division in the acquisition of CD4+ T cells effector function has been controversial (Bird et al., 1998; Ben-Sasson et al., 2001). Asymmetric divisions were also reported in CD4+ T cells (Chang et al., 2011; Nish et al., 2017), but the contribution of such processes to T helper lineage diversification, which primarily depends on cytokine stimuli, remains also debated (Cobbold et al., 2018). Together, these findings suggest that different cell division dynamics and organization might govern proliferation in CD4+ and CD8+ T cells to ensure different functional outcomes. Whether the mitotic machinery supporting these qualitatively distinct proliferative responses are identical is unknown.

Lisencephaly gene 1 (LIS1, also known as PAFAHB1) is a dynein-binding protein that has important function during brain development (Markus et al., 2020). LIS1 is involved in the proliferation and migration of neural and hematopoietic stem cells (Yingling et al., 2008; Reiner and Sapir, 2013; Zimdahl et al., 2014). It binds to the motor protein complex dynein and regulates the dynamic of its interaction with microtubules (Markus et al., 2020; Yamada et al., 2008; Huang et al., 2012), as well as its ability to form active complex with the multimeric protein complex dynactin (Htet et al., 2020; Elshenawy et al., 2020; Wang et al., 2013). Those complexes are required for the long transport of cargos toward the minus end of microtubules (McKenney et al., 2014; Ayloo et al., 2014; Urnavicius et al., 2015; Schlager et al., 2014) and are important for a wide variety of cellular processes, including the accumulation of γ -tubulin at the centrosome (Young et al., 2000; Blagden and Glover, 2003) and the efficient formation of mitotic spindle poles during metaphases (Quintyne and Schroer, 2002). Recently, we identified LIS1 as a binding partner of the T-cell signaling protein THEMIS (Zvezdova et al., 2016; Garreau et al., 2017), which is important for thymocyte positive selection, suggesting that LIS1 could exhibit signaling function during T-cell development. LIS1 is required in several cellular models for chromosome congression and segregation during mitosis and for the establishment of mitotic spindle pole integrity (Moon et al., 2014). However, the impact of LIS1 deficiency on cell division varies according to cell types and stimulatory contexts. For example, LIS1 is essential to symmetric division of neuroepithelial stem cells prior neurogenesis, whereas LIS1 deficiency has a moderate impact on asymmetric division associated to the differentiation neuroepithelial stem cells in neural progenitors (Yingling et al., 2008). Previous studies also suggest that LIS1 is dispensable for the expansion of CD8+ T cells induced following antigen priming (Ngoi et al., 2016). Together, these findings suggest that LIS1 could have stage- or subset-specific effects on T-cell mitosis, which might discriminate distinct cellular outcomes.

Here, we selected LIS1 as a candidate molecule to explore whether T-cell proliferative responses could be supported by distinct mitotic machineries across different T-cell subsets, such as immature thymocytes as well as CD4+ and CD8+ T cells. Using different *Cre*-inducible models, we identified a selective LIS1 requirement for mitosis in thymocytes and peripheral CD4+ T cells following β -selection and antigen priming, respectively. In contrast, the disruption of LIS1 had little impact on CD8+ T cell proliferation mediated by the TCR. In thymocytes and CD4+ T cells, LIS1 deficiency led to a disruption of dynein–dynactin complexes, which was associated with a loss of centrosome integrity and with the formation of multipolar spindles. These mitotic abnormalities conducted to abnormal chromosomes congression and separation during metaphase and telophase, and to aneuploidy and

p53 upregulation upon cell division. Together, our results suggest that the mechanisms that support mitosis within the T-cell lineage could vary across T-cell subsets according to the functional outcomes to which they are coupled.

Results

Lis1 deficiency leads to an early block of T- and B-cell development

To evaluate the role of LIS1 during T-cell development, we conditionally disrupt *Pafah1b1*, the gene encoding LIS1, using a Cre recombinase transgene driven by the human *cd2* promoter, which is upregulated in T- and B-cell progenitors (Greaves et al., 1989) (mouse line referred to hereafter as CD2-Lis1 cKO). As a control, *Pafah1b1^{flox/flox}* mice (referred to as control mice) were used. Analysis of CD4 and CD8 surface staining in the thymus shows that the loss of LIS1 in the *Cd2-Cre* model leads to a major block of thymocyte maturation at the transition from the DN stage to the DP stage, which is associated with a strong decrease in DP, CD4, and CD8 single-positive (SP) thymocytes numbers but normal numbers of DN thymocytes (Figure 1A). Numbers of peripheral CD4+ and CD8+ T cells were also dramatically decreased in CD2-Lis1 cKO mice compared to that in control mice (Figure 1—figure supplement 1A). Analysis of CD25 and CD44 surface staining on DN thymocytes showed that the numbers of DN4 (CD25-CD44-) thymocytes were strongly decreased in LIS1-deficient mice, whereas the numbers of DN3 (CD25+CD44-) and DN2 (CD25+CD44+) thymocytes were increased, pointing out a defect at the transition from the DN3 to the DN4 stages (Figure 1B). The percentages and numbers of thymocyte in each subset were comparable to control mice in *Cd2-cre Pafah1b1^{flox/+}* mice (referred to as CD2-Lis1 cKO-het), indicating that LIS1 hemizygote expression is sufficient to promote T-cell development (Figure 1—figure supplement 1B). Lower numbers of B cells were also detected in LIS1-deficient mice (Figure 1—figure supplement 1A). Analysis of B-cell development in the bone marrow indicates a strong decrease in the numbers of B220+CD19+ pro-B (IgM-c-kit+), pre-B (IgM-c-kit-), and immature B cells (IgM+c-kit-), whereas numbers of pre-pro-B cells (B220+CD19-) were normal, suggesting a defect of maturation of pre-pro-B cells into pro-B cells (Figure 1—figure supplement 1C). Together, these data indicate that LIS1 is essential for early stages of T- and B-cell development.

LIS1 is required for thymocyte proliferation after the β -selection checkpoint

One critical developmental step at the DN3 to DN4 transition is the formation of a functional TCR β chain, which associates with the pT α chain upon successful rearrangement to form the pre-TCR. Pre-TCR formation triggers signaling events, which lead to the upregulation of CD5 and, together with Notch and the IL-7 receptor (IL-7R) stimulation, to the initiation of several division cycles and to further maturation of thymocytes into DN4 thymocytes (Kreslavsky et al., 2012; Pénit et al., 1995; Maillard et al., 2006; Boudil et al., 2015; Azzam et al., 1998). The percentages of DN3 thymocytes that express the TCR β chain and CD27, a cell surface maker of the β -selection checkpoint (Taghon et al., 2006), were lower in CD2-Lis1 cKO mice compared with those in control mice expressing LIS1, suggesting that LIS1 might be important for the rearrangement of the TCR β chain and/or for the expansion of cells that successfully rearranged the TCR β chain (Figure 1C). The expression level of CD5 was slightly increased in CD2-Lis1 cKO DN3 thymocytes compared with that in control DN3 cells, whereas IL-7R cell surface levels were not affected by LIS1 expression, suggesting that LIS1 was not required for functional pre-TCR assembly but rather for the expansion of DN3 thymocytes after the β -selection checkpoint (Figure 1D and E). Notch signaling leads to increased cell sizes of thymocyte after β -selection and to the upregulation of the transferrin receptor CD71 (Ciofani and Zúñiga-Pflücker, 2005; Kelly et al., 2007). The loss of LIS1 did not affect these two parameters, suggesting that LIS1 is dispensable for Notch-mediated signaling (Figure 1E). To evaluate whether LIS1 is important for the proliferation of DN3 thymocytes following the β -selection checkpoint, we quantified DN cells that have duplicated DNA copies prior and after the β -selection checkpoint. Thymocytes with duplicated DNA copies could not be detected prior the β -selection checkpoint in wild-type and LIS1-deficient mice (Figure 1F). Approximately 10% of thymocytes were in the G2/M phase of cell cycle after β -selection in wild-type mice, whereas this proportion rose to 20% in LIS1-deficient mice, suggesting a possible failure of LIS1-deficient thymocytes to successfully complete division cycles (Figure 1F).

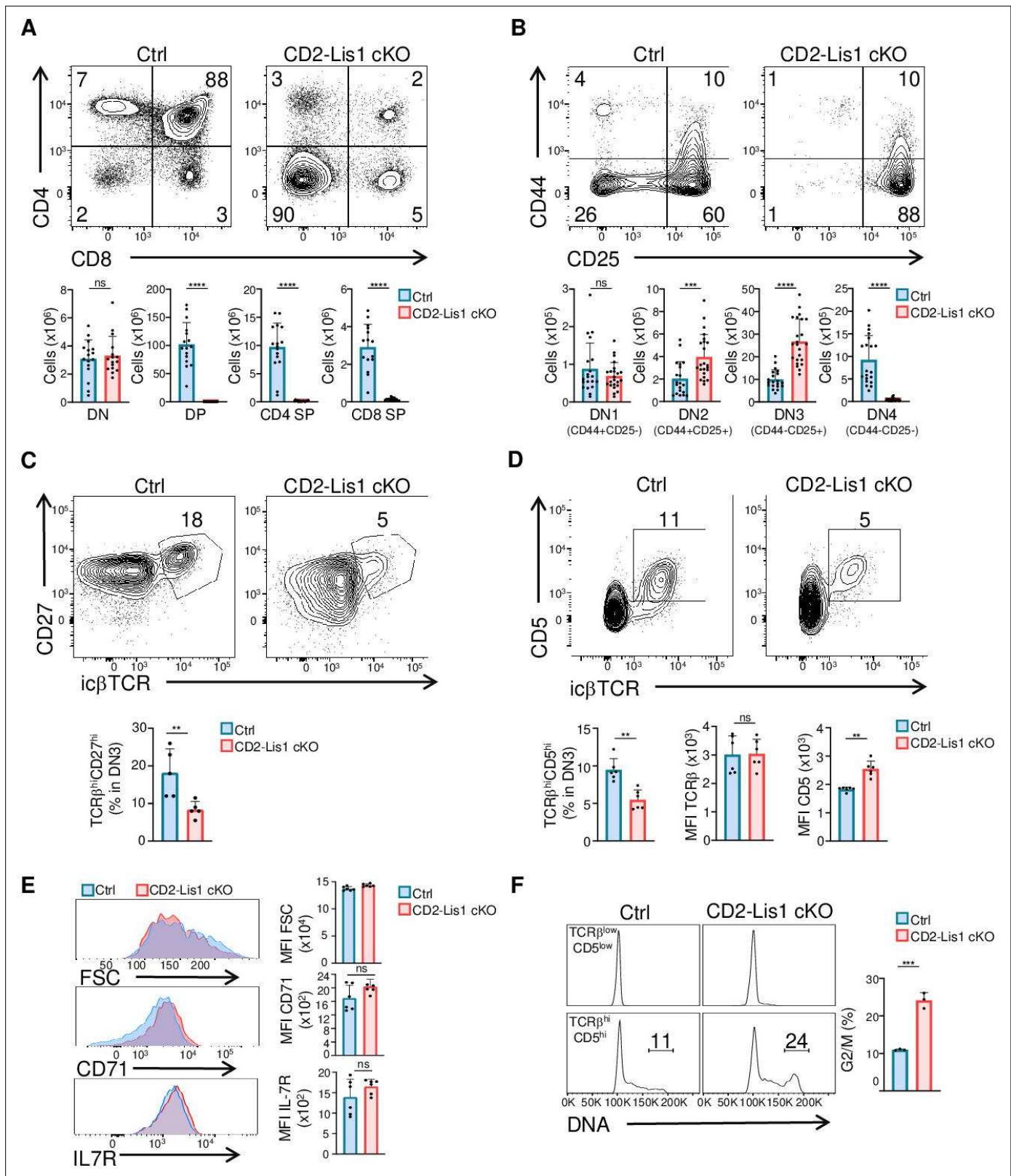


Figure 1. LIS1 is required for T-cell development following the β -selection checkpoint. Phenotypic analyses of thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice. **(A)** Dot plots show CD4 versus CD8 surface staining on thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice. Histogram bars represent the numbers of thymocytes in each indicated subset from mice of the indicated genotype. Data are mean \pm SD and represent a pool of four independent experiments each including $n = 3-4$ mice per group. **(B)** Dot plots show CD44 versus CD25 surface staining on CD4-CD8- [DN] thymocytes from control

Figure 1 continued on next page

Figure 1 continued

and CD2-Lis1 cKO mice. Histogram bars represent the numbers of thymocytes in each indicated subset from mice of the indicated genotype. Data are mean \pm SD and represent a pool of five independent experiments each including $n = 4\text{--}5$ mice per group. **(C)** Dot plots show CD27 versus TCR β intracellular staining on DN3 thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice. Histogram bars represent the percentages of TCR β^{hi} CD27 hi thymocytes in DN3 thymocytes. Data are mean \pm SD and represent a pool of two independent experiments each including $n = 2\text{--}3$ mice per group. **(D)** Dot plots show CD5 versus TCR β intracellular staining on DN3 thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice. Histogram bars represent the percentages of TCR β^{hi} CD5 hi thymocytes in DN3 thymocytes and the MFI of TCR β and CD5 in DN3 TCR β^{hi} CD5 hi thymocytes from mice of the indicated genotype. Data are mean \pm SD and represent a pool of two independent experiments each including $n = 3$ mice per group. **(E)** Histogram graphs show IL-7R, CD71 surface staining and forward-scatter (FSC) on DN3 thymocytes expressing the TCR β chain. Histogram bars represent the MFI of IL-7R, CD71, and FSC in the indicated DN3 thymocytes subsets. Data are mean \pm SD and represent a pool of two independent experiments each including $n = 3$ mice per group. **(F)** Histogram graphs show DNA intracellular staining on DN3 thymocytes from the indicated subsets. The percentages represent cells in the G2/M phase of cell cycle. Histogram bars represent the percentages of DN3 TCR β^{hi} CD5 hi thymocytes in the G2/M phase of cell cycle. Data are mean \pm SD and represent a pool of three independent experiments each including $n = 1$ mouse per group. Unpaired two-tailed Mann–Whitney t tests were performed for all analyses. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 1:

Source data 1. LIS1 is required for T-cell development following the β -selection checkpoint.

Figure supplement 1. LIS1 is required for B-cell development and is effective at single-gene dosage during T-cell development.

Figure supplement 1—source data 1. LIS1 is required for B-cell development and is effective at single-gene dosage during T-cell development.

To directly address this hypothesis, we analyzed the proliferation of DN3 thymocytes upon stimulation with OP9-DI1 cells, a bone marrow-derived stromal cell line that ectopically expresses the Notch ligand, Delta-like 1 (DI1), and which induces efficient T-cell lymphopoiesis from the DN stages to the DP stage (Schmitt *et al.*, 2004). We observed that the percentages of cells that proliferate in response to OP9-DI1 stimulation were strongly decreased in the absence of LIS1 (Figure 2A). This was associated with a failure of DN3 cells to effectively differentiate into CD25-CD44- DN4 cells (Figure 2B). The TCR β chain and the receptor CD5 were upregulated normally after stimulation, indicating that the defect in proliferation was not the consequence of defects in early stimulatory signals required for proliferation and differentiation (Figure 2C). The loss of LIS1 also did not affect the expression of CD71 (Figure 2D) and Bcl-2 (Figure 2E), which depends on Notch and IL-7R signaling, respectively (Akashi *et al.*, 1997; Maraskovsky *et al.*, 1997), suggesting that LIS1 does not operate downstream of these receptors. By contrast, cell cycle analysis showed that the loss of LIS1 led to a strong accumulation of cells at the G2/M stage, indicative of ineffective division processes after the DNA duplication phase (Figure 2F). Together, those results suggest that LIS1 controls cellular events that are required for the efficient division of thymocytes after the β -selection checkpoint.

LIS1 is required for TCR-mediated proliferation in CD4+ T cells

Previous studies suggested that LIS1-deficient CD4+ and CD8+ T cells fail to proliferate in response to cytokine-driven homeostatic signals but successfully divide in response to TCR cross-linking *in vitro* or following infection with a *Listeria monocytogenes* strain expressing ovalbumin (Ngoi *et al.*, 2016). Since the loss of LIS1 had such a strong impact on thymocyte proliferation following pre-TCR stimulation, we decided to compare the role of LIS1 in the proliferation of CD4+ and CD8+ T cells in response to TCR engagement.

To examine the role of LIS1 in peripheral T cells, we conditionally disrupt *Pafah1b1* using a Cre recombinase transgene driven by the *Cd4* promoter, which is upregulated at the DP stage after the proliferation step of DN3-DN4 thymocytes (mouse line referred to hereafter as CD4-Lis1 cKO). We observed that the loss of LIS1 at this stage of development did not affect the percentages and numbers of DN, DP, and SP thymocytes (Figure 3—figure supplement 1A). Normal numbers of mature TCR hi CD24 low SP thymocytes were also generated in the absence of LIS1 (Figure 3—figure supplement 1B). The maturation of DP thymocytes into TCR hi CD4 SP thymocytes occurred also normally in CD4-Lis1 cKO mice expressing a fixed MHC class II-restricted $\alpha\beta$ -TCR transgene (AND), suggesting that LIS1 is not essential for positive selection (Figure 3—figure supplement 1C). As previously reported in a similar conditional knockout model (Ngoi *et al.*, 2016), the deletion of LIS1 led to a dramatic decrease in peripheral CD4+ and CD8+ T cells numbers (Figure 3—figure supplement 1D). This defect was previously imputed to a reduced ability of CD4+ and CD8+ T cells to proliferate in response to cytokine-driven homeostatic signals (Ngoi *et al.*, 2016). In contrast, the

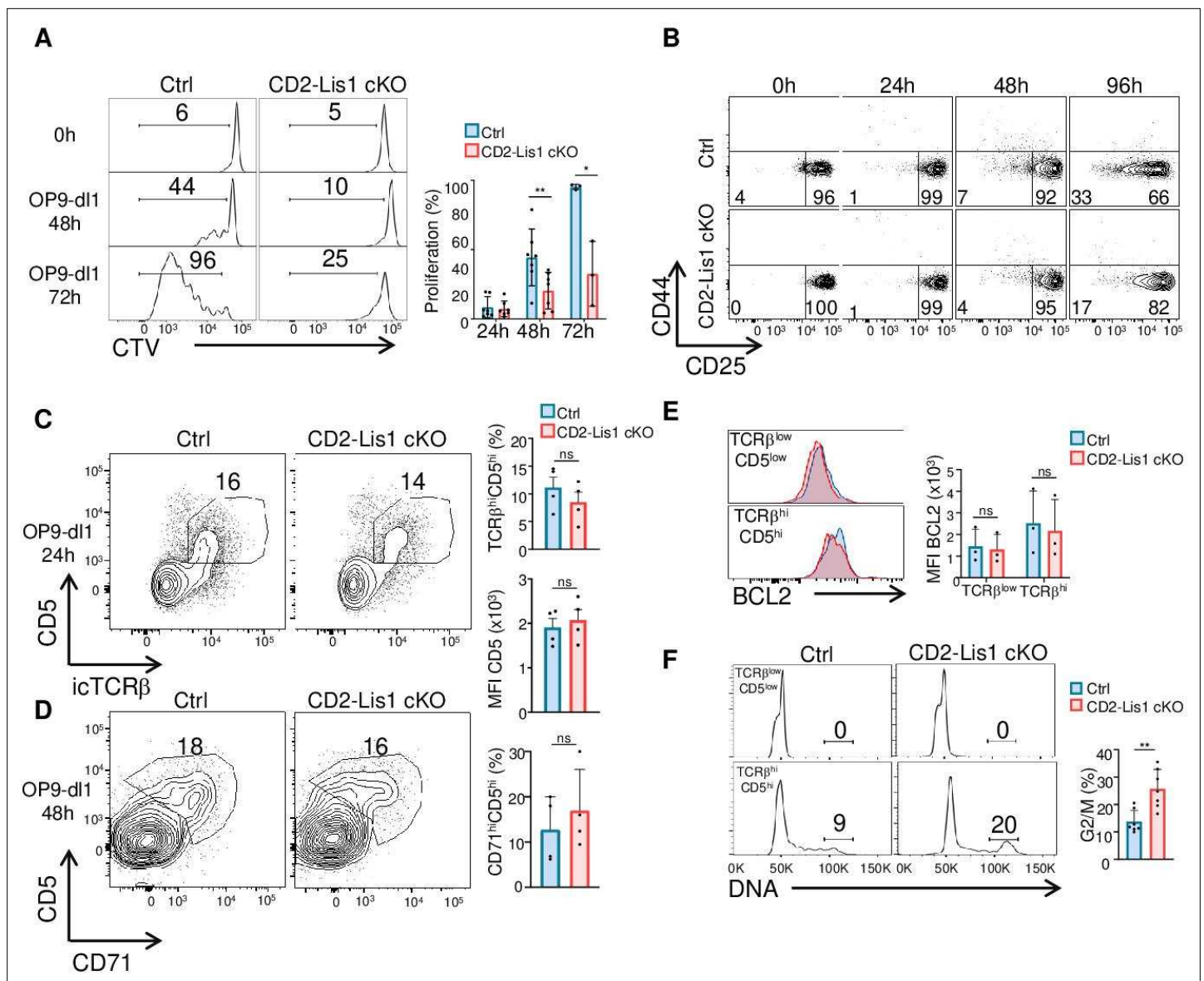


Figure 2. LIS1 is required for the proliferation of immature thymocytes after the β -selection checkpoint. **(A)** $CD5^{\text{lo}}$ DN3 thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice were stained with CellTrace violet (CTV) and stimulated with OP9-DI1 cells for 48 or 72 hr. The histogram graph shows CTV dilution. Bar graphs represent the proliferation of cells determined by flow cytometry at 24, 48, and 72 hr after stimulation. Data are mean \pm SD and represent 3–7 independent experiments each including $n = 1$ –2 pooled mice per group. **(B)** $CD5^{\text{lo}}$ DN3 thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice were stimulated with OP9-DI1 cells for the indicated periods of time. Dot plots show CD44 versus CD25 surface staining on thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice. Data are representative of three independent experiments each including $n = 1$ –2 pooled mouse per group. **(C)** $CD71^{\text{lo}}$ DN3 thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO were stimulated with OP9-DI1 cells for 24 hr. Dot plots show CD5 versus TCR β intracellular staining on thymocytes. Histogram bars represent the percentages of TCR β^{hi} CD5 $^{\text{hi}}$ thymocytes in DN3 thymocytes and the MFI CD5 in DN3 TCR β^{hi} CD5 $^{\text{hi}}$ thymocytes from mice of the indicated genotype. Data are mean \pm SD and represent four independent experiments each including $n = 1$ –2 pooled mice per group. **(D)** $CD71^{\text{lo}}$ DN3 thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice were stimulated with OP9-DI1 cells for 48 hr. Dot plots show CD5 versus CD71 staining on CTV $^{\text{hi}}$ thymocytes. Histogram bars represent the percentages of CD71 $^{\text{hi}}$ CD5 $^{\text{hi}}$ thymocytes in CTV $^{\text{lo}}$ DN3 thymocytes. Data are mean \pm SD and represent four independent experiments each including $n = 1$ –2 pooled mice per group. **(E)** $CD71^{\text{lo}}$ DN3 thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice were stimulated with OP9-DI1 cells for 24 hr. The histogram graph shows BCL-2 intracytoplasmic staining in TCR β^{low} CD5 $^{\text{low}}$ and TCR β^{hi} CD5 $^{\text{hi}}$ thymocyte subsets. Histogram bars represent the MFI of BCL-2 in the indicated DN3 thymocyte subsets. Data are mean \pm SD and represent three independent experiments each including $n = 1$ –2 pooled mice per group. **(F)** $CD71^{\text{lo}}$ DN3 thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice were stimulated with OP9-DI1 cells for 48 hr. Histogram graphs show DNA intracellular staining on thymocytes from the indicated DN3 subsets. The indicated percentages represent cells in the G2/M phase of cell cycle. Histogram bars represent the percentages of DN3 TCR β^{hi} CD5 $^{\text{hi}}$ thymocytes in the G2/M phase of cell cycle. Data are mean \pm SD and represent six independent experiments each including $n = 1$ –2 pooled mice per group. **(A)** Unpaired two-tailed Welch t tests were performed. **(C–E)** Unpaired two-tailed Mann–Whitney t tests were performed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 2 continued on next page

Figure 2 continued

The online version of this article includes the following source data for figure 2:

Source data 1. LIS1 is required for the proliferation of immature thymocytes after the β -selection checkpoint.

mono-allelic deletion of LIS1 in the *Cd4-cre* model (referred to as CD4-Lis1 cKO-het) did not affect the numbers of CD4+ and CD8+ T cells (**Figure 3—figure supplement 1E**), suggesting that reduced LIS1 dosage does not affect T-cell homeostasis.

We next evaluated the effect of LIS1 deficiency on the proliferation of CD4+ and CD8+ T cells following TCR stimulation. We observed that the percentages of proliferating CD4+ T cells were strongly decreased in the absence of LIS1 following TCR stimulation (**Figure 3A**). The analysis of cell percentages in each division cycle showed that LIS1-deficient CD4+ T cells successfully performed the first cycle of division but failed to divide further and accumulated at this stage (**Figure 3A**). Similar results were obtained following stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin, indicating that LIS1-dependent effects on CD4+ T-cell proliferation were not dependent on proximal TCR signaling events (**Figure 3A**). In contrast, monoallelic deletion of the LIS1 encoding gene did not affect the rate of proliferating CD4+ T cells following TCR stimulation (**Figure 3—figure supplement 2A**). Activation markers such as CD25 and CD69 were also upregulated normally in the absence of LIS1, indicating that more distal TCR signaling events were not affected by LIS1 deficiency (**Figure 3B**). Cell-cycle analysis show that CD4+ T cells with duplicated DNA copies accumulated in LIS1-deficient T cells compared with that in control cells following stimulation (**Figure 3C**). Contrasting with the strong effect observed on CD4+ T-cell proliferation, the loss of LIS1 had a rather modest impact on the total fraction of CD8+ T cells that proliferate in response to TCR cross-linking and on the fraction of cells that had successfully divided after the first division cycle (**Figure 3D**). The loss of LIS1 also did not result in the accumulation of CD8+ T cells with duplicated DNA copies (**Figure 3C**). LIS1 was not detected in cell extracts from both CD4+ and CD8+ T cells from CD4-Lis1 cKO mice, indicating that the mild impact of LIS1 on CD8+ T-cell proliferation was not the consequence of the remaining expression of LIS1 in this subset (**Figure 3—figure supplement 2B**). Also, the stimulation of CD8+ T cells with PMA and ionomycin led to an important decrease in the total fraction of proliferating T cells, suggesting that cell divisions in CD8+ T cells are controlled by different mechanisms, which vary according to their LIS1 dependency based on the context of stimulation.

To determine whether LIS1 controls the proliferation of CD4+ T cells in response to antigen stimulation *in vivo*, we crossed CD4-Lis1 cKO mice with transgenic mice expressing the allotypic marker CD45.1 and the class-II restricted OT2 TCR specific for the chicken ovalbumin 323–339 peptide. CD4+ T cells from OT2+CD4-Lis1 cKO and control mice were stained with CellTrace violet (CTV) and injected into C57Bl/6 mice expressing the allotypic marker CD45.2+. Mice were next immunized with ovalbumin and CD45.1+CD4+ T cells were analyzed in the spleen at days 2, 3, and 7 after immunization. The numbers of LIS1-deficient CD45.1+CD4+ T cells in the spleen were similar to those of control cells at day 2 after immunization, indicating that the loss of LIS1 did not affect the ability of CD4+ T cells to migrate into the spleen (**Figure 3E**). At this stage, the percentages of divided cells were very low and were not significantly different according to LIS1 expression. At day 3 after immunization, we observed a large fraction of divided control CD45.1+CD4+ T cells, with the majority of cells having completed more than two rounds of division (**Figure 3E and F**). By contrast, the fraction of divided cells was strongly decreased in the absence of LIS1 with almost a complete failure of those cells to engage more than one division cycle (**Figure 3E and F**). Numbers of LIS1-deficient CD4+CD45.1+ T cells were strongly decreased compared to control CD4+CD45.1+ T cells that express LIS1 (**Figure 3E**). Of note, the expression level of CD44 on undivided CD4+CD45.1+ T cells was similar whether or not LIS1 was expressed, suggesting that LIS1 was not required for CD4+ T-cell activation *in vivo* (**Figure 3F**). The loss of LIS1 also resulted in a marked decrease in the percentages and numbers of CD4+CD45.1+ T cells at day 7 after immunization (**Figure 3—figure supplement 2C**). Together, these results suggest that CD4+ and CD8+ T cells engage distinct cell division mechanisms upon antigen priming that diverge in their requirement for LIS1.

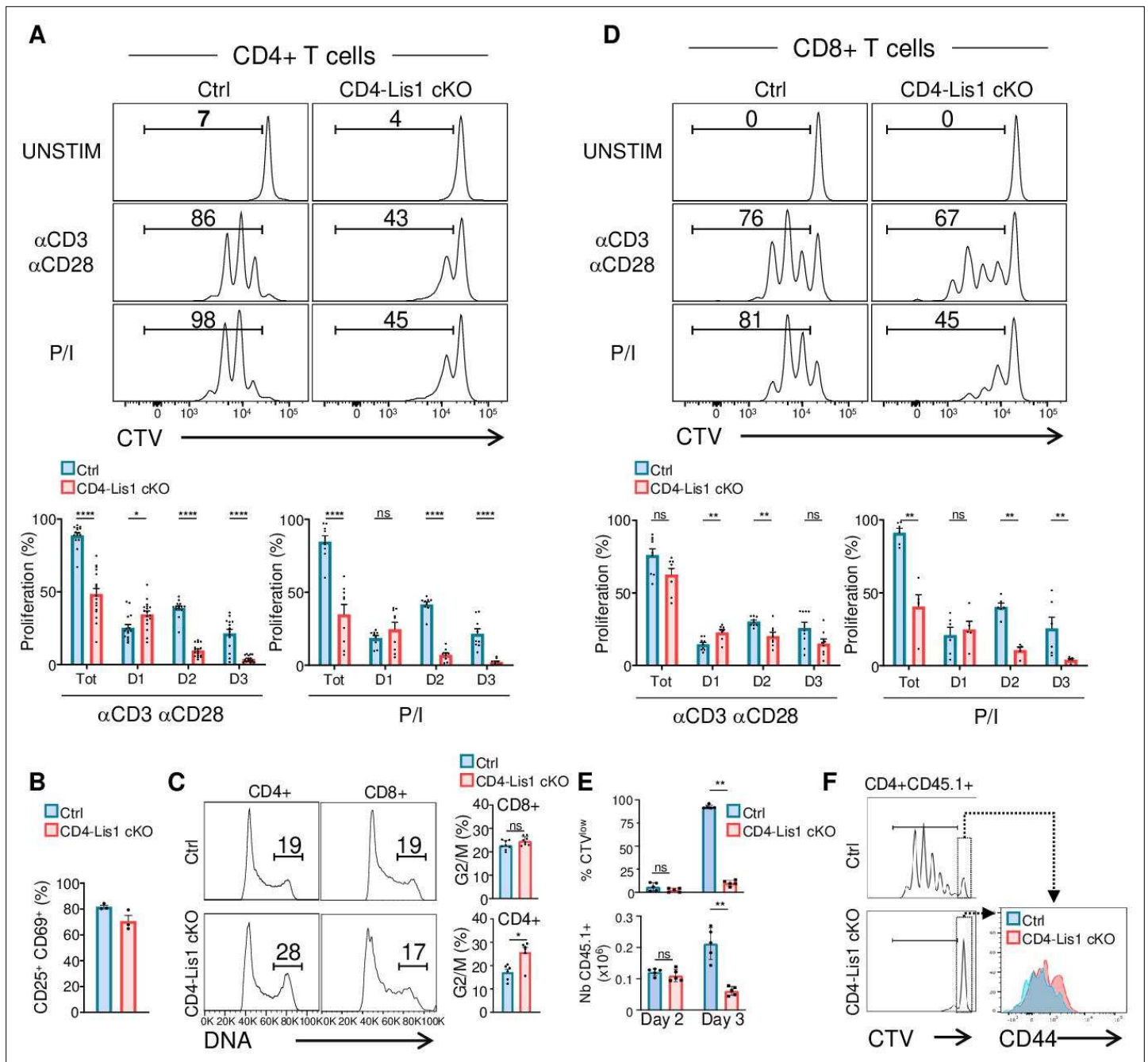


Figure 3. LIS1 is required for the proliferation of CD4⁺ T cells in response to antigen stimulation. **(A)** CD4⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stained with CellTrace violet (CTV) and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin (P/I) for 72 hr. The histogram graphs show CTV dilution. Bar graphs represent the percentages of cells that divided at least one-time (Tot.) or that divided one, two, or three times (D1, D2, D3) as determined by flow cytometry at 72 hr after stimulation. Data are mean ± SD and represent five independent experiments each including n = 3 mice per group. **(B)** CD4⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 24 hr. Bar graphs represent the percentages of cells expressing CD25 and CD69 as determined by flow cytometry. Data are mean ± SD and represent two independent experiments each including n = 1–2 mice per group. **(C)** CD4⁺ and CD8⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hr. Histogram graphs show DNA intracellular staining on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The indicated percentages represent cells in the G2/M phase of cell cycle. Histogram bars represent the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the G2/M phase of cell cycle. Data are mean ± SD and represent two independent experiments each including n = 3 mice per group. **(D)** CD8⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stained with CTV and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or with PMA and ionomycin (P/I) for 72 hr. The histogram graph shows CTV dilution. Bar graphs represent the percentages of cells that divided at least one-time (Tot.) or that divided one, two, or three times (D1, D2, D3) as determined by flow cytometry at 72 hr after stimulation. **(E, F)** C57BL/6j mice (CD45.2⁻) were injected i.v. with

Figure 3 continued

CTV-stained CD45.1⁺CD4⁺ T cells from OT2 and OT2 CD4-Lis1 cKO mice. Mice were then immunized with ovalbumin emulsified in RIBI. Proliferation of CD45.1+CD4+T cells was analyzed at days 2 and 3 after immunization. (E) Bar graphs represent the proliferation and numbers of CD45.1+CD4+T cells as determined by flow cytometry at days 2 and 3 after immunization. Data are mean \pm SD and are representative of one experiment out of two independent experiments each including n = 5 mice per group. (F) The histogram graph shows CTV dilution in CD45.1+CD4+T cells at day 3 after immunization. Histograms overlay shows CD44 surface staining on undivided CD45.1+CD4+T cells at day 3 after immunization. Data are representative of one experiment out of two independent experiments each including n = 5 mice per group. Unpaired two-tailed Mann–Whitney *t* tests were performed for all analyses. **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001; *****p*<0.0001.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 3:

Source data 1. LIS1 is required for the proliferation of CD4+ T cells in response to antigen stimulation.

Figure supplement 1. Normal T-cell development in CD4-Lis1 cKO mice.

Figure supplement 1—source data 1. Normal T-cell development in CD4-Lis1 cKO mice.

Figure supplement 2. Effect of LIS1 haploid and diploid deficiency on CD4+ T-cell proliferation and expansion.

Figure supplement 2—source data 1. Effect of LIS1 haploid and diploid deficiency on CD4+ T-cell proliferation and expansion.

LIS1-dependent control of chromosome alignment during metaphase is required for effective mitosis

We next aimed to more precisely characterize the role of LIS1 during the division of CD4+ T cells. Our data suggest a block either at the G2 or the M phase of cell cycle in LIS1-deficient thymocytes and CD4+ T cells (**Figure 1E**, **Figure 2E**, and **Figure 3C**). We used image stream flow cytometry to discriminate cells with duplicated DNA copies that contain chromosomes (in M phase) from cells that have uncondensed DNA (in G2 phase). CD4-Lis1 cKO and control CD4+ T cells were stimulated for 48 hr with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and stained with DAPI. Analysis was next performed on cells with duplicated DNA copies. The Bright Detail Intensity (BDI) feature on the DAPI channel, which evaluates areas of peak fluorescence intensity after subtraction of background fluorescence, was selected for its ability to automatically discriminate cells in M and G2 phases, as illustrated in **Figure 4A**. The percentages of mitotic CD4+ T cells were increased in the absence of LIS1, suggesting that LIS1-deficient CD4+ T cells fail to complete mitosis. To determine more precisely the stage of mitosis at which this defect occurs, we analyzed whether LIS1 was required for cells to successfully reach metaphase. CD4-Lis1 cKO and control CD4+ T cells were stimulated for 48 hr with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and synchronized with nocodazole for 18 hr prior treatment with MG132 to induce metaphase arrest. The percentages of cells in metaphase were evaluated by image stream flow cytometry using the ‘Elongatedness’ parameter, which calculates the length to width ratios (L/W) on predefined DAPI masks. CD4+ T cells with L/W ratios superior to 1.5 show aligned chromosomes patterns representative of metaphase (**Figure 4B**). This analysis showed that the percentages of cells that successfully reached metaphase were strongly reduced in the absence of LIS1 (**Figure 4B**). To more precisely characterize mitotic events that could be affected by LIS1 deficiency, we next analyzed the course of mitosis in CD4-Lis1 cKO and control CD4+ T cells by time-lapse microscopy. We observed that both CD4-Lis1 cKO and control CD4+ T cells successfully condensed their DNA to form chromosomes (**Figure 4C**, **Videos 1–3**). However, chromosomes remained disorganized in CD4-Lis1 cKO CD4+ T cells and failed to segregate rapidly after condensation compared with those in control cells (**Figure 4C**). At the final step of mitosis, LIS1-deficient CD4+ T cells either failed to divide (**Figure 4C and D**, **Video 2**) or divided with an apparent unequal repartition of chromosomes in daughter cells (**Figure 4C and D**, **Video 3**), which was associated with the formation of multiple nuclei or multilobed nuclei (**Figure 4C**, **Video 2**). Confirming the observations based on time-lapse microscopy, quantitative analysis on G2 cells selected by image stream showed that the percentages of cells with multiple nuclei were strongly increased in the absence of LIS1 (**Figure 4E**).

The abnormal repartition of chromosomes in daughter cells, so called aneuploidy, is generally associated with the upregulation of the tumor suppressor p53, which contributes to eliminate cells through apoptotic processes prior the emergence of possible oncogenic transformation (**Kastenhuber and Lowe, 2017**). To determine whether impaired mitosis associated to LIS1 deficiency leads to apoptosis, we analyzed the percentages of apoptotic cells in undivided and divided peripheral CD4+ T cells following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hr. We observed that the loss of LIS1 was associated with increased frequency of apoptotic cells among divided cells,

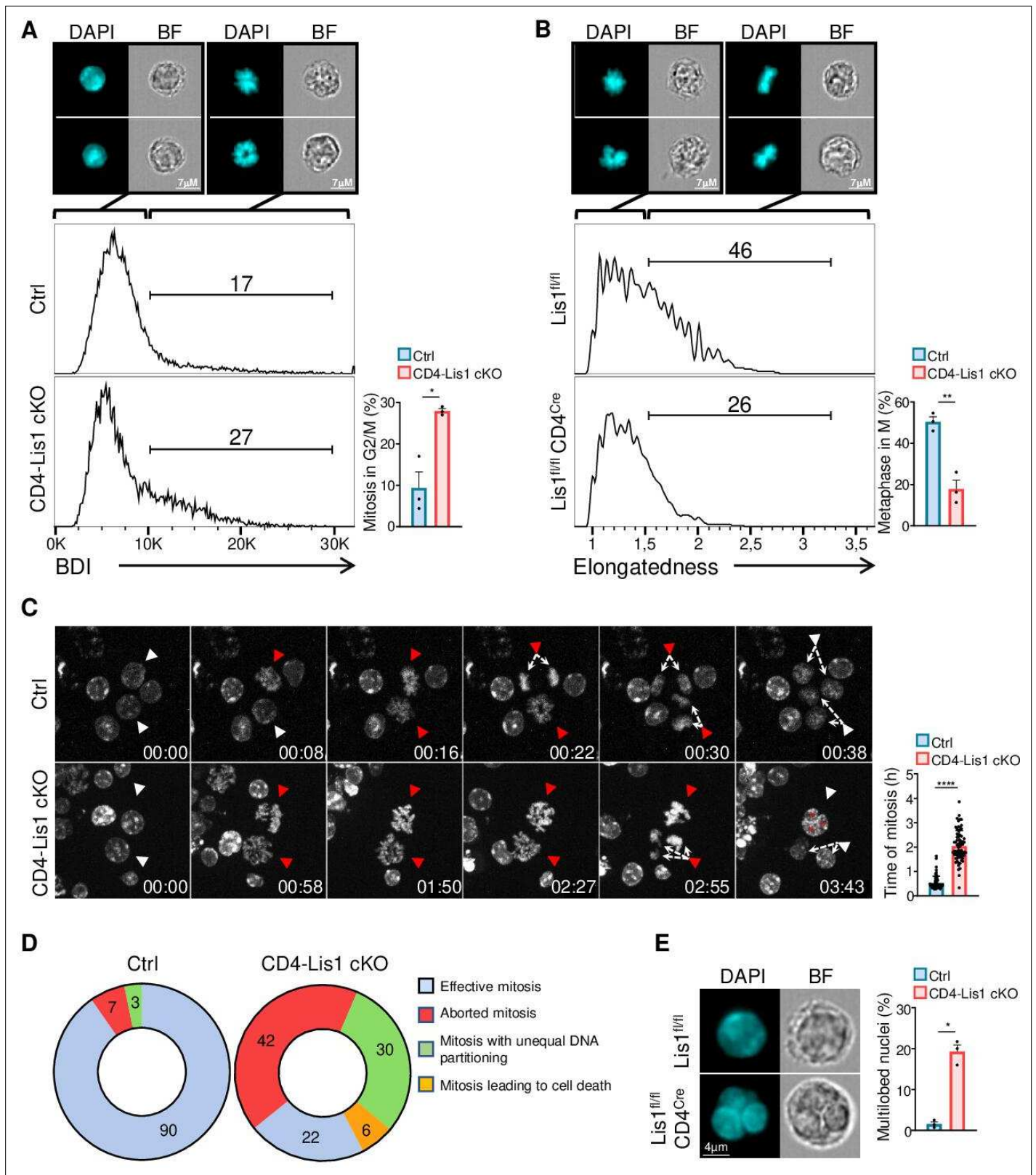


Figure 4. Dysfunctional chromosome alignment in LIS1-deficient CD4⁺ T cells leads to abortive mitosis and aneuploidy. **(A)** CD4⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hr. Histogram graphs represent the *Bright Detail Intensity* (BDI) feature on CD4⁺ T cells in the G2/M phase as determined by image stream flow cytometry. Numbers represent the percentages of cells in mitosis according to the BDI feature. Images represent DAPI staining in BDI^{low} and BDI^{hi} control CD4⁺ T cells. Bar graphs represent the percentages of cells

Figure 4 continued on next page

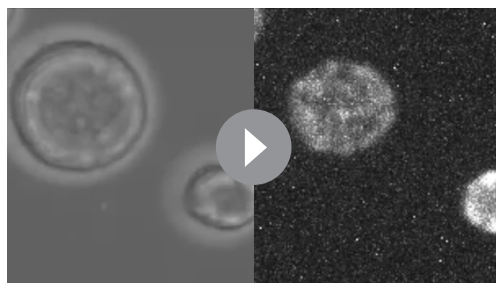
Figure 4 continued

in mitosis (M) out of cells in the G2/M phase ($n = 30,000$ cells). Data are mean \pm SD and represent three independent experiments each including $n = 1$ mouse per group. **(B)** CD4⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 24 hr, synchronized with nocodazole for 18 hr and incubated with MG132 for 3 hr to induce metaphase arrest. Histogram graphs represent the *Elongatedness* feature on CD4⁺ T cells in the M phase as determined by image stream flow cytometry. Numbers represent the percentages of cells in metaphase according to *Elongatedness* feature ($n = 30,000$ cells). Images represent DAPI staining in *Elongatedness*^{low} and *Elongatedness*^{hi} control CD4⁺ T cells. Bar graphs represent the percentages of cells in metaphase out of cells in the M phase. Data are mean \pm SD and represent three independent experiments each including $n = 1$ mouse per group. **(C)** Time-lapse microscopy analysis of cell division in CD4⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Images represent DNA staining on CD4⁺ T cells at the indicated times (hours:minutes). White arrows represent cells with uncondensed DNA. Red arrows represent the same cells after chromosomes formation. The top red arrows in the CD4-Lis1 cKO panel are representative of abortive mitosis. The bottom red arrows in the CD4-Lis1 cKO panel are representative of mitosis leading to aneuploidy. Bar graphs represent the time of mitosis per cell. Data are mean \pm SD and represent three independent experiments each including $n = 1$ mouse per group. **(D)** Mitosis outcomes in control and CD4-Lis1 cKO CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Numbers represent percentages in the different section out of a total of $n = 62$ – 64 mitosis analyzed. Data represent three independent experiments each including $n = 1$ mouse per group. **(E)** CD4⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hr. Cells in G2 phase were analyzed by image stream flow cytometry. Cells stained with DAPI and bright-field (BF) images are represented. Bar graphs represent the percentages of cells with multilobed nuclei ($n = 400$ cells). Data are mean \pm SD and represent three independent experiments each including $n = 1$ mouse per group. **(A, B)** Unpaired two-tailed Welch t tests were performed. **(C)** Unpaired two-tailed Mann–Whitney t test was performed. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

The online version of this article includes the following source data for figure 4:

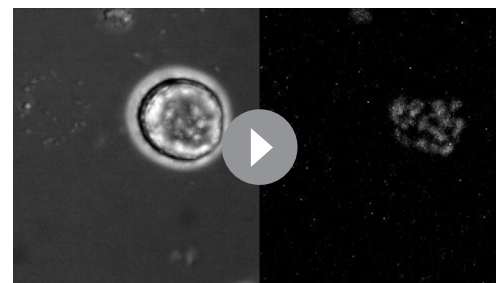
Source data 1. Dysfunctional chromosome alignment in LIS1-deficient CD4⁺ T cells leads to abortive mitosis and aneuploidy.

but had no significant effect on apoptosis in activated CD25⁺ undivided cells (**Figure 5A**). Analysis of p53 expression prior the initial cycle of division at 24 hr showed comparable expression level of p53 between wild-type and LIS1-deficient cells, whereas p53 expression was dramatically increased in LIS1-deficient CD4⁺ T cells compared with that in control cells after the initial division cycles at 48 hr (**Figure 5B**). In comparison, the abundance of p53 after 48 hr of stimulation was comparable in wild-type and LIS1-deficient CD8⁺ T cells, supporting that the loss of LIS1 has a modest impact on cell division in the CD8⁺ lineage (**Figure 5B**). Analysis was next performed on DN3 thymocytes stimulated with OP9-D11 cells and led to a similar increase in apoptosis exclusively in divided thymocytes from LIS1-deficient mice (**Figure 5C**). The expression level of p53 was also strongly increased in total LIS1-deficient DN3 thymocytes compared with that in wild-type DN3 cells (**Figure 5D**). Altogether, those results indicate that the loss of LIS1 results in a defective chromosomes congression and separation during metaphase, which leads to aneuploidy, the upregulation of p53, and the development of apoptotic program.



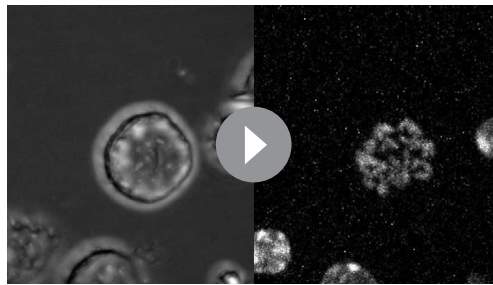
Video 1. Time-lapse microscopy of mitosis in wild-type CD4⁺ T cells. Time-lapse microscopy analysis of mitosis in CD4⁺ T cells from wild-type mice stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Videos represent DNA staining (right panel) and bright field (left panel) on CD4⁺ T cells.

<https://elifesciences.org/articles/80277/figures#video1>



Video 2. Time-lapse microscopy of abortive mitosis in Lis1-deficient CD4⁺ T cells. Time-lapse microscopy analysis of mitosis in CD4⁺ T cells from CD4-Lis1 cKO mice stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Videos represent DNA staining (right panel) and bright field (left panel) on CD4⁺ T cells.

<https://elifesciences.org/articles/80277/figures#video2>



Video 3. Time-lapse microscopy of mitosis with aneuploidy in Lis1-deficient CD4⁺ T cells. Time-lapse microscopy analysis of mitosis in CD4⁺ T cells from CD4-Lis1 cKO mice stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Videos represent DNA staining (right panel) and bright field (left panel) on CD4⁺ T cells. <https://elifesciences.org/articles/80277/figures#video3>

LIS1 controls mitotic spindle and centrosome integrity in CD4⁺ T cells by promoting the formation of dynein–dynactin complexes

Each spindle pole is normally established by one centrosome containing a pair of centrioles embedded in the pericentriolar material (PCM) containing γ -tubulin ring complexes (γ -TuRCs) from which microtubules nucleate. Centrosomes replicate once every cell cycle during the G1-S phase (*Nigg and Stearns, 2011*). Anomaly in centrosomes replication and PCM fragmentation may lead to the formation of extra-centrosomes that can be associated to the formation of multipolar spindles and to the unequal repartition of chromosomes (*Holland and Cleveland, 2009; Maiato and Logarinho, 2014*). Previous studies in embryonic fibroblast show that the loss of LIS1

is associated with the formation of multipolar spindle due to the formation of extra-centrosomes (*Moon et al., 2014*). However, this defect is not systematically observed in the absence of LIS1. For instance, the loss of LIS1 in hematopoietic stem cells has a moderate effect on the integrity of the mitotic spindle but rather affects the spindle positioning during telophase, leading to increased rate of asymmetric divisions (*Zimdahl et al., 2014*).

To evaluate whether the loss of LIS1 could be associated with an aberrant number of centrosomes or a loss of centrosome integrity prior the division of CD4⁺ T cells, we stimulated CTV-stained CD4⁺ T cells from CD4-Lis1 cKO and control mice with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hr and FACS-sorted undivided CTV^{hi} cells based on the forward-size-scattered parameter to discriminate unactivated (forward-scatter [FSC]^{lo}) from activated (FSC^{hi}) cells. Cells were analyzed by confocal microscopy after γ -tubulin and DAPI staining. In the presence of LIS1, we observed that the vast majority of FSC^{lo} CD4⁺ T cells contained a single centrosome, whereas the majority FSC^{hi} cells had two centrosomes as expected from cells in mitosis (*Figure 6A*). In the absence of LIS1, more than 50% of mitotic FSC^{hi} CD4⁺ T cells had more than two centrosomes (*Figure 6A*). The loss of LIS1 did not affect centrosome copy numbers in unactivated CD4⁺ T cells (*Figure 6A*), indicating that LIS1 is engaged following TCR stimulation once the cell cycle has started, possibly at the stage of centrosome duplication. Some extra-centrosomes showed reduced accumulation of γ -tubulin compared with normal centrosomes in wild-type cells, suggesting that the loss of LIS1 leads to PCM fragmentation or to the loss of centrosome integrity rather than centrosome supernumerary duplication (*Figure 6B*). Analysis of γ - and α -tubulin stainings in LIS1-deficient CD4⁺ T cells show that these extra-centrosomes were ‘active’ in that they could effectively nucleate microtubule fibers (*Figure 6B*). Multiple centrosomes were also observed in cells-sorted post- β -selection DN3 thymocytes (*Figure 6C*). Together, these results indicate that LIS1 is required for the formation of stable bipolar mitotic spindles upon division of thymocytes and CD4⁺T cells.

The biochemical basis by which LIS1 affects dynein function has been the focus of intense investigations yielding contradictory findings and divergent models (*Markus et al., 2020*). Evidence from early studies suggests that LIS1 might be acting as a ‘clutch’ that would prevent dynein’s ATPase domain from transmitting a detachment signal to its track-binding domain (*Huang et al., 2012*). More recent in vitro investigations with recombinant proteins identify critical function for LIS1 in the assembly of active dynein–dynactin complexes (*Htet et al., 2020; Elshenawy et al., 2020*). To analyze whether the cellular defect observed in LIS1-deficient CD4⁺ T cells could be associated with defect in dynein–dynactin complex assembly, we compared the amount of p150Glued, a subunit of the dynactin complex, that co-immunoprecipitated with the intermediate chain of dynein (DIC) in CD4⁺ T cells isolated from CD4-Lis1 cKO and control mice (*Reck-Peterson et al., 2018*). The amount of p150Glued that co-immunoprecipitated with DIC was decreased in LIS1-deficient cells compared with wild-type controls (*Figure 6D*). Similar amount of the dynein heavy chain (DHC) was co-immunoprecipitated with the DIC in LIS1-deficient and wild-type cells (*Figure 6D*), indicating that the defect in

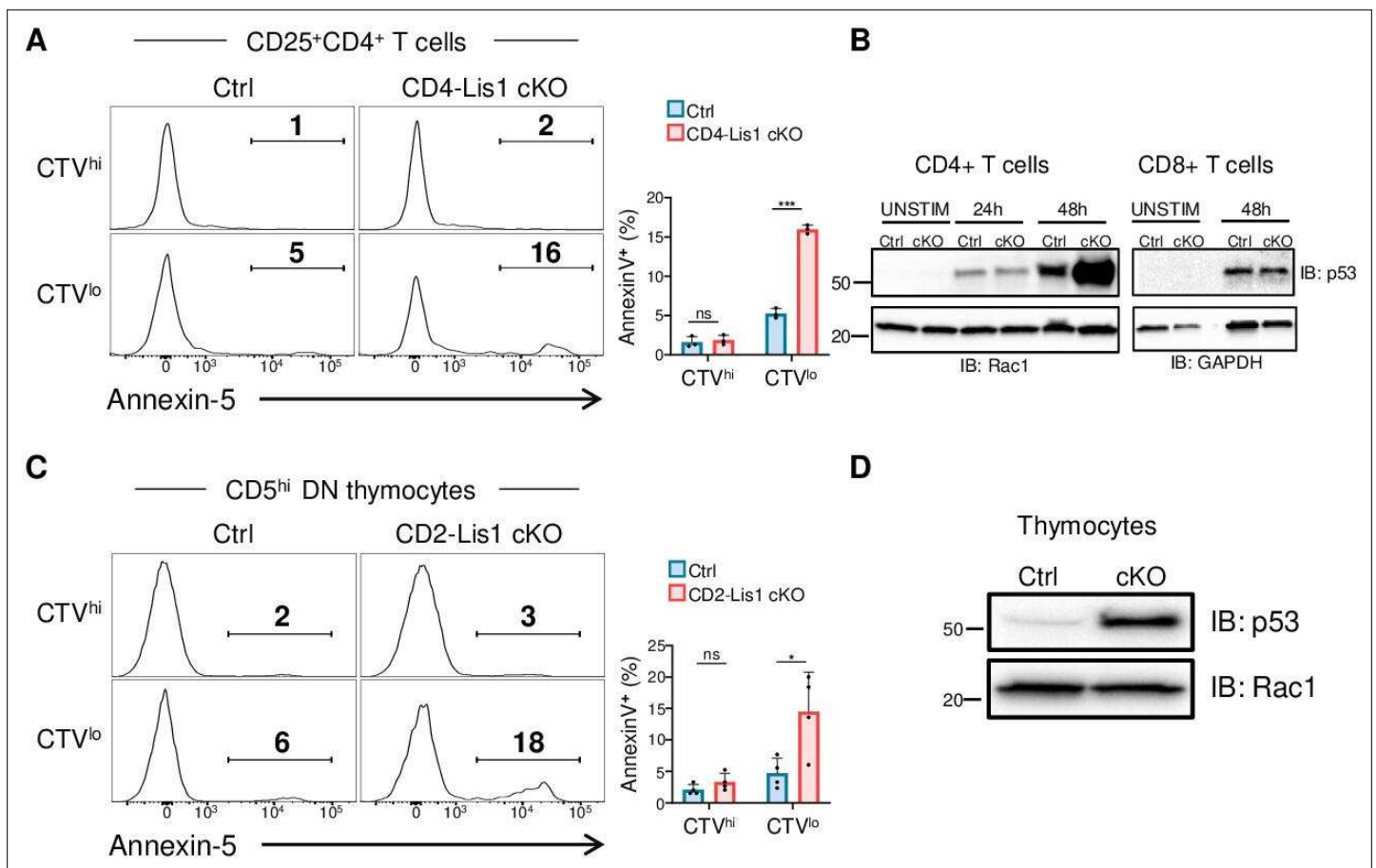


Figure 5. Proliferation leads to p53 upregulation and apoptosis in LIS1-deficient thymocytes and CD4⁺ T cells. **(A)** CD4⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stained with CellTrace violet (CTV) and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hr. The histogram graphs show annexin-5 staining on CTV^{hi} (top panel) and CTV^{lo} (bottom panel) CD25⁺CD4⁺ T cells. Bar graphs represent the percentages of annexin5⁺ cells in the indicated subsets. Data are mean ± SD and represent two independent experiments each including n = 1–2 mice per group. **(B)** Total CD4⁺ and CD8⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for the indicated times. Total cytoplasmic extracts of the cells were then analyzed by Western blotting with antibodies against p53, Rac1, and GAPDH, the loading controls. Data are representative of two independent experiments. **(C)** CD5^{hi} DN3 thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice were stained with CTV and stimulated with OP9-D11 cells for 48 hr. The histogram graphs show annexin-5 staining on CTV^{hi} (top panel) and CTV^{lo} (bottom panel) CD5^{hi}CD4⁺ T cells. Bar graphs represent the percentages of annexin5⁺ cells in the indicated subsets. Data are mean ± SD and represent two independent experiments each including n = 2 mice per group. **(D)** Total cytoplasmic extracts of the DN thymocytes were analyzed by Western blotting with antibodies against p53 and Rac1, the loading control. Data are representative of two independent experiments. Unpaired two-tailed Welch *t* tests were performed in **(A, C)**. **p*<0.05; ****p*<0.001.

The online version of this article includes the following source data for figure 5:

Source data 1. Proliferation leads to p53 upregulation and apoptosis in LIS1-deficient thymocytes and CD4⁺ T cells.

DIC-p150Glued interaction was not due do ineffective assembly of the dynein complex itself. These results suggest that LIS1 controls the integrity of mitotic spindle pole assembly in peripheral CD4⁺ T cells by stabilizing the association between dynein and dynactin complexes.

Discussion

In this study, we identified a selective LIS1 requirement for mitosis in thymocytes and peripheral CD4⁺ T cells following β -selection and antigen priming, respectively. LIS1-dependent proliferation defects resulted in a block of early T-cell development and in a nearly complete lack of CD4⁺ T-cell expansion following activation. LIS1 deficiency in thymocytes and CD4⁺ T cells led to a disruption of dynein–dynactin complexes, which was associated with a loss of centrosome integrity and with the formation of multipolar spindles. These mitotic abnormalities were in turn associated to abnormal chromosomes

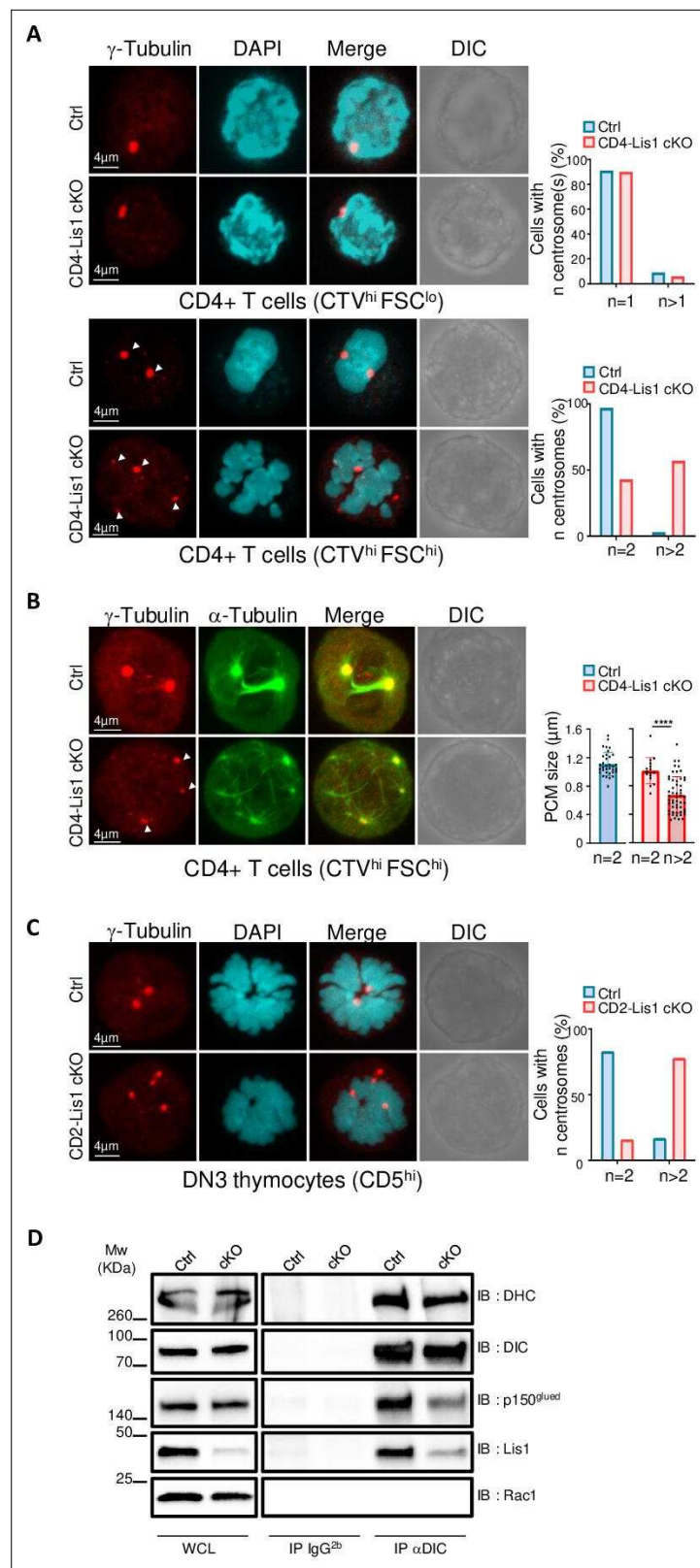


Figure 6. Impaired formation of dynein/dynactin complexes is associated with the loss of centrosome integrity and the formation of multipolar spindles in LIS-1-deficient thymocytes and CD4⁺ T cells. (A) CD4⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stained with CellTrace violet (CTV) and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hr. Images represent maximum intensity projection of γ -tubulin and DAPI staining on undivided cells. (B) CD4⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stained with γ -tubulin (red) and α -tubulin (green) and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hr. Images represent maximum intensity projection of γ -tubulin and α -tubulin staining on undivided cells. (C) DN3 thymocytes from control and CD2-Lis1 cKO mice were stained with γ -tubulin (red) and DAPI (cyan) and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hr. Images represent maximum intensity projection of γ -tubulin and DAPI staining on undivided cells. (D) Western blot analysis of DHC, DIC, p150^{glued}, Lis1, and Rac1 in whole cell lysates (WCL) and immunoprecipitates (IP) from control and CD4-Lis1 cKO mice. IP was performed with IgG^{2b} or α DIC. Molecular weight (Mw) is indicated in kDa. ****p < 0.0001. Figure 6 continued on next page

Figure 6 continued

FSC^{lo} (top panel) and FSC^{hi} (bottom panel) CD4⁺ T cells. Bar graphs represent the percentages of cells with the indicated number of centrosome in total cells (top graph) or in mitotic cells (bottom graph). Data represent one experiment out of two independent experiments with $n = 30\text{--}50$ cells analyzed per group. **(B)** CD4⁺ T cells from control and CD4-Lis1 cKO mice were stained with CTV and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hr. Images represent maximum intensity projection of γ -tubulin and α -tubulin staining on undivided FSC^{hi} CD4⁺ T cells. Bar graphs represent the size of the pericentriolar region (PCM) based on γ -tubulin staining in mitotic cells with the indicated number of centrosomes. Data represent three experiments with $n = 16\text{--}54$ centrosomes analyzed per group. **(C)** Images represent maximum intensity projection of γ -tubulin and DAPI staining CD5^{hi} DN3 thymocytes. Bar graphs represent the percentages of cells with the indicated number of centrosomes in mitotic cells. Data represent one experiment out of two independent experiments with $n = 30\text{--}50$ cells analyzed per group. **(D)** CD4⁺ T cell extracts from control and CD4-Lis1 cKO mice were subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies specific of the intermediate chain of dynein (DIC) or with an IgG2b isotype control and then analyzed by Western blotting with antibodies specific of the indicated proteins (dynein heavy chain [DHC]). Data represent one experiment out of two independent experiments. Unpaired two-tailed Mann-Whitney t test was performed. **** $p < 0.0001$.

The online version of this article includes the following source data for figure 6:

Source data 1. Impaired formation of dynein/dynactin complexes is associated with the loss of centrosome integrity and the formation of multipolar spindles in LIS-1 deficient thymocytes and CD4⁺ T cells.

reorganization during metaphase and telophase and to aneuploidy and p53 upregulation upon cell division. Importantly, whereas LIS1 deficiency led to a strong block of CD8⁺ T-cell proliferation upon PMA and ionomycin stimulation, it had a very little effect, if any, on the proliferation of CD8⁺ T cells following TCR engagement, suggesting that the mitotic machinery that orchestrates mitosis in CD8⁺ T cells upon TCR stimulation is different from that engaged in thymocytes and peripheral CD4⁺ T cells upon pre-TCR and TCR engagement.

LIS1 was shown to be dispensable for the proliferation of antigen-specific CD8⁺ T cell following infection with *L. monocytogenes* (Ngoi et al., 2016), supporting the data that we report here in CD8⁺ T cells following TCR stimulation. Comparable cell type-specific effects of LIS1 on proliferation have been described at early stages of neurogenesis and hematopoiesis (Yingling et al., 2008; Zimdahl et al., 2014). The loss of LIS1 in neuroepithelial stem cells leads to mitotic arrest and apoptosis upon symmetrical division events associated to progenitor cell maintenance, whereas it has only a moderate effect on asymmetrical division associated with neurogenesis, suggesting that symmetric division might be more LIS1-sensitive than asymmetric division (Yingling et al., 2008). Accordingly, LIS1 deficiency leads to a dramatic decrease in proliferation when CD8⁺ T cells are stimulated with soluble ligands such as cytokines and PMA/ionomycin, which favor symmetric division (Ngoi et al., 2016). This suggests that the different sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to LIS1 deficiency upon cell division is not simply the consequence of a preferential use of LIS1 in CD4⁺ T cells but rather the consequence of different mitotic organizations in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the context of polarized cell stimulations, which might exhibit different requirement for LIS1. This raises the question of whether CD4⁺ T cells would be more prone to symmetric divisions than CD8⁺ T cells. Theoretically, the experimental settings that we used in this study might not be optimal for eliciting asymmetric cell division since we stimulated T cells with anti-CD3 and anti-CD28 in the absence of ICAM-1, which is required for asymmetric cell divisions to occur in the context of APC stimulation (Chang et al., 2007). However, the rate of asymmetric cell divisions might be less influenced by ICAM-1 stimulation in conditions where plate-bound stimulations with antibodies are used (Jung et al., 2014). Asymmetric cell divisions have been detected in CD4⁺ T cells after the first antigen encounter (Chang et al., 2007), but it is unknown whether these divisions occur systematically or whether they occur with variable frequencies that could be context-dependent. It is also unclear whether CD4⁺ and CD8⁺ T cells have similar rates of asymmetric division since the literature lacks quantitative studies in which cellular events associated with mitosis would be investigated side-by-side in those two subsets. The repartition of the transcription factor T-bet in daughter cells was compared in one study by flow cytometry in CD4⁺ and CD8⁺ T cells after a first round of cell division (Chang et al., 2011). The authors showed that T-bet segregates unequally in daughter cells in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. However, the disparity of T-bet between daughter cells was higher in CD8⁺ T cells compared with that in CD4⁺ T cells (five- versus threefold), suggesting that cell-fate determinants are either more equally

(or less unequally) distributed in daughter cells from the CD4⁺ lineage or that the rate of symmetric divisions is higher in CD4⁺ T cells than in the CD8⁺ T cells. More extensive analysis would be required to precisely quantify the rate of symmetric and asymmetric cell divisions in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the context of APC stimulation.

Mechanistically, we show that LIS1 is important in CD4⁺ T cells to stabilize the interaction of the microtubule-associated motor protein dynein with the dynactin complex, which facilitates the binding of dynein to cargos and promotes thereby their transport along microtubule fibers. This is in agreement with recent *in vitro* studies showing that LIS1 is required for the efficient assembly of active dynein–dynactin complexes (Htet *et al.*, 2020; Elshenawy *et al.*, 2020). Given the pleiotropic role of the dynein–dynactin complexes during mitosis, several scenarios could possibly explain the defect of proliferation observed in thymocytes and peripheral CD4⁺ T cells. Two nonexclusive scenarios seem the most likely to us. A first scenario is that the loss of LIS1 leads to an inefficient attachment of the chromosome kinetochores to dynein, leading to metaphase delay and possibly asynchronous chromatid separation, a phenomenon called ‘cohesion fatigue,’ which leads to centriole separation and the formation of multipolar spindles (Daum *et al.*, 2011). This possibility is supported by studies showing that LIS1 is localized to the kinetochores in fibroblasts and is required for the normal alignment of chromosomes during metaphases (Moon *et al.*, 2014; Faulkner *et al.*, 2000) and for targeting the dynein complex to kinetochore (Moon *et al.*, 2014). A second possibility is that the absence of LIS1 leads to the fragmentation of the PCM, which is associated with the formation of multipolar spindles and the erroneous merotelic kinetochore-microtubule attachments (a single kinetochore attached to microtubules oriented to more than one spindle pole), which can cause chromosomal instability in cells that ultimately undergo bipolar division (Cimini *et al.*, 2001). This is supported by the fact that several PCM components are transported toward centrosomes along microtubules by the dynein–dynactin motor complex (Bärenz *et al.*, 2011; Dammermann and Merdes, 2002) and that the depletion of multiple pericentriolar proteins results in PCM fragmentation, which subsequently generates multipolar spindles (Dammermann and Merdes, 2002; Krauss *et al.*, 2008; Kim and Rhee, 2011).

We previously identified LIS1 as a binding partner of the signaling protein THEMIS in thymocytes and confirmed this interaction through yeast two-hybrid approaches (Zvezdova *et al.*, 2016; Garreau *et al.*, 2017). THEMIS enhances positive selection in thymocytes (Fu *et al.*, 2009; Lesourne *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009) and is important for the maintenance of peripheral CD8⁺ T cells by stimulating cytokine-driven signals leading to homeostatic proliferation (Brzostek *et al.*, 2020). Although LIS1 deficiency does not modulate the efficiency of thymocyte-positive selection, the loss of LIS1 is associated with a strong defect of peripheral T-cell proliferation in response to IL-2 and IL-15 stimulation (Ngoi *et al.*, 2016). THEMIS and LIS1 deficiencies both lead to severely compromised CD8⁺ T-cell proliferation following transfer in lymphopenic hosts (Ngoi *et al.*, 2016; Brzostek *et al.*, 2020). Although this defect was attributed to stimulatory function of THEMIS on IL-2- and IL-15-mediated signaling, we cannot rule out the possibility that THEMIS would play a more direct role in cell cycle by controlling LIS1-mediated events. THEMIS operates by repressing the tyrosine phosphatase activity of SHP-1 and SHP-2, which are key regulatory proteins of TCR signaling (Choi *et al.*, 2017). Gain-of-function mutations of SHP-2 in mouse embryonic fibroblast and leukemia cells lead to centrosome amplification and aberrant mitosis with misaligned chromosomes (Liu *et al.*, 2016). Thus, the hyper activation of SHP-2 resulting from THEMIS deficiency may lead to cellular defects similar to those observed in LIS1-deficient T cells. An interesting perspective to this work would be to investigate further whether the loss of THEMIS in CD8⁺ T cells would lead to similar mitotic defects to those observed in LIS1-deficient thymocytes and CD4⁺ T cells upon TCR stimulation.

The fact that LIS1 deficiency increases the frequency of aneuploidy and leads to the upregulation of p53 expression suggests that defects affecting LIS1 expression or function could favor oncogenic transformation in lymphoid cells. LIS1 is necessary for the extensive growth of tumor cells in some cancer models. The genetic disruption of LIS1 in hematopoietic stem cells blocks the propagation of myeloid leukemia (Zimdahl *et al.*, 2014). However, several evidence suggests also that the alteration of LIS1 expression could contribute to the carcinogenesis of several cancers such as hepatocellular carcinoma (Li *et al.*, 2018; Xing *et al.*, 2011), neuroblastoma (Messi *et al.*, 2008), glioma (Suzuki *et al.*, 2007), and cholangiocarcinoma (Yang *et al.*, 2014). Thus, although a minimal expression level of LIS1 might be mandatory for extensive tumor growth, partial deficiencies in LIS1 might favor oncogenic transformation. Although monoallelic deficiency of LIS1 did not detectably affect CD4⁺ T-cell

proliferation in vitro, the partial loss of LIS1 function may enhance the risk of aneuploidy-driven cancer in a tumor-suppressor-failing context. This could be relevant in humans since genetic variants on *Pafah1b1* have been associated with a higher risk of developing acute myeloid leukemia (Cao et al., 2017).

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Genetic reagent (<i>Mus musculus</i>)	129S-Pafah1b1 ^{tm2Awb} /J	Jackson Laboratories	Strain #:008002; RRID:IMSR_ JAX:008002	This stain was provided by Dr. Deanna S. Smith (University of South Carolina, Columbia, USA)
Genetic reagent (<i>Mus. musculus</i>)	B6.Cg-Tg(CD2-icre)4Kio/J	Jackson Laboratories	Strain #:008520; RRID:IMSR_ JAX:008520	
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	Tg(Cd4-cre)1Cwi/BfluJ	Jackson Laboratories	Strain #:017336; RRID:IMSR_ JAX:017336	
Cell line (<i>M. musculus</i>)	OP9-dl1	Schmitt et al., 2004		Provided by Dr. Sophie Laffont Pradines (Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases, Toulouse France)
Antibody	Anti-CD3ε (hamster monoclonal)	BioLegend	Clone 2C-11	Purified unconjugated
Antibody	Anti-CD28 (hamster monoclonal)	BioLegend	Clone 37.51	Purified unconjugated
Antibody	Anti-CD8α (rat monoclonal)	Thermo Fisher Scientific	Clone 53-6.7	Conjugated to A-700 (1/300)
Antibody	Anti-CD4 (rat monoclonal)	BD Biosciences	Clone RM4-5	Conjugated to Pacific Blue (1/1000)
Antibody	Anti-CD24 (rat monoclonal)	BioLegend	Clone M1/69	Conjugated to PE (1/500)
Antibody	Anti-TCRβ (hamster monoclonal)	BD Biosciences	Clone H57-597	Conjugated to FITC (1/400)
Antibody	Anti-TCRβ (hamster monoclonal)	Thermo Fisher Scientific	Clone H57-597	Conjugated to PECy7 (1/1500)
Antibody	Anti-Vα11 (rat monoclonal)	BD Biosciences	Clone RR8-1	Conjugated to FITC (1/400)
AntibodyA	Anti-CD5 (rat monoclonal)	BD Biosciences	Clone 53-7.3	Conjugated to APC (1/1000)
Antibody	Anti-CD5 (rat monoclonal)	Thermo Fisher Scientific	Clone 53-7.3	Conjugated to FITC (1/1000)
Antibody	Anti-CD69 (hamster monoclonal)	BD Biosciences	Clone H1.2F3	Conjugated to FITC (1/200)
Antibody	Anti-B220 (rat monoclonal)	BD Biosciences	Clone RA3-6B2	Conjugated to PE (1/400)
Antibody	Anti-Gr1 (rat monoclonal)	BioLegend	Clone RB6-8C5	Conjugated to PE (1/300)

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	Anti-CD11b (rat monoclonal)	BioLegend	Clone M1/70	Conjugated to PE (1/200)
Antibody	Anti-CD11c (hamster monoclonal)	BioLegend	Clone N418	Conjugated to PE (1/200)
Antibody	Anti-Ter119 (rat monoclonal)	BioLegend	Clone TER119	Conjugated to PE (1/200)
Antibody	Anti-CD3ε (hamster monoclonal)	BioLegend	Clone 145-2C11	Conjugated to PE (1/200)
Antibody	Anti-NK1.1 (mouse monoclonal)	BD Biosciences	Clone PK136	Conjugated to PE (1/200)
Antibody	Anti-TCRγδ (hamster monoclonal)	BD Biosciences	Clone GL3	Conjugated to (1/200)
Antibody	Anti-CD44 (rat monoclonal)	Thermo Fisher Scientific	Clone IM7	Conjugated to FITC (1/200)
Antibody	Anti-CD25 (rat monoclonal)	BD Biosciences	Clone PC61.5	Conjugated to PercP Cy5.5 (1/300)
Antibody	Anti-CD71 (rat monoclonal)	BioLegend	Clone R17217	Conjugated to PeCy7 (1/400)
Antibody	Anti-CD27 (hamster monoclonal)	BD Biosciences	Clone LG.3A10	Conjugated to APC (1/200)
Antibody	Anti-IL-7R (rat monoclonal)	BD Biosciences	Clone A7R34	Conjugated to A700 (1/500)
Antibody	Anti-IL-7R (rat monoclonal)	BD Biosciences	Clone A7R34	Conjugated to APC (1/400)
Antibody	Anti-BCL-2 (hamster monoclonal)	BD Biosciences	Clone 3F11	Conjugated to FITC (5 μL/10 ⁵ cells)
Antibody	Anti-CD19 (rat monoclonal)	BioLegend	Clone 1D3/CD19	Conjugated to PercPCY5.5 (1/500)
Antibody	Anti-c-kit (rat monoclonal)	BioLegend	Clone 2B8	Conjugated to PE (1/200)
Antibody	Anti-c-kit (rat monoclonal)	BD Biosciences	Clone 2B8	Conjugated to APC (1/200)
Antibody	Anti-IgM (rat monoclonal)	BD Biosciences	Clone RMM-1	Conjugated to PECy7 (1/300)
Antibody	Anti-CD45.1 (mouse monoclonal)	BD Biosciences	Clone A20	Conjugated to PE (1/500)

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	Anti- γ -tubulin (mouse monoclonal)	BioLegend	Clone 14C11	Purified unconjugated
Antibody	Anti- α -tubulin (mouse monoclonal)	Thermo Fisher Scientific	Clone DM1A	Purified unconjugated
Antibody	Goat anti-mouse IgG2b	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-21147	Alexa Fluor 555
Antibody	Anti-Dynein IC (mouse monoclonal)	Santa Cruz Biotechnologies	Clone 74-1	Purified unconjugated
Antibody	Anti-LIS1 (rabbit polyclonal)	Santa Cruz Biotechnologies	sc-15319	Purified unconjugated
Antibody	Anti-Dynein HC (rabbit polyclonal)	Santa Cruz Biotechnologies	sc-9115	Purified unconjugated
Antibody	Anti-p150glued (mouse monoclonal)	BD Biosciences	Clone 1/p150Glued	Purified unconjugated
Antibody	Anti-p53 (mouse monoclonal)	Cell Signaling	Clone 1C12	Purified unconjugated
Antibody	Anti-Rac1 (mouse monoclonal)	Millipore	Clone 23A8	Purified unconjugated
Other	AnnexinV	BD Biosciences	RRID:AB_2868885	APC (5 μ L/10 ⁵ cells)
Other	AnnexinV binding buffer	BD Biosciences	Cat#556454	Used for annexinV staining
Other	eBioscience Fixable Viability Dye	Thermo Fisher Scientific	Cat#65-0865-14	eFluor 780 APC-H7
Other	Permeabilization buffer	Thermo Fisher Scientific	Cat#00-8333-56	Used for intracytoplasmic staining
Other	Chambered glass coverslip	IBIDI	Cat#80821	Used for videomicroscopy analyses
Other	Dynabeads Untouched Mouse CD4 Cells Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat#11415D	Magnetic beads used for the purification of CD4-CD8- thymocytes as well as CD4+ and CD8+ T cells
Other	DAPI	Sigma-Aldrich	Cat#D9542	1 mg/mL Nuclear staining for microscopy
Other	Hoechst 33342	Sigma-Aldrich	Cat#14533	50 ng/mL Nuclear staining for videomicroscopy
Other	Cell trace Violet	Thermo Fisher Scientific	Cat#C34557	2 μ M Cell tracker used for proliferation analyses
Other	DABCO	Sigma-Aldrich	Cat#D27802	Mounting medium for microscopy
Other	Mouse IL-7	PeproTech	Cat#21--17	10 ng/mL
Chemical compound, drug	Nocodazole	Sigma-Aldrich	Cat#M1404	100 ng/mL Inhibitor of microtubule polymerization
Chemical compound, drug	MG132	Sigma-Aldrich	Cat#M7449	10 μ M proteasome inhibitor
Chemical compound, drug	Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich	Cat#P8139	100 ng/ml T-cell pharmacological stimulator
Chemical compound, drug	Ionomycin	Sigma-Aldrich	Cat#I0634	100 ng/ml T-cell pharmacological stimulator
Chemical compound, drug	RIBI	Sigma Adjuvant System	Cat#S6322	Adjuvant
Software, algorithm	IDEAS	Millipore		

Mice

Pafah1b1^{flox/flox} mice were described previously (*Hirotsune et al., 1998*). These mice were bred with *Cd2-cre* transgenic mice (<https://www.jax.org/strain/008520>) in which the human *cd2* promoter directs the expression of the CRE recombinase at early stages of T- and B-cell development. *Pafah1b1^{flox/flox}* mice were also bred with *Cd4-Cre* transgenic mice (<https://www.jax.org/strain/017336>) in which the *cd4* promoter directs the expression of the CRE recombinase during T-cell development in CD4+CD8+ thymocytes. AND and OT-2 TCR-transgenic mice were from Taconic Farms. All the experiments were conducted with sex and age-matched mice between 6 and 12 weeks old housed under specific pathogen-free conditions at the INSERM animal facility (US-006; accreditation number A-31 55508 delivered by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice). All experimental protocols were approved by a ministry-approved ethics committee (CEEA-122) and follow the French and European regulations on care and protection of the Laboratory Animals (EC Directive 2010/63).

Antibodies

The following antibodies were used.

For stimulation and cell culture: anti-CD3 ϵ (145-2C11) and anti-CD28 (37.51) antibodies were from BioLegend. *For cell sorting and flow cytometry analysis:* anti-CD8 α (clone 53-6.7), anti-CD4 (clone RM4-5), anti-CD24 (clone M1/69), anti-TCR β (clone H57-597), anti-V α 11 (clone RR8-1), anti-CD5 (clone 53-7.3), anti-CD69 (clone H1.2F3), anti-B220 (clone RA3-6B2), anti-Gr1 (clone RB6-8C5), anti-CD11b (clone M1/70), anti-CD27 (clone LG.3A10), anti-CD11c (clone N418), anti-Ter119 (clone TER119), anti-CD3 (clone 145-2C11), anti-NK1.1 (clone PK136), anti-TCR $\gamma\delta$ (clone GL3), anti-CD44 (clone IM7), anti-CD25 (clone PC61.5), anti-CD71 (clone R17217), anti-IL-7R (clone A7R34), anti-BCL-2 (clone 3F11), anti-CD19 (clone 1D3/CD19), anti-c-kit (clone 2B8), anti-IgM (clone RMM-1), and anti-CD45.1 (clone A20) were from BD Biosciences and BioLegend. *For imaging studies:* anti- γ -tubulin (clone 14C11) was from BioLegend and anti- α -tubulin (DM1A) was from (Thermo Fisher Scientific). *For immunoprecipitation and Western blot analysis:* anti-DIC (clone 74-1), IgG2b isotype control (sc-3879), anti-LIS1 (sc-15319), and anti-DHC (sc-9115) were from Santa Cruz Biotechnologies. Anti-p150glued (clone 1/p150Glued) were from BD Biosciences, anti-p53 (clone 1C12) were from Cell Signaling, and anti-Rac1 (clone 23A8) were from Millipore.

Flow cytometry and cell sorting

For flow cytometry analysis, single-cell suspensions from thymus, spleen, lymph nodes, and bone marrows were incubated with diluted eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher) in phosphate-buffered saline (PBS) prior staining with fluorochrome-conjugated antibodies. Intracellular staining was performed after cell fixation with 4% paraformaldehyde (PFA) by incubating the cells with conjugated antibodies in permeabilization buffer (Thermo Fisher Scientific). For the phenotyping of DN subsets, thymocytes were stained with an anti-lineage cocktail (anti-Gr1, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-Ter119, anti-CD3, anti-B220, anti-NK1.1, and anti-TCR $\gamma\delta$) and with anti-CD8 α and anti-CD4 antibodies. Data acquisition was performed on a BD LSRII flow cytometer and analysis with the FlowJo software.

For DN3 cell purification, thymocytes were first immunomagnetically depleted of CD3⁻, CD4⁻, or CD8 α -positive cells. Lin⁻CD44⁻CD25⁺CD5⁻ or Lin⁻CD44⁻CD25⁺CD71⁻ DN3 cells were sorted on a BD FACS Aria cell sorter. For peripheral T-cell isolation, total CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were purified from ACK-treated pooled lymph nodes and spleen by magnetic immunodepletion of CD8⁺, B220⁺, MHCII⁺, NK1.1⁺, Fc γ ⁺, and CD11b⁺ cells and CD4⁺, B220⁺, MHCII⁺, NK1.1⁺, Fc γ ⁺, and CD11b⁺ cells, respectively.

Cell culture

The OP-9-dl1 cell line was provided by Dr. Sophie Laffont-Pradines (Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases, Toulouse, France) and was initially generated in the group of Dr. Juan-Carlos Zúñiga-Pflücker (Sunnybrook Research Institute, Toronto, Ontario, Canada). This fibroblast cell line has been originally transfected by Notch ligand and can be authenticated by its exclusive capacity to stimulate progenitor T-cell differentiation in vitro (*Schmitt et al., 2004*). The cell line was tested negative for mycoplasma. OP9-DL1 cells were seeded at 8000 cells per well in 48-well plates

and incubated for 24 hr in OP9 culture media (alpha-MEM, 20% FCS, Penicillin and Streptomycin), followed by addition of 100,000 sorted CD5⁻ or CD71⁻ DN3 thymocytes per well together with 10 ng/mL recombinant mouse IL-7 (PeproTech).

For proliferation analysis, CD5⁻ DN3 thymocytes, CD4⁺ and CD8⁺ lymph nodes T cells were labeled with 2 μ M CTV (Thermo Fisher Scientific) for 15 min at 37°C. Thymocytes were cultured with OP9-DL1 cells and peripheral T cells were incubated with the indicated doses of anti-CD3 antibodies and with 2 μ g/mL anti-CD28 antibodies for 48 and 72 hr. For apoptosis analysis, thymocytes and CD4⁺ T cells were stained with CTV and stimulated for 48 hr as described for proliferation analysis. After stimulation, cells were stained with fluorochrome-conjugated annexin-5 (BD Biosciences) in annexin-5 binding buffer (BD Biosciences). For cell-cycle analysis, thymocytes and CD4⁺ T cells were stimulated for 48 hr as indicated above. Cells were fixed with 4% PFA and incubated with permeabilization buffer prior staining with DAPI in PBS.

Image stream flow cytometry

For the analysis of the G2/M population, CD4⁺ T cells were stimulated with 10 μ g/mL of anti-CD3 antibodies with 2 μ g/mL of anti-CD28 antibodies for 24 hr. Cells were synchronized by addition of nocodazole (Sigma-Aldrich) at 100 ng/mL for 18 hr. Cells were then washed in RPMI supplemented with 10% FCS and incubated with 10 μ M of MG132 (Sigma-Aldrich) for 3 hr. Cells were incubated with Fixable Viability Dye prior staining with fluorochrome-conjugated anti-CD4 antibodies and DAPI and acquired on an ImageStreamX apparatus from Millipore.

Data were analyzed using the IDEAS analysis software from Millipore. We used the 'Bright Detail Intensity' (BDI) parameter to discriminate mitotic cells from cells in the G2 phase. This parameter calculates the intensity of the bright pixels after subtraction of the background noise from the images. Cells in mitosis having condensed DNA will present a homogeneously bright staining leading to higher BDI value than cells in the G2 phase with uncondensed DNA. To evaluate cells in metaphase, we used the parameter 'Elongatedness,' which calculates the length to width ratio on a predefined DAPI mask. Cells with an 'Elongatedness' value exceeding 1.5 were characterized as cells in metaphase.

Immunization with ovalbumin

CD45.1+CD4⁺ T cells were purified from lymph nodes and splenocytes from control and CD4-Lis1 cKO mice expressing the OT2 TCR. 2×10^6 cells in PBS were injected i.v. into C57BL/6J mice (CD45.2⁺) 1 hr before immunization with 40 μ g of ovalbumin emulsified with RIBI (Sigma Adjuvant System). CD4⁺ T cell populations from the spleen were analyzed 2 and 3 days after immunization.

Confocal analysis

CD4⁺ T cells were labeled with CTV and incubated with 10 μ g/mL of anti-CD3 antibodies and 2 μ g/mL of anti-CD28 antibodies for 48 hr. The CTV^{hi}FSC^{lo} (non-proliferating, non-activated) and CTV^{hi}FSC^{hi} (non-proliferating, activated) populations were sorted by flow cytometry. Lin⁻CD44⁺CD25⁺CD5^{hi} thymocytes were sorted by flow cytometry. Cells were deposited on 0.01% poly-L-lysine adsorbed slides (Sigma-Aldrich), fixed with 4% PFA, and permeabilized in PBS containing 0.1% Saponin (Sigma-Aldrich). α - and γ -Tubulin staining was made in PBS containing 0.1% saponin, 3% bovine serum albumin (BSA), and 10 mM HEPES at 4°C for 18 hr and revealed with fluorochrome-conjugated anti-mouse and IgG1 and IgG2b antibodies (Thermo Fisher Scientific) for 1 hr at room temperature. DNA was stained with DAPI for 15 min at room temperature in PBS. The slides were then mounted with DABCO solution (Sigma-Aldrich), and the images were acquired with an LSM710 confocal microscope equipped with a 63 \times 1.4 NA objective (Zeiss).

For video microscopy, CD4⁺ T cells were cultured with 10 μ g/mL of anti-CD3 and 2 μ g/mL of anti-CD28 antibodies on a chambered glass coverslip (IBIDI) for 24 hr. To stain DNA, Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) was added to the culture at a final concentration of 50 ng/mL. Cells were observed for 18 hr in a chamber at 37°C and 5% CO₂ with a Spinning disk confocal microscope. The z-stack images were edited into film and analyzed using ImageJ.

Immunoprecipitation and Western blot analysis

For immunoprecipitation, CD4⁺ T cells were resuspended in 2 mL of ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton, 2 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 1 mM EDTA, and protease

inhibitor cocktail tablet [Roche]) and incubated for 20 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at $18,000 \times g$ for 15 min at 4°C , and the dynein intermediate chain (DIC) was subjected to immunoprecipitation from cleared lysates for 2 hr at 4°C with 15 μL of protein G-Sepharose resin coated with 12 μg of polyclonal rabbit anti-DIC antibodies. The resin was washed three times and incubated for 10 min at 95°C with Laemmli buffer. For p53 analysis, CD4+ T cells were stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-CD3 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-CD28 antibodies for 24 and 48 hr and were suspended in ice-cold lysis buffer after each time point. 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 at 0.05% for 1 hr at room temperature before being incubated with primary antibodies at 4°C overnight. After washing, membranes were incubated with secondary antibodies for 1 hr at room temperature. Subsequently, membranes were incubated with enhanced chemiluminescence solution (Sigma) for 5 min in the dark, and luminescence was captured with a Bio-Rad XRS+ imager.

Statistical analysis

GraphPad Prism was used to perform statistical analysis. All values in the article are presented as mean \pm SD. Except when indicated, statistical significance was calculated by unpaired two-tailed Mann–Whitney t test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.0001$.

Acknowledgements

The authors thank Loïc Dupré for helpful comments and suggestions and Dr. Deanna Smith for providing *Pafah1b1^{flox/flox}* mice. We acknowledge the technical assistance provided by the personnel of INSERM US006 Anexplo/creffre animal facility. The authors thank Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive and Anne-Laure Iscache from the cytometry facility of INFINITY as well as Sophie Allart and Astrid Canivet from the cell imaging facility of INFINITY. This work was supported by INSERM; the Foundation ARSEP; the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); the Agence Nationale de la Recherche (ANR-20-CE15-0002); the French Ministry of Higher Education and Research (PhD fellowship for JA and SM).

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
The French Ministry of Higher Education and Reserach	PhD fellowship	Jérémy Argenty Suzanne Mélique
Association pour la recherche sur la Sclérose en Plaques		Renaud Lesourne
Agence Nationale de la Recherche	ANR-20-CE15-0002	Renaud Lesourne
Association pour la Recherche sur le Cancer		Renaud Lesourne

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Jérémy Argenty, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation; Nelly Rouquié, Data curation, Formal analysis, Investigation; Cyrielle Bories, Formal analysis, Investigation; Suzanne Mélique, Data curation, Formal analysis; Valérie Duplan-Eche, Software, Formal analysis, Methodology; Abdelhadi Saoudi, Supervision, Writing - review and editing; Nicolas Fazilleau, Supervision, Methodology, Writing - review and editing; Renaud Lesourne, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Writing - original draft, Writing - review and editing

Author ORCIDsAbdelhadi Saoudi  <http://orcid.org/0000-0001-7015-8178>Renaud Lesourne  <http://orcid.org/0000-0003-3816-7087>**Ethics**

All the experiments were conducted at the INSERM animal facility (US-006; accreditation number A-31 55508 delivered by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice). All experimental protocols were approved by a Ministry-approved ethics committee (CEEA-122) and follow the French and European regulations on care and protection of the Laboratory Animals (EC Directive 2010/63).

Decision letter and Author responseDecision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.80277.sa1>Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.80277.sa2>

Additional files**Supplementary files**

- MDAR checklist

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in the manuscript and supporting file have been provided for Figures 1 and 3.

References

- Akashi K**, Kondo M, von Freeden-Jeffry U, Murray R, Weissman IL. 1997. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* **89**:1033–1041. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80291-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80291-3), PMID: 9215626
- Arsenio J**, Kakaradov B, Metz PJ, Kim SH, Yeo GW, Chang JT. 2014. Early specification of CD8+ T lymphocyte fates during adaptive immunity revealed by single-cell gene-expression analyses. *Nature Immunology* **15**:365–372. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.2842>, PMID: 24584088
- Ayloo S**, Lazarus JE, Dodda A, Tokito M, Ostap EM, Holzbaur ELF. 2014. Dynactin functions as both a dynamic tether and brake during dynein-driven motility. *Nature Communications* **5**:4807. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms5807>, PMID: 25185702
- Azzam HS**, Grinberg A, Lui K, Shen H, Shores EW, Love PE. 1998. Cd5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *The Journal of Experimental Medicine* **188**:2301–2311. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2301>, PMID: 9858516
- Bärenz F**, Mayilo D, Gruss OJ. 2011. Centriolar satellites: busy orbits around the centrosome. *European Journal of Cell Biology* **90**:983–989. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.07.007>, PMID: 21945726
- Ben-Sasson SZ**, Gerstel R, Hu-Li J, Paul WE. 2001. Cell division is not a “clock” measuring acquisition of competence to produce IFN- γ or IL-4. *The Journal of Immunology* **166**:112–120. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.112>, PMID: 11123283
- Bird JJ**, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang CR, Reiner SL. 1998. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* **9**:229–237. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80605-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80605-6), PMID: 9729043
- Blagden SP**, Glover DM. 2003. Polar expeditions -- provisioning the centrosome for mitosis. *Nature Cell Biology* **5**:505–511. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb0603-505>, PMID: 12776127
- Boudil A**, Matei IR, Shih H-Y, Bogdanoski G, Yuan JS, Chang SG, Montpellier B, Kowalski PE, Voisin V, Bashir S, Bader GD, Krangel MS, Guidos CJ. 2015. IL-7 coordinates proliferation, differentiation and tcra recombination during thymocyte β -selection. *Nature Immunology* **16**:397–405. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.3122>, PMID: 25729925
- Brzostek J**, Gautam N, Zhao X, Chen EW, Mehta M, Tung DWH, Chua YL, Yap J, Cho SH, Sankaran S, Rybakina V, Fu G, Gascoigne NRJ. 2020. T cell receptor and cytokine signal integration in CD8+ T cells is mediated by the protein THEMIS. *Nature Immunology* **21**:186–198. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0570-3>, PMID: 31932808
- Cao SY**, Lu XM, Wang LH, Qian XF, Jin GF, Ma HX. 2017. The functional polymorphisms of LIS1 are associated with acute myeloid leukemia risk in a Han Chinese population. *Leukemia Research* **54**:7–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.12.007>, PMID: 28076835
- Chang JT**, Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, Banerjee A, Longworth SA, Vinup KE, Mrass P, Oliaro J, Killeen N, Orange JS, Russell SM, Weninger W, Reiner SL. 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* **315**:1687–1691. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1139393>, PMID: 17332376

- Chang JT**, Ciocca ML, Kinjyo I, Palanivel VR, McClurkin CE, DeJong CS, Mooney EC, Kim JS, Steinel NC, Oliaro J, Yin CC, Florea BI, Overkleeft HS, Berg LJ, Russell SM, Koretzky GA, Jordan MS, Reiner SL. 2011. Asymmetric proteasome segregation as a mechanism for unequal partitioning of the transcription factor T-bet during T lymphocyte division. *Immunity* **34**:492–504. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.017>, PMID: 21497118
- 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. *Nature Immunology* **18**:433–441. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.3692>, PMID: 28250424
- Cimini D**, Howell B, Maddox P, Khodjakov A, Degross F, Salmon ED. 2001. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *The Journal of Cell Biology* **153**:517–527. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.517>, PMID: 11331303
- Ciofani M**, Schmitt TM, Ciofani A, Michie AM, Cuburu N, Aublin A, Maryanski JL, Zúñiga-Pflücker JC. 2004. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and notch during thymocyte differentiation. *Journal of Immunology* **172**:5230–5239. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5230>, PMID: 15100261
- Ciofani M**, Zúñiga-Pflücker JC. 2005. Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nature Immunology* **6**:881–888. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni1234>, PMID: 16056227
- Cobbold SP**, Adams E, Howie D, Waldmann H. 2018. CD4⁺ T cell fate decisions are stochastic, precede cell division, depend on G1TR co-stimulation, and are associated with upodium development. *Frontiers in Immunology* **9**:1381. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01381>, PMID: 29967616
- Dammermann A**, Merdes A. 2002. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *The Journal of Cell Biology* **159**:255–266. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200204023>, PMID: 12403812
- Daum JR**, Potapova TA, Sivakumar S, Daniel JJ, Flynn JN, Rankin S, Gorbisky GJ. 2011. Cohesion fatigue induces chromatid separation in cells delayed at metaphase. *Current Biology* **21**:1018–1024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.032>, PMID: 21658943
- Eshenawy MM**, Kusakci E, Volz S, Baumbach J, Bullock SL, Yildiz A. 2020. Lis1 activates dynein motility by modulating its pairing with dynactin. *Nature Cell Biology* **22**:570–578. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0501-4>, PMID: 32341547
- 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. *Nature Cell Biology* **2**:784–791. DOI: <https://doi.org/10.1038/35041020>, PMID: 11056532
- Foulds KE**, Zenewicz LA, Shedlock DJ, Jiang J, Troy AE, Shen H. 2002. Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *Journal of Immunology* **168**:1528–1532. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1528>, PMID: 11823476
- Fu G**, Vallée S, Rybakina V, McGuire MV, Ampudia J, Brockmeyer C, Salek M, Fallen PR, Hoerter JAH, Munshi A, Huang YH, Hu J, Fox HS, Sauer K, Acuto O, Gascoigne NRJ. 2009. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nature Immunology* **10**:848–856. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.1766>, PMID: 19597499
- 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. *Journal of Immunology* **199**:2758–2766. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700566>, PMID: 28877990
- Greaves DR**, Wilson FD, Lang G, Kioussis D. 1989. Human CD2 3’-flanking sequences confer high-level, T cell-specific, position-independent gene expression in transgenic mice. *Cell* **56**:979–986. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90631-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90631-4), PMID: 2564317
- 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. *Nature Genetics* **19**:333–339. DOI: <https://doi.org/10.1038/1221>, PMID: 9697693
- Holland AJ**, Cleveland DW. 2009. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **10**:478–487. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm2718>, PMID: 19546858
- Htet ZM**, Gillies JP, Baker RW, Leschziner AE, DeSantis ME, Reck-Peterson SL. 2020. Lis1 promotes the formation of activated cytoplasmic dynein-1 complexes. *Nature Cell Biology* **22**:518–525. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0506-z>, PMID: 32341549
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.022>, PMID: 22939623
- Johnson AL**, Aravind L, Shulzhenko N, Morgun A, Choi S-Y, Crockford TL, Lambe T, Domaschew 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. *Nature Immunology* **10**:831–839. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.1769>, PMID: 19597497
- Jung HR**, Song KH, Chang JT, Doh J. 2014. Geometrically controlled asymmetric division of CD4⁺ T cells studied by immunological synapse arrays. *PLOS ONE* **9**:e91926. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091926>, PMID: 24632942
- Kasthuber ER**, Lowe SW. 2017. Putting p53 in context. *Cell* **170**:1062–1078. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>, PMID: 28886379

- Kelly AP**, Finlay DK, Hinton HJ, Clarke RG, Fiorini E, Radtke F, Cantrell DA. 2007. Notch-Induced T cell development requires phosphoinositide-dependent kinase 1. *The EMBO Journal* **26**:3441–3450. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601761>, PMID: 17599070
- Kim K**, Rhee K. 2011. The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole. *Journal of Cell Science* **124**:338–347. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.078329>, PMID: 21224392
- Krauss SW**, Spence JR, Bahmanyar S, Barth AIM, Go MM, Czerwinski D, Meyer AJ. 2008. Downregulation of protein 4.1R, a mature centriole protein, disrupts centrosomes, alters cell cycle progression, and perturbs mitotic spindles and anaphase. *Molecular and Cellular Biology* **28**:2283–2294. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.02021-07>, PMID: 18212055
- Kreslavsky T**, Gleimer M, Miyazaki M, Choi Y, Gagnon E, Murre C, Sicsinski P, von Boehmer H. 2012. β -selection-induced proliferation is required for $\alpha\beta$ T cell differentiation. *Immunity* **37**:840–853. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.020>, PMID: 23159226
- 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. *Nature Immunology* **10**:840–847. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.1768>, PMID: 19597498
- Li X**, Liu L, Li R, Wu A, Lu J, Wu Q, Jia J, Zhao M, Song H. 2018. Hepatic loss of lissencephaly 1 (LIS1) induces fatty liver and accelerates liver tumorigenesis in mice. *Journal of Biological Chemistry* **293**:5160–5171. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001474>
- 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. *PNAS* **113**:984–989. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1508535113>, PMID: 26755576
- Maiato H**, Logarinho E. 2014. Mitotic spindle multipolarity without centrosome amplification. *Nature Cell Biology* **16**:386–394. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb2958>, PMID: 24914434
- Maillard I**, Tu L, Sambandam A, Yashiro-Ohtani Y, Millholland J, Keeshan K, Shestova O, Xu L, Bhandoola A, Pear WS. 2006. The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *The Journal of Experimental Medicine* **203**:2239–2245. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20061020>, PMID: 16966428
- Maraskovsky E**, O'Reilly LA, Teepe M, Corcoran LM, Peschon JJ, Strasser A. 1997. Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1^{-/-} mice. *Cell* **89**:1011–1019. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80289-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80289-5), PMID: 9215624
- Markus SM**, Marzo MG, McKenney RJ. 2020. New insights into the mechanism of dynein motor regulation by lissencephaly-1. *eLife* **9**:e59737. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.59737>, PMID: 32692650
- McKenney RJ**, Huynh W, Tanenbaum ME, Bhabha G, Vale RD. 2014. Activation of cytoplasmic dynein motility by dynactin-cargo adapter complexes. *Science* **345**:337–341. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1254198>, PMID: 25035494
- Messi E**, Florian MC, Caccia C, Zanisi M, Maggi R. 2008. Retinoic acid reduces human neuroblastoma cell migration and invasiveness: effects on DCX, LIS1, neurofilaments-68 and vimentin expression. *BMC Cancer* **8**:30. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-30>, PMID: 18230156
- 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. *Human Molecular Genetics* **23**:449–466. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt436>, PMID: 24030547
- Ngoi SM**, Lopez JM, Chang JT. 2016. The microtubule-associated protein LIS1 regulates T lymphocyte homeostasis and differentiation. *Journal of Immunology* **196**:4237–4245. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502410>, PMID: 27029586
- Nigg EA**, Stearns T. 2011. The centrosome cycle: centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nature Cell Biology* **13**:1154–1160. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb2345>, PMID: 21968988
- Nish SA**, Zens KD, Kratchmarov R, Lin W-HW, Adams WC, Chen Y-H, Yen B, Rothman NJ, Bhandoola A, Xue H-H, Farber DL, Reiner SL. 2017. Cd4⁺ T cell effector commitment coupled to self-renewal by asymmetric cell divisions. *Journal of Experimental Medicine* **214**:39–47. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20161046>, PMID: 27923906
- Pénil C**, Lucas B, Vasseur F. 1995. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *Journal of Immunology* **154**:5103–5113. PMID: 7730616.
- Quintyne NJ**, Schroer TA. 2002. Distinct cell cycle-dependent roles for dynactin and dynein at centrosomes. *The Journal of Cell Biology* **159**:245–254. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200203089>, PMID: 12391026
- Reck-Peterson SL**, Redwine WB, Vale RD, Carter AP. 2018. The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **19**:382–398. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0004-3>, PMID: 29662141
- Reiner O**, Sapir T. 2013. Lis1 functions in normal development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* **23**:951–956. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.08.001>, PMID: 23973156
- Schlager MA**, Hoang HT, Urnavicius L, Bullock SL, Carter AP. 2014. In vitro reconstitution of a highly processive recombinant human dynein complex. *The EMBO Journal* **33**:1855–1868. DOI: <https://doi.org/10.15252/emboj.201488792>, PMID: 24986880
- Schmitt TM**, de Pooter RF, Gronski MA, Cho SK, Ohashi PS, Zúñiga-Pflücker JC. 2004. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nature Immunology* **5**:410–417. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni1055>, PMID: 15034575

- Seder RA**, Ahmed R. 2003. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature Immunology* **4**:835–842. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni969>, PMID: 12942084
- Sprent J**, Surh CD. 2011. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nature Immunology* **12**:478–484. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.2018>, PMID: 21739670
- Suzuki SO**, McKenney RJ, Mawatari S, Mizuguchi M, Mikami A, Iwaki T, Goldman JE, Canoll P, Vallee RB. 2007. Expression patterns of LIS1, dynein and their interaction partners dynactin, nude, nudel and NudC in human gliomas suggest roles in invasion and proliferation. *Acta Neuropathologica* **113**:591–599. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0180-7>, PMID: 17221205
- Taghon T**, Yui MA, Pant R, Diamond RA, Rothenberg EV. 2006. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* **24**:53–64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.012>, PMID: 16413923
- Urnavicius L**, Zhang K, Diamant AG, Motz C, Schlager MA, Yu M, Patel NA, Robinson CV, Carter AP. 2015. The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein. *Science* **347**:1441–1446. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaa4080>, PMID: 25814576
- 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. *Molecular Biology of the Cell* **24**:3522–3533. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-05-0283>, PMID: 24025714
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **409**:193–199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.117>, PMID: 21569763
- 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. *The EMBO Journal* **27**:2471–2483. DOI: <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.182>, PMID: 18784752
- Yang R**, Chen Y, Tang C, Li H, Wang B, Yan Q, Hu J, Zou S. 2014. MicroRNA-144 suppresses cholangiocarcinoma cell proliferation and invasion through targeting platelet activating factor acetylhydrolase isoform 1B. *BMC Cancer* **14**:917. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-917>, PMID: 25479763
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.026>, PMID: 18267077
- Young A**, Dichtenberg JB, Purohit A, Tuft R, Doxsey SJ. 2000. Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentriolar and gamma tubulin onto centrosomes. *Molecular Biology of the Cell* **11**:2047–2056. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.11.6.2047>, PMID: 10848628
- 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. *Nature Genetics* **46**:245–252. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.2889>, PMID: 24487275
- 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. *Science Signaling* **9**:ra51. DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad1576>, PMID: 27188442

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Biomedical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bj

Review Article: Special Edition

Negative times negative equals positive, THEMIS sets the rule on thymic selection and peripheral T cell responses



Suzanne Mélisque, Cui Yang, Renaud Lesourne*

Infinity, University of Toulouse, CNRS5051, INSERM1291, UPS, Toulouse, France



Prof. Renaud Lesourne

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2021

Accepted 3 March 2022

Available online 26 March 2022

Keywords:

Adaptive immunity

T cells

Signaling

TCR

T cell development

ABSTRACT

The activity of T cells is finely controlled by a set of negative regulators of T-cell antigen receptor (TCR)-mediated signaling. However, how those negative regulators are themselves controlled to prevent ineffective TCR-mediated responses remain poorly understood. Thymocyte-expressed molecule involved in selection (THEMIS) has been characterized over a decade ago as an important player of T cell development. Although the molecular function of THEMIS has long remained puzzling and subject to controversies, latest investigations suggest that THEMIS stimulates TCR-mediated signaling by repressing the tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 which exert regulatory function on T cell activation. Recent evidences also point to a role for THEMIS in peripheral T cells beyond its role on thymic selection. Here, we present an overview of the past research on THEMIS in the context of T cell development and peripheral T cell function and discuss the possible implication of THEMIS-based mechanisms on TCR-dependent and independent signaling outcomes.

T cells operate together with B cells to coordinate the cellular and humoral arms of adaptive immunity. The development, activation and differentiation of T cells into effector cells is controlled by a complex array of signaling events triggered by the multi-subunit T cell antigen receptor (TCR), which recognize antigenic peptides bound to MHC molecules (pMHC) presented by antigen presenting cells (APCs) [Box 1]. Unlike most cell surface receptors that recognize a single

ligand, individual TCRs are capable of recognizing different ligands (for example, self-peptides and foreign peptides) with a broad range of affinities. The strength of TCR-ligand interactions has a critical influence on the outcome of T cell responses. In the thymus, positive and negative selection of thymocytes is engaged to optimize T cell responses to foreign antigens and to prevent autoimmune reactions against self-antigens. Negative selection eliminates T cells

* Corresponding author. Infinity, University of Toulouse, CNRS5051, INSERM1291, UPS, CHU Purpan - BP 3028 31024, Toulouse, France.
E-mail address: renaud.lesourne@inserm.fr (R. Lesourne).

Peer review under responsibility of Chang Gung University.

<https://doi.org/10.1016/j.bj.2022.03.008>

2319-4170/© 2022 Chang Gung University. Publishing services by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

The main steps of TCR signaling

T cells express a clonotypic multi-subunit antigen receptor (TCR) which is composed of a heterodimer of α and β chain, forming the recognition subunit, that is non-covalently associated with multiple signal transducing subunits, including CD3 γ , CD3 δ and CD3 ϵ and, in most cases, a CD3 ζ chain. The recognition of cognate pMHC by the TCR induces conformational changes in the CD3 ϵ subunit which enable the recruitment of the SRC family kinase member LCK which phosphorylates immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) of the CD3 γ chain, CD3 δ chain, CD3 ϵ chains and the ζ -chains. Phosphorylated ITAMs serve as docking site for the kinase ZAP70 (ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa), which is activated following its phosphorylation by LCK. Activated ZAP70 phosphorylates four key tyrosine residues on linker for activation of T cells (LAT), which recruits several signaling complexes that seed distinct signaling pathways. Those proteins include the growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), which recruit several proteins such as THEMIS, VAV1, SHIP1 and the Ras-GTP exchange factor SOS1, the GRB2-related adaptor protein GADS and the adaptor protein SLP76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa), which enables the recruitment of adhesion- and degranulation-promoting adaptor protein (ADAP), interleukin-2-inducible T cell kinase (ITK), NCK1 and VAV1 and the phospholipase C γ 1 (PLC γ 1). Those complexes trigger several signaling pathways among which the best characterized are the Ca²⁺ flux which lead to the translocation of the transcription factor NFAT in the nucleus, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase which lead to the activation of transcription factors such as AP-1 and the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathways which induce the activation and the translocation in the nucleus of transcription factors such as c-REL and RELA.

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 [1–3]. In the periphery, stimulation of the TCR by low affinity antigens promotes signals that favor their maintenance, whereas stimulation by higher affinity ligands may promote full activation leading to clonal expansion and differentiation into effector subsets.

The magnitude and the type of signaling pathways induced following antigen stimulation is primarily set by the strength of interaction between the antigen and the TCR. They also depend on regulatory proteins, which are not directly involved in the propagation of signaling events but which contribute to regulate their magnitude and their localization [4]. Although many regulators of TCR signaling have now been identified, their precise functions in controlling *in vivo* TCR-mediated developmental or effector responses have rarely been formally demonstrated. Many of these proteins show variable expression profile throughout development and in effector subsets indicating that they contribute to adjust the sensitivity of T cells to antigen stimulation in given immunological contexts. In the thymus for instance, thymocyte responsiveness to self-ligand is enhanced by a set of positive regulators of TCR signaling which are up-regulated in CD4+CD8+ double-positive [DP] thymocytes prior the stage of positive selection [4]. In the periphery, negative regulators of TCR signaling are enhanced in specific subsets, reducing the reactivity of immune cells to self-antigens and preventing exacerbated inflammatory responses, which may cause pathology [4].

Thymocyte-expressed molecule involved in selection-1 (THEMIS; also referred to as THEMIS1) is a prototypical example of regulatory proteins involved in the tuning of T cell activation. THEMIS was identified almost concomitantly by five research groups in 2009 through approaches aiming at screening for T cell phenotypes in N-ethyl-N-nitrosourea

(ENU)-induced mutant mice and by genetic or bioinformatics screening for genes specifically expressed in thymocytes [5–9]. Each studied independently reported a comparable phenotype in THEMIS deficient mice, characterized by a reduced maturation of DP cells into CD4+ and CD8+ single-positive [SP] with a more severe reduction in CD4SP thymocytes and peripheral T cells. The characterization of THEMIS also led to the identification of two related mammalian homologues, Icb-1 (subsequently renamed THEMIS2), which is expressed in B and myeloid cells, and THEMIS3, which is expressed only in the intestine [5,6,8]. Four groups also reported the interaction of THEMIS with the Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), an adapter protein which serves as a molecular intermediate for the recruitment of signaling proteins to transmembrane proteins and receptors [6–9]. Despite the striking block of T cell development observed in THEMIS deficient mice and several indirect evidences suggesting positive regulatory function of THEMIS on TCR signaling, it is only a decade after its initial characterization and some controversies that the mechanism by which THEMIS regulates TCR signaling began to be elucidated [10]. The difficulty for resolving the function of THEMIS proteins have relied partly on the unusual and apparently “non-ergonomic” mechanism by which THEMIS stimulates TCR signaling, which is based on the inhibition of the catalytic activity of the SH2-domain containing tyrosine phosphatases SHP-1, a protein which exerts an inhibitory function on the signaling events triggered by several T-cell expressed receptors including the TCR. A stimulatory mechanism based on the inhibition of inhibitory proteins may seem counterintuitive and unnecessarily “costly” energetically speaking. Nevertheless, it possibly allows to put negative regulators of T cell activation under control, in a flexible and precise way, maintaining those proteins available for repressing T cell activity if rapidly needed. Here, we present an overview of the past research on THEMIS in the context of T cell development and peripheral T cell function and propose different interpretations to explain previous contrasting results associated to the function of this protein.

Structure and molecular function of THEMIS during T cell development

THEMIS1 is the founding member of a metazoan protein family containing CABIT modules

THEMIS proteins do not contain any known domains with catalytic function. Only two motifs are present in the three members of the THEMIS protein family, a C-terminal proline-rich sequence (PRS) composed of two proline rich motifs (PRR1 and PRR2) and a centrally located nuclear localization signal. Among the five groups which initially characterized THEMIS, one analyzed the amino-acid sequence of THEMIS with a program that uses empirically determined entropy thresholds to identify potential globular domains [6]. This analysis led to the identification of two putative tandem repeat globular domains of approximately 260 amino-acid length that they designated cysteine-containing all-beta-in-THEMIS (CABIT) module. These modules are predicted to rearrange in an SH3-like β -barrel fold which contain a conserved core sequence (wXCX7–26wXLPwX3GXF with X = any amino acid and w = any hydrophobic residue) and several conserved residues, among which a highly conserved cysteine, predicted to form ligand-binding contact sites. Further analysis of database identified hundreds of uncharacterized proteins in metazoan with the same globular domain [6]. In mammals, two proteins containing a single CABIT-module were identified in addition to the three THEMIS homologues: GAREM1 which is broadly expressed [11], and GAREM2, which is expressed in neuronal cells [12]. GAREM1 and GAREM2 as well as other proteins containing single-CABIT module contain also a PRS which is combined frequently with a C-terminal SAM (sterile a-motif) domain. The signaling function of THEMIS CABIT domains has been resolved in a recent study [13], however how they biochemically operate and whether they exert catalytic activity remains unclear.

THEMIS CABIT domains inhibit the tyrosine-phosphatase activity of SHP-1 and SHP-2

Quantitative analysis of THEMIS interacting partners by mass spectrometry in Jurkat cells and thymocytes identified the protein tyrosine phosphatase (PTP) Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 and -2 (SHP-1 and SHP-2) among the preferential binding partners of THEMIS, with SHP-1 interaction largely predominating over SHP-2 [14]. These phosphatases are well characterized regulators of T-cell signaling which operate downstream of several receptors including the TCR. SHP-1 is described almost exclusively as a negative regulator of T cell activation and differentiation. It interacts with proteins of the TCR signaling machinery and has been proposed to operate within negative feedback loops that contribute to negatively regulate TCR signaling upon recognition of weak and strong agonists by the TCR [15,16]. SHP-1 is also directly recruited to inhibitory receptors containing immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM) and immunoreceptor tyrosine-based switch motifs (ITSM) which are phosphorylated upon stimulation by their respective ligands [17–20]. The presence

of dually phosphorylated motifs on the cytoplasmic tail of these receptors enables the binding in cis of the two tandem SH2 domains of SHP-1, which contributes to stabilize SHP-1 at the membrane, in proximity of its signaling targets, and to enhance its activity by interrupting an intramolecular association between the N-terminal SH2 domain and the PTP domain of SHP-1 [21,22]. Several potential substrates of SHP-1 have been identified in lymphocytes, including tyrosine residues located on the activation sites of proteins such as the tyrosine kinases LCK and ZAP-70 [23,24], which are required for the initiation of TCR signaling, the adapter proteins LAT and SLP-76 [25,26], and the guanine nucleotide exchange factor (GEF) Rho family guanosine triphosphatases (GTPase) VAV1 [27,28]. The role of SHP-2 on TCR signaling appears to be more complex, with both inhibitory and activating roles being ascribed depending on the substrate and the context of its recruitment to the membrane. Whereas SHP-2 is described as a negative regulator of TCR- and CD28-mediated signaling events following its recruitment to inhibitory receptors such as the programmed cell death 1 receptor (PD-1) [29–31], SHP-2 is associated to positive function on TCR signaling when TCR signals emanate exclusively from the TCR and do not integrate additional stimulatory inputs [32,33].

In a key study, the group of Paul Love examined in details the mechanism by which THEMIS interacts with SHP-1 and SHP-2 and identified important functions for the CABIT domains in controlling the activity of these phosphatases [13]. Indeed, THEMIS was found to bind directly to SHP-1 through its CABIT modules. SHP-1 could bind to truncated THEMIS proteins encoding isolated CABIT modules but not as efficiently as with THEMIS proteins containing the tandem repeat modules. Further analysis in this study showed that the CABIT modules interact specifically with the phosphatase domain of SHP-1, suggesting that THEMIS could exert modulatory function on SHP-1 phosphatase activity. *In vitro* analysis with recombinant proteins showed that both THEMIS1 and THEMIS2 could inhibit the tyrosine phosphatase activity of SHP-1. Proteins encoding only for the tandem repeat CABIT modules were as efficient as the full-length THEMIS to inhibit the phosphatase activity of SHP-1 while the isolated CABIT1 module could partially inhibit SHP-1 activity. THEMIS could also inhibit the phosphatase activity of SHP-2, although not as efficiently as SHP-1, and had no effect on other related type-1 tyrosine phosphatases such as PTPN1 and PTPN7, indicating a specific effect of THEMIS on the phosphatases from the SHP family. Investigation of the mechanism by which THEMIS controls SHP-1 activity indicated that CABIT modules operate at least partly by promoting or stabilizing the oxidation of the catalytic cysteines of SHP-1, thereby maintaining SHP-1 in an inactive form. The conserved cysteines in the core region of THEMIS CABIT modules were not required for the inhibition of SHP-1 phosphatase activity, confirming previous observations showing that those cysteines are dispensable for THEMIS activity *in vivo* [34]. It was speculated that the CABIT module may operate by preventing the access of the oxidized catalytic cysteine of SHP-1 and SHP-2 to reducing agents or by exposing the catalytic cysteine to oxidation by reactive oxygen species ROS. The ability of THEMIS to block SHP-1 phosphatase activity in cell free assay also suggests that the inhibitory effect

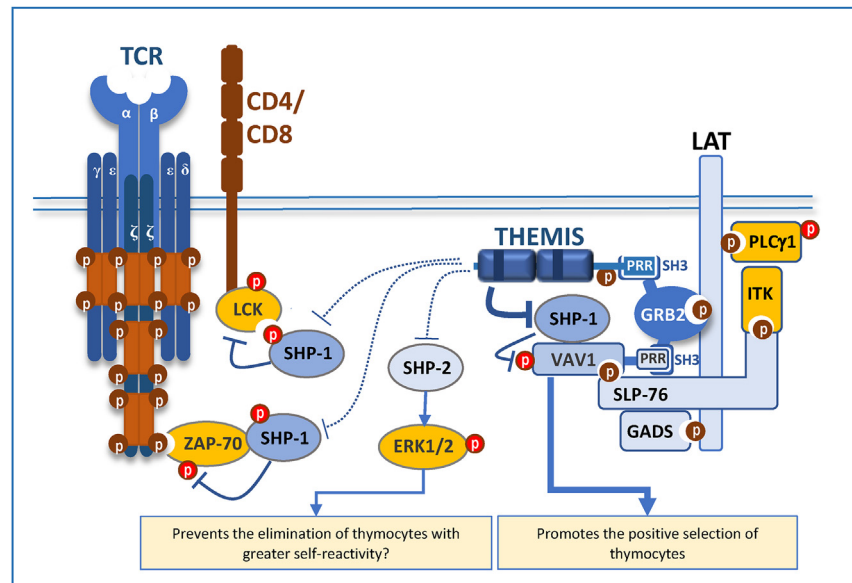


Fig. 1 THEMIS interactome and function in the context of TCR signaling. Upon TCR stimulation, THEMIS is recruited to LAT in proximity of VAV1 via the adapter protein GRB2. THEMIS promotes VAV1 activation and the positive selection of thymocytes by repressing the phosphatase activity of SHP-1. THEMIS also promotes the activation of LCK and ZAP-70 by repressing SHP-1, but may have a reduced influence on the activity of those proteins as compared to that for VAV1 due to increased remoteness. THEMIS concomitantly inhibits ERK1/2 activity by repressing SHP-2. This might skew the mature TCR repertoire toward greater self-reactivity and favor the development of optimized immune responses to pathogens. Signaling proteins which are most predominately enriched in THEMIS interactome in thymocytes are represented in blue. Phosphorylation events that are regulated by THEMIS are represented in red.

of THEMIS cannot solely be explained by redox regulation and that CABIT modules probably also block access of the catalytic cysteine to phosphorylated-tyrosine ligands. Since SHP-1 is a well-characterized inhibitor of TCR signaling [23,24,26,27] and since THEMIS inhibits preferentially SHP-1 over SHP-2 [13], a straightforward prediction from those findings is that THEMIS should operate as a stimulator of TCR signaling. However, analysis of TCR signaling in THEMIS deficient T cells in the past years have led to contrasting results which posit nearly opposite function of THEMIS on T cell development.

Contrasting effects of THEMIS on TCR signaling

Despite the striking phenotype of THEMIS deficient mice and the identification of interactions between THEMIS and TCR signaling proteins, detecting a modulatory effect of THEMIS on TCR signaling has been particularly challenging and has led to equivocal results. Among the five research groups that initially reported the characterization of THEMIS, four of them failed to detect defects associated to THEMIS deficiency following TCR cross-linking *in vitro* [6–9] and one observed a limited decrease of ERK phosphorylation and calcium flux which is in contrast to the fairly important block of T cell development observed in *Themis*^{−/−} mice [5]. The positive effect of THEMIS on TCR signaling was thus initially deduced indirectly from the phenotype of THEMIS deficient mice which show several defects of T cell development all suggestive of reduced TCR signal intensity. For instance, positive selection and CD4⁺ T cell lineage commitment, which are dependent on sustained TCR signals, and negative selection, which

required intense TCR signals were all impaired in *Themis*^{−/−} mice [5,6,8].

Unexpectedly, later studies identified inhibitory function for THEMIS on TCR signaling events in thymocytes and Jurkat cells stimulated *in vitro* by low-affinity antigens [35,36]. It was shown first that the loss of THEMIS results in enhanced calcium (Ca²⁺) flux and increased phosphorylation of LCK, LAT, and ERK in preselected DP thymocytes that are stimulated by low-affinity pMHCs tetramers [35]. In that study, which was published before CABIT modules were reported to exert inhibitory function on SHP-1 phosphatase activity, THEMIS was speculated to function by facilitating the recruitment of SHP-1 and SHP-2 to the transmembrane adaptor LAT where they would be brought into contact with their primary targets. It was hypothesized here that THEMIS operates by preventing the transmission of strong signaling events that might be inadequately triggered by low-affinity self-ligands possibly leading to misplaced negative selection. However, arguing against this model, the disruption of *Bcl2l11*, the gene encoding BIM, a pro apoptotic factor required for negative selection [14], or the overexpression of *BCL2* [8] could not optimally rescue positive selection of *Themis*^{−/−} thymocytes. In addition, analysis of TCR signaling in developing thymocytes using the transgenic TCR signaling reporter system (Nur77-GFP) indicated positive effect of THEMIS on TCR signaling in response to endogenous selecting ligands [14]. Finally, and probably most importantly, the deletion of *ptpn6*, the gene encoding for SHP-1, could alleviate the developmental block in *Themis*^{−/−} thymocytes [13], suggesting that the impaired maturation of SP thymocytes observed in *Themis*^{−/−} results

from an exacerbated inhibitory activity of SHP-1 on TCR signaling rather than from an attenuated function of this phosphatase. Altogether, a puzzling conclusion from those studies is that the loss of THEMIS would result in different outcomes on TCR signaling according to the context of stimulation, leading to exacerbated TCR signaling events when TCR signals emanate exclusively from the TCR (situation observed *in vitro* upon pMHC tetramer stimulation [35]), and to reduced TCR signal intensity when it integrates multiple regulatory inputs triggered by additional environmental stimuli [13,14].

THEMIS drives opposite effects on TCR signals that might serve different purposes on selection

One potential explanation to those observations may relate to the differential contribution of SHP-1 and SHP-2 to the regulation of TCR signaling. Although an inhibitory function on TCR signaling has been ascribed to SHP-2 [19,29–31], when recruited to ITIM-containing receptors, positive effect of SHP-2 on TCR signaling have also been reported, particularly when TCR signals emanate exclusively from the TCR [32,33,37]. Inactivation of SHP-2 catalytic function in Jurkat cells [33] and conditional disruption of *Ptpn11*, the gene encoding SHP-2, in T cells [32] result in impaired activation of the MAP kinases ERK1/2 following TCR cross-linking which is associated to the inefficient maturation of thymocytes after the β -selection checkpoint. SHP-2 also promotes the activation of SRC kinases by dephosphorylating the adaptor protein CBP/PAG, which prevents the recruitment to this adaptor of the C-terminal Src kinase (CSK) that phosphorylate SRC kinases on inhibitory tyrosine residues [37,38]. The reason of this dual effect of SHP-2 on TCR signaling is unknown but it contrasts with the univocal inhibitory function ascribed to SHP-1 on TCR signaling. Thus, if THEMIS represses concomitantly SHP-1 and to a lesser extent SHP-2, a prediction would be that THEMIS may exert combined effect on TCR signaling events, promoting specific TCR signals that are repressed by SHP-1 and inhibiting ones that are stimulated by SHP-2. Such dual effects of THEMIS on TCR signaling was reported in a previous study from our group in thymocytes stimulated with low or high doses of anti-CD3 antibodies [14]. The quantitative analysis of the THEMIS interactome by mass spectrometry reveals that in addition to GRB2, SHP-1 and to a lesser extent SHP-2, THEMIS also strongly interacts with the RAC1 Guanine nucleotide exchange factor VAV1, which plays an important role in T cell development and peripheral T cell functions [14,39]. We showed that the loss of THEMIS results in increased ERK phosphorylation when thymocytes are stimulated under weak TCR cross-linking conditions, supporting previous results obtained in thymocytes with low affinity ligands [35]. However, the phosphorylation of VAV1 was strongly decreased in the absence of THEMIS independently of the strength of TCR stimulation. This effect was correlated with a reduced production of RAC1-GTP a direct product of VAV1 and was also observed *ex-vivo* in post-selection thymocytes expressing a transgenic TCR [14]. Since SHP-2 exerts a positive effect on ERK1/2 activity [32,33,37] and since phosphorylated tyrosine residues on VAV1 are well-characterized substrates of SHP-1 [27,28], it could be speculated that the inhibitory

effect of THEMIS on ERK1/2 may result from its ability to block SHP-2 [13], whereas its stimulating effect on VAV1 may result from its repressing effect on SHP-1 [13]. This observation raises the question of whether this combined effect of THEMIS on TCR signaling is relevant to its *in vivo* function or whether the inhibitory effect reported for THEMIS on TCR signaling *in vitro* is marginal in regard of the stimulating effect detected *in vivo*. 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 *Themis*^{-/-} mice [39], suggesting that the stimulating effect of THEMIS on VAV1 activity could by itself explain the effect of THEMIS on T cell development [Fig. 1]. Strong but transient activation of ERK, similar to what is seen in *Themis*^{-/-} thymocytes, is coupled with negative selection [40], suggesting that THEMIS might also be important to equalize ERK-mediated signaling and prevent the transmission of negatively selecting stimuli that may lead to some form of exacerbated negative selection [Fig. 1]. Positive selection is proposed to operate by skewing the mature TCR repertoire to self and foreign pMHC toward higher affinity in order to optimize immune responses to pathogens [2]. Thus, by concomitantly enhancing VAV1 activity and repressing ERK-mediated signaling, THEMIS on one hand might enable the maturation of thymocytes capable of recognizing self-pMHC and, on the other hand, enhance the negative selection threshold to prevent the elimination of T cells which might be more effective against pathogens. Importantly, the inhibitory effect that THEMIS might exert on TCR signaling by blocking SHP-2-mediated ERK1/2 activation does not seem to account for the strong phenotype of *Themis*^{-/-} mice since the deletion of *ptpn11*, does not alleviate the block of T cell development observed in those mice [13]. Altogether, if THEMIS inhibits signaling events associated to negative selection by blocking SHP-2, this might be marginal phenotypically speaking in regard of its stimulating effect on positive selection signals which occur by blocking SHP-1 phosphatase activity.

GRB2 regulates THEMIS-mediated SHP-1 inhibition through multiples processes

The possibility that THEMIS would belong to the TCR signaling machinery was suggested early by its interaction with GRB2, an adapter protein involved in the recruitment of signaling proteins in proximity of many cell surface receptors, including the TCR and the BCR. Analysis of the THEMIS interactome by mass spectrometry indicates that GRB2 is by far the most important binding partner of THEMIS in both thymocytes [14] and peripheral T cells [41]. Stoichiometric analysis of THEMIS interaction with GRB2 indicates that approximately half of THEMIS proteins binds to GRB2 whereas about one tenth of GRB2 binds to THEMIS in thymocytes [42]. THEMIS also binds to the cytosolic adapter proteins GRAP2, although THEMIS-GRB2 complexes are ten times more abundant than THEMIS-GRAP2 complexes [14]. GRB2 contains an SH2 domain flanked by two SH3 domains. THEMIS interacts directly with GRB2 through its first proline rich region (PRR1) which recognizes one of GRB2 SH3 domain [9,43,44]. The reconstitution of THEMIS deficient thymocytes with transgene or retroviral constructs expressing mutated forms of THEMIS deficient for

the PRS fail to restore normal T cell development, highlighting the crucial role for THEMIS-GRB2 interaction on THEMIS signaling function *in vivo* [34,42]. The role of GRB2 on THEMIS-mediated signaling is complex and encompasses several molecular functions.

GRB2 operates as a molecular bridge between THEMIS and SHP-1

It was proposed that GRB2 could operate by facilitating the interaction between THEMIS and SHP-1 [36]. Mutation of key proline residues on THEMIS PRS that disrupt THEMIS-GRB2 interaction also prevent THEMIS from interacting with SHP-1 [36]. GRB2 interacts with SHP-1 through its N-terminal SH3 domain [36] and through its SH2 domain which recognize tyrosine residues on the C-terminal tail of SHP-1 tail that are phosphorylated by the kinase LCK after TCR stimulation [45]. Since the interaction between THEMIS and SHP-1 is not affected by LCK deficiency in Jurkat cells, the N-terminal domain of GRB2 was speculated to be important for anchoring SHP-1 to THEMIS-GRB2 complexes [36]. Although two studies suggest that THEMIS binds preferentially to the N-terminal domain of GRB2 [9,43], one study reported on the contrary that THEMIS predominantly interact with its C-terminal domain via its PRR1 [44], suggesting that THEMIS and SHP-1 could concomitantly bind to GRB2, which would operate in this context as a bridging structure between THEMIS and SHP-1. Arguing against this possibility, analysis of THEMIS-SHP-1 interaction in GRB2 deficient thymocytes showed that GRB2 is not required for this interaction [13]. GRB2 is also dispensable for THEMIS to inhibit SHP-1 catalytic activity *in vitro* [13]. Thus, although GRB2 might assemble concomitantly with THEMIS and SHP-1 in a tri-molecular complexes, it does not seem to be required for THEMIS-SHP-1 interaction.

GRB2 concentrates THEMIS in proximity of SHP-1 and its molecular target VAV1

Another potential function of GRB2 is to promote the recruitment of THEMIS to the Linker for Activation of T cells (LAT) [43,44], a transmembrane adapter protein which contributes to signal diversification in T cells by recruiting multiple signaling complexes that constitute seeds for distinct signaling pathways. The SH2 domain of GRB2 enables its recruitment to several tyrosine-phosphorylated ligands at the cell membrane, including LAT [46] and CD28 [47]. THEMIS proteins lacking the PRS fail to relocate to the immune synapse and to be recruited to LAT following TCR stimulation [44]. The functional consequence of THEMIS recruitment to LAT is unclear since it is presumably not required for THEMIS interaction with SHP-1, which occurs *in vitro* through THEMIS CABIT modules in the absence of intermediates molecules [13]. Following its recruitment to LAT, THEMIS is rapidly phosphorylated by the tyrosine kinase LCK on two tyrosine residues (Y540 and Y541 in human THEMIS and Y542 and Y543 in mouse THEMIS), suggesting that the recruitment of THEMIS to LAT might be important to stimulate THEMIS-mediated signaling function through phosphorylation-based events [44,48]. Supporting this possibility, the reconstitution of THEMIS deficient bone marrow cells with lentiviral particles encoding for THEMIS proteins containing point mutations of those residues fail to restore normal T cell development in

chimeric mouse experiments [44]. However, the phosphorylation of those residues was also shown to be important for the stabilization of THEMIS-GRB2 complexes suggesting that the ineffectiveness of those mutants might simply be the consequence of altered GRB2-THEMIS interaction [44]. Several substrates of SHP-1 have been characterized. While some (such as LCK and ZAP-70) associate to the TCR and are required early in the signaling cascades to initiate TCR signaling, others associate to LAT (such as SLP-76 and VAV1) and operate later to seed distinct pathways leading to specific functional outcomes. Thus, the binding to GRB2 may ensure that THEMIS is positioned more selectively to affect the activity of the cellular pool of SHP-1, which is proximity of some of its molecular targets in the LAT signalosome. Accordingly, LCK and ZAP-70 are not enriched in the THEMIS interactome as opposed to LAT, VAV1 and to a lesser extent SLP-76 [14]. Reciprocally, THEMIS is not detected in ZAP-70 and LCK interactomes in CD4⁺ T cells whereas it is identified as a binding partner of LAT and VAV1 in those cells [41,49,50]. THEMIS positively regulates VAV1 phosphorylation following TCR stimulation in thymocytes but has no detectable effect on SLP-76 [14], suggesting that a potential function of GRB2 could be to bring THEMIS in proximity of VAV1 to “protect” VAV1 from SHP-1-mediated dephosphorylation. VAV1 binds to one of GRB2 SH3 domains through an unconventional PRR region located inside the SH3 domain of VAV1, supporting the possibility that a tri-molecular complex between THEMIS, GRB2 and VAV1 might form around LAT [51]. Altogether, this suggests that rather than acting broadly on SHP-1 by decreasing the level of active phosphatases at the cellular level, THEMIS

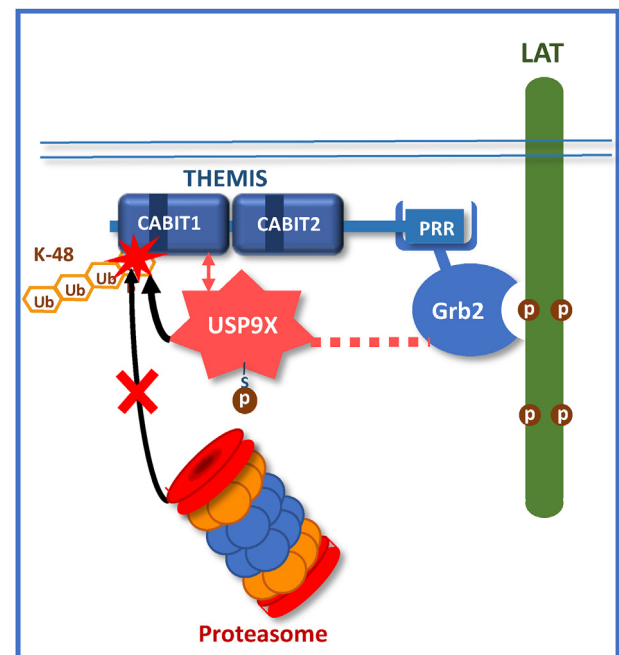


Fig. 2 GRB2 prevents proteasome-mediated degradation of THEMIS by promoting USP9X activity. The recruitment of USP9X to LAT through GRB2 and THEMIS leads to the phosphorylation of an activating serine residue on USP9X. USP9X stabilizes THEMIS expression upon TCR stimulation by removing K48-bound ubiquitin chains on THEMIS.

might operate more selectively by repressing the SHP-1-VAV1 signaling module associated to the regulation of specific cellular outcomes, such as positive selection in thymocytes. This is in agreement with recent studies discussed hereafter in this review highlighting the cooperative link between THEMIS, SHP-1 and VAV1 in the suppressive function of Treg cells [52]. On a theological point of view, this might explain why a mechanism that would repress SHP-1 at the signaling level might not be equivalent to a mechanism that would simply decrease the expression level of SHP-1.

GRB2 and THEMIS reciprocally protect each other from proteasome-mediated degradation

Recent work also identified an unexpected role for GRB2 in the control of THEMIS protein expression and stability [53]. THEMIS protein expression is increased in thymocytes undergoing positive selection, despite the strong decrease of THEMIS mRNA levels in those subsets, indicative of a post-translational control of THEMIS expression at this stage of T cell development [53]. 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 polyubiquitinated by K48 chain which operates by targeting THEMIS to proteasome degradation [Fig. 2]. The amount of ubiquitinated THEMIS decreases after TCR cross-linking in thymocytes and peripheral CD4⁺ T cells, suggesting that THEMIS could be deubiquitinated following TCR engagement. Mass spectrometry analysis of proteins that precipitate together with THEMIS in thymocytes led to identify several Ubiquitin-specific proteases (USP9X, USP24, USP19, and USP15), which are characterized for their ability to remove mono- or poly-ubiquitin chains on proteins [53]. Incubation of thymocytes with a pan-inhibitor of deubiquitinating enzymes (DUBs) results in a rapid and dramatic decrease in the amount of THEMIS protein, whereas the amount of other signaling proteins is not affected. A more specific focus on the enzyme USP9X showed that it directly interacts with THEMIS and that the CABIT1 module is important for this interaction [Fig. 2]. THEMIS ubiquitination is up-regulated in *Usp9x*^{-/-} thymocytes and is associated with a decreased expression of THEMIS proteins while THEMIS mRNA level remains unchanged. The recruitment of USP9X to LAT promotes its phosphorylation on one of its serine residues (S1600) and enhances its catalytic activity [54] [Fig. 2]. The interaction of USP9X with LAT was decreased following TCR engagement in thymocytes that were partially deficient for GRB2 (*Grb2*^{+/-} mice), suggesting that GRB2-THEMIS complexes serve as intermediates for the recruitment of USP9X to LAT [53]. The ubiquitination of THEMIS was exacerbated in *Grb2*^{+/-} thymocytes and correlated with a decreased expression of THEMIS in DP and SP thymocytes. Altogether those data indicate that GRB2 plays an indirect role in the stabilization of the fraction of THEMIS which is recruited to LAT following TCR engagement and operates by enabling the phosphorylation of USP9X which leads to its activation [Fig. 2]. This mechanism might favor the maintenance over time of THEMIS-mediated regulatory effect on TCR signaling and may explain early findings suggesting a role for THEMIS in sustaining TCR signals long enough to promote positive selection and commitment of DP thymocytes to the

CD4⁺ lineage [8]. Interestingly, a reciprocal effect of THEMIS over GRB2 stability was identified in thymocytes. GRB2 protein expression is reduced by almost two-fold in the absence of THEMIS which correlates with an enhanced ubiquitination of GRB2 [14]. Although the mechanism by which THEMIS controls GRB2 was not characterized, this effect seems to account at least for part of the defect observed in *Themis*^{-/-} mice since the partial decrease of GRB2 protein expression in thymocytes (using *Grb2* hemi-deficient mice) to a level that is comparable to that in *Themis*^{-/-} thymocytes results in a partial decrease of positive selection and to lower VAV1 phosphorylation level [14]. Moreover, THEMIS transgenic expression, leading to its overexpression in thymocytes and peripheral T cells, could enhance GRB2 expression in *Grb2*^{+/-} thymocytes. This could restore normal VAV1 phosphorylation level in *Grb2*^{+/-} thymocytes and efficient positive selection in *Grb2*^{+/-} mice, providing further evidences of the positive effect of THEMIS on TCR signaling during T cell development [14]. However, the modest effect of GRB2 hemi-deficiency on T cell development in comparison to the marked defect observed in *Themis*^{-/-} mice implies that the effect of THEMIS on SHP-1 accounts for most of the defect in T cell development observed in *Themis*^{-/-} mice.

Functions of THEMIS in peripheral T cells

One interesting characteristic of THEMIS is that its level of expression is highly variable according to T-cell subsets. THEMIS is expressed in pre-selection DP thymocytes and is further increased at early stages of positive selection in DP thymocytes expressing activation markers [53]. Its expression is then down-regulated as thymocytes mature to the SP stage and is decreased by a factor of two to three in peripheral T cells as compared to that in DP thymocytes, with two-fold higher amount in naïve CD8⁺ T cells than in naïve CD4⁺ T cells [53]. THEMIS is expressed at relatively low level in regulatory T cells (Tregs) as compared to that in conventional CD4⁺ T cells (four-folds decrease) [55] and is highly up-regulated in Th1 cells (seven-fold increase compared to that in naïve CD4⁺ T cells) [56]. The variable amount of THEMIS in T-cell subsets might be important to set distinct thresholds for T-cell activation or to amplify specific effector responses in a given immunological context. So far, little is known about the function of THEMIS in peripheral T cells mainly because *Themis*^{-/-} mice are lymphopenic, which may introduce bias on T-cell effector responses, and might develop compensatory mechanisms in the thymus that may altered peripheral T cell responsiveness to TCR stimulation. Except for two studies [57,58], investigations related to THEMIS function in peripheral T cells were performed using mouse models presenting germline deficiencies for THEMIS with the potential bias mentioned above.

THEMIS stimulates effector responses in CD4⁺ T cells

Initial studies showed that peripheral CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *Themis*^{-/-} mice fail to proliferate efficiently and to up-regulate activation markers in response to TCR stimulation [5]. Subsequent studies on THEMIS function in peripheral T

cells were performed using rat or mouse lines that contained spontaneous or chemically-induced mutations in the gene encoding THEMIS leading to the complete or nearly complete loss of THEMIS protein expression [52,59,60]. In both models, those mutations could recapitulate the block of T cell development which was observed in *Themis*^{-/-} mice. Total and naïve CD4⁺ T cells isolated from a rat Lewis line, containing a frameshift mutation in the *Themis* gene resulting in the introduction of a premature stop codon, produce higher level of IL-4, IL-10 and IL-17 in response to TCR stimulation, suggesting inhibitory function of THEMIS on CD4⁺ T cell responses [52]. However, mice that contain an I23N substitution in THEMIS protein, leading to nearly complete loss of THEMIS expression, exhibit a reduced development of experimental cerebral malaria (ECM) after infection with *Plasmodium berghei* ANKA, which was associated with a reduced production of inflammatory cytokines including IFN γ and TNF α by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to TCR stimulation [60]. These mice also fail to efficiently control bacterial load after infection with *Mycobacterium tuberculosis* infection [60]. More recent studies show that the proliferative defect of *Themis*^{-/-} CD4⁺ T cells in response to TCR stimulation is associated with a decreased ability of these cells to up-regulate the expression of the insulin receptor (IR), resulting in decreased glucose uptake and aerobic glycolysis [61]. Mechanistically, THEMIS would operate by enhancing the translocation in the nucleus of the transcription factor NFAT which, according to published chromatin immunoprecipitation-sequencing and RNA-sequencing data [62], promotes the transcription of IR. Whether THEMIS acts selectively on an NFAT-dependent metabolic pathway or more broadly on early TCR signaling events, the defect of NFAT being only the consequence of earlier TCR proximal defects, was not investigated in that study. Mutational analysis show that a fraction of THEMIS is translocated to the nucleus through its nuclear localization signal [43], suggesting that THEMIS could regulate transcription factors independently of its effect on proximal TCR signaling events. In addition, *in vivo* analysis in that study show that THEMIS deficient naïve CD4⁺ T cells are less potent to induce colitis following transfer into Rag-deficient mice [61]. Numbers of CD4⁺ T cells producing IFN γ and IL-17 are reduced in the mesenteric lymph nodes of mice that had received *Themis*^{-/-} CD4⁺ T cells, but not in the peripheral lymph nodes, suggesting a failure of those cells to migrate into the gut rather than to expand or differentiate into effector cells [61]. Altogether, with the consideration of potential caveats related to the use of germline deficient models, those studies suggest that THEMIS is required for the development of efficient effector functions in CD4⁺ T cells.

THEMIS is required for the homeostatic maintenance of CD8⁺ T cells

More recent studies investigate the role of THEMIS in peripheral T cells using a conditional knockout (cKO) mouse model which enables the deletion of *Themis* gene at late stages of T cell development, in SP thymocytes, resulting in the nearly complete loss of THEMIS expression in peripheral T cells [57,58]. THEMIS deficiency in those mice result in a 50% decrease of CD8⁺ T cell numbers at the periphery, whereas

the numbers of CD4⁺ T cells were not affected, suggestive of a role for THEMIS in peripheral CD8⁺ T cell maintenance. Experiments showed that THEMIS is required for lymphopenia induced proliferation (LIP) and for the acquisition of an activated phenotype resulting from LIP following transfer of CD8⁺ T cells from into Rag deficient host [57]. THEMIS also stimulates the expansion and the effector responses of OT-1 CD8⁺ T cells following infection with *Listeria monocytogenes* [57]. The maintenance of CD8⁺ T cells and LIP require the integration of signals triggered on one hand by the TCR, upon weak stimulation delivered through self-pMHC interactions, and on the other hand by specific cytokine receptors involved in CD8⁺ T cell homeostasis [63]. Stimulation of THEMIS deficient CD8⁺ T cells expressing the OT-1 TCR with peptides of different affinities ranges showed no significant effect of THEMIS deficiency on T cell responses, such as proliferation, production of TNF α and apoptosis, and on TCR signaling events such the phosphorylation of ERK, suggesting modest regulatory function of THEMIS on TCR signals when those emanate exclusively from the TCR in the absence of co-modulatory signals [57]. In a subsequent study, authors show that the proliferation of OT1⁺ CD8⁺ T cells was also reduced in the absence of THEMIS, when these cells were transferred into β 2m-deficient host lacking pMHC-I complexes, indicating potential stimulatory function of THEMIS on cytokine-driven homeostatic maintenance of peripheral CD8⁺ T cells [58]. Further analysis performed in that study show that THEMIS is required to stimulate the proliferation of naïve OT1⁺ CD8⁺ T cells cultured *in vitro* with IL-2 or IL-15, two cytokines which have important function in the maintenance of CD8⁺ T cells [64]. Interestingly, *Themis* cKO CD8⁺ T cells showed normal response to IL-7, another cytokine important for peripheral CD8⁺ T cell maintenance, indicating that THEMIS operates selectively on a subset of receptors from the common cytokine receptor γ -chain (γ c) family [57]. The loss of THEMIS was associated with an impaired metabolic readjustment in response to these cytokines, characterized by a slower glycolytic rate and a moderately reduced serine biosynthesis [58]. Analysis of proximal signaling events triggered by IL-2 and IL-15 stimulation showed that THEMIS positively regulates the phosphorylation of the kinases JAK1 and JAK3 and of the transcription factor STAT5 [58]. Finally, these signaling defects as well the defects in CD8⁺ T cell homeostasis and proliferative responses could be alleviated when *Ptpn6* and *Themis* gene were both disrupted in peripheral T cells in conditional knock-out mouse models [57,58], confirming the repressive effect of THEMIS on SHP-1-mediated signaling previously reported in thymocytes and indicating further that this mechanism could possibly be engage in other T-cell subsets through TCR-independent signaling processes.

THEMIS cooperates with VAV1 to promote optimal suppressive function in Treg cells

Following the initial characterization of THEMIS, one study on the Brown-Norway (BN) rat line identified a spontaneous frameshift mutation in the gene encoding *Themis*, leading to the complete loss of THEMIS expression, which was associated with the spontaneous development of an inflammatory bowel disease (IBD) [59]. The secretion of IL-17 and IL-10 by

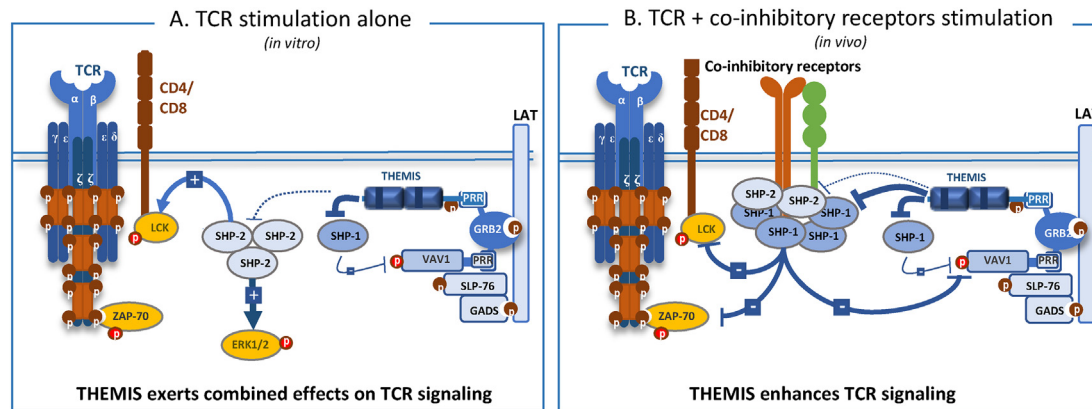


Fig. 3 The effect of THEMIS on TCR signaling is determined by the relative amounts of SHP-1 and SHP-2 that are recruited to TCR signaling complexes. A) THEMIS represses SHP-1 more strongly than SHP-2 yet, upon TCR stimulation alone (representative of TCR cross-linking *in vitro*), the positive effects of SHP-2 on TCR signaling predominates over SHP-1-mediated inhibitory effects. This might result in combined THEMIS-dependent outcomes on TCR signaling. B) The amount of SHP-1 that is recruited in proximity of TCR signaling complexes is increased following stimulation of co-inhibitory receptors. In the context of those receptors, SHP-2 operates as a negative regulator of TCR signaling. THEMIS might enhance TCR signaling by repressing the fraction of SHP-1 and SHP-2 recruited by those receptors.

THEMIS-deficient CD4⁺ T cells was exacerbated in response to TCR stimulation. Further analysis showed that THEMIS was required to promote optimal Treg suppressive function and that the prevalence of the disease could be reduced following transfer of wild-type Treg into the mutated rat lines [59]. In a following up study, authors showed that the same mutation transferred on the rat Lewis (LEW) background could neither impair Treg suppressive functions nor induce pathological manifestations, suggestive of an epistatic phenomenon occurring in the BN genetic background [52]. However, THEMIS-deficient CD4⁺ T cells from the LEW genetic background produced exacerbated amount of IL-17 and IL-10 in response to TCR stimulation [52], indicating that intrinsic defect associated to conventional CD4⁺ T cells could not alone explain the development of the disease. Because BN rats harbor a peculiar VAV1 variant (VAV1-W63) with reduced adaptor function and signaling capacities [65] and because THEMIS was shown to positively regulate VAV1 activity in thymocytes [14,43], authors hypothesized that the effect of THEMIS deficiency on BN Treg function could result from a cumulative impairment of the TCR signaling due to combined association of THEMIS deficiency with the presence of the VAV1-W63 variant. Accordingly, the introgression in the BN rat line of a 117-Kb interval bearing the LEW VAV1 variant could protect from IBD development and restore normal Treg suppressive function [59]. Although the precise influence of VAV1 in this epistasis phenomenon remains to be validated through gene-targeting approaches, this study suggests that the combination of genetic or epigenetic variants affecting concomitantly THEMIS and VAV1 expression could regulate the susceptibility to immune-based disorders. This might be physiologically relevant since VAV1 mRNA expression levels are highly variable in PBMCs from multiple sclerosis patients and healthy donors depending on VAV1 haplotypes [66]. The relatively low expression level of THEMIS in Treg cells as compared to conventional CD4⁺ T cells might contribute to

the reduced responsiveness of those cells to TCR stimulation [55,67]. Accordingly, the enforced expression of THEMIS in Treg cells through transgenic expression exacerbates their suppressive function in response to TCR engagement [55]. Thus, although THEMIS seems to stimulate Treg responses in VAV1 insufficient context, its expression in those cells is maintained at relatively low level possibly to reduce the responsiveness of those cells which are intrinsically highly self-reactive.

Does THEMIS regulate T cells through TCR-independent mechanism?

Although THEMIS interactome analysis by mass spectrometry indicates that THEMIS interacts mainly with proteins involved in TCR signaling [14], several observations suggest that THEMIS might not be operating exclusively downstream of the TCR and that additional stimulations might be required to promote THEMIS-dependent effect on TCR signaling *in vivo*. The loss of THEMIS has relatively little impact on TCR signaling in thymocytes and peripheral T cells when cells are stimulated promptly after purification with anti-CD3 antibodies [6–9,57]. The stimulation of peripheral CD8⁺ T cells with IL-2 or IL-15 also leads to reduced JAK-mediated signaling in the absence of THEMIS [58]. Finally, the discordancy between the effects of THEMIS on TCR signaling observed *in vitro* following TCR cross-linking with pMHC tetramers [35,36] and *in vivo* in the context of T cell development also support the possibility that THEMIS might operate independently of the TCR through additional receptors which may contribute to regulate TCR signal and selection processes. One striking observation is that THEMIS enhances the phosphorylation of ZAP-70 following thymocyte stimulation with concanavalin A, a reagent which engages multiple cell-surface molecules in addition to the TCR, but has no detectable effect on ZAP-70 phosphorylation following TCR cross-linking alone [13]. It was speculated that concanavalin A could elicit the

production of reactive oxygen species (ROS), which is poorly induced by TCR cross-linking in thymocytes [68], and which enables THEMIS to block SHP-1 phosphatase activity by promoting/stabilizing its cysteine active site in an oxidized state [13]. Accordingly, THEMIS was shown to enhance ZAP-70 and LCK phosphorylation following TCR cross-linking when cells were cultured in conditions that elicit ROS production [13]. However, the effects reported for THEMIS on LCK and ZAP-70 phosphorylation remained modest which calls for additional explanations to the defect of TCR signaling observed in THEMIS deficient thymocytes in response to concanavalin A [13]. It was proposed that SHP-1 operates downstream of the TCR in negative feedback loops which are engaged upon TCR recognition of weak affinity ligands [15]. Those feedback loops involve the kinase LCK which recruits phosphorylated SHP-1 through its SH2 domains upon weak agonists stimulation [15]. Upon recognition of strong agonist ligands by the TCR, LCK undergoes serine phosphorylation at position 59 that prevent the recruitment of SHP1 and subsequent TCR desensitization [15]. However, more recent analysis of knock-in mice in which the serine 59 was replaced by an alanine, revealed no detectable role of this feedback loop on T cell development and on the up-regulation of activation markers following TCR stimulation with agonists of different affinity ranges [36]. More generally, analysis based on SHP-1 deficient mice suggest that SHP-1 has a relatively mild impact on T cell responses *in vitro* upon TCR cross-linking [69–71]. This correlates with recent mass spectrometry results which fail to detect any robust interaction of SHP-1 with TCR signaling proteins following TCR stimulation with anti-CD3 antibodies [41]. However, the loss of SHP-1 leads to exacerbated T cell responses *in vivo* following immunization with self and foreign antigens [69,71–74]. This suggests that SHP-1 might function more effectively in feedback loops triggered by inhibitory receptors [17–19,75,76], which might enrich SHP-1 in proximity of TCR signaling complexes [Fig. 3]. Alternatively, SHP-1 might function in regulatory loops triggered by cytokine receptors, independently of the TCR [69,71]. A consequence of such mechanisms could be that although THEMIS inhibits SHP-1 predominantly over SHP-2, the functional consequence of inhibiting SHP-2 might predominate over that of inhibiting SHP-1 in the absence of co-inhibitory receptor stimulation [Fig. 3]. ITIM- and ITSM-containing receptors that recruit SHP-1 and SHP-2 are expressed during T cell development particularly at the stage of positive selection [77–79], suggesting that THEMIS might stimulate positive selection by blocking inhibitory signals transmitted by those receptors on TCR signaling. Of note, it was suggested recently that the bZIP factor of Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) could interact with THEMIS and prevent the colocalization of THEMIS with PD-1 in T cells [80]. Mechanisms that repress PD-1 binding to its ligand PD-L1 [81] or that block TIM-3-mediated signaling [82] have been previously described, supporting the idea that those receptors are themselves submitted to a tight control of their activity. The possibility that THEMIS would operate as a natural repressor of ITIM-containing receptors could be of potential interest in the clinical field given the recent development of strategies based on the inhibition of these receptors in cancer immunotherapy.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors thank Loïc Dupré, Paul Love and Abdelhadi Saoudi for helpful comments and suggestions. This work was supported by INSERM; the Foundation ARSEP; the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); the Agence Nationale de la Recherche (ANR-20-CE15-0002); the China Scholarship Council (PhD fellowship for C.Y.); the French Ministry of Higher Education and Research (PhD fellowship for S.M.).

REFERENCES

- [1] Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 2014;14:377–91.
- [2] Mandl JN, Monteiro JP, Vrizekoop N, Germain RN. T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity* 2013;38:263–74.
- [3] Persaud SP, Parker CR, Lo WL, Weber KS, Allen PM. Intrinsic CD4(+) T cell sensitivity and response to a pathogen are set and sustained by avidity for thymic and peripheral complexes of self peptide and MHC. *Nat Immunol* 2014;15:266–74.
- [4] Gaud G, Lesourne R, Love PE. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2018;18:485–97.
- [5] Fu G, Vallee S, Rybakina V, McGuire MV, Ampudia J, Brockmeyer C, et al. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nat Immunol* 2009;10:848–56.
- [6] Johnson AL, Aravind L, Shulzhenko N, Morgun A, Choi SY, Crockford TL, et al. Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat Immunol* 2009;10:831–9. Erratum in: *Nat Immunol* 2010;11:97.
- [7] Kakugawa K, Yasuda T, Miura I, Kobayashi A, Fukiage H, Satoh R, et al. A novel gene essential for the development of single positive thymocytes. *Mol Cell Biol* 2009;29:5128–35.
- [8] Lesourne R, Uehara S, Lee J, Song KD, Li L, Pinkhasov J, et al. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol* 2009;10:840–7. Erratum in: *Nat Immunol* 2010;11:97.
- [9] Patrick MS, Oda H, Hayakawa K, Sato Y, Eshima K, Kirikae T, et al. Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16345–50.
- [10] Choi S, Cornall R, Lesourne R, Love PE. THEMIS: two models, different thresholds. *Trends Immunol* 2017;38:622–32.
- [11] Tashiro K, Tsunematsu T, Okubo H, Ohta T, Sano E, Yamauchi E, et al. GAREM, a novel adaptor protein for growth factor receptor-bound protein 2, contributes to cellular transformation through the activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *J Biol Chem* 2009;284:20206–14.
- [12] Taniguchi T, Tanaka S, Ishii A, Watanabe M, Fujitani N, Sugeo A, et al. A brain-specific Grb2-associated regulator of extracellular signal-regulated kinase (Erk)/Mitogen-activated protein kinase (MAPK) (GAREM) subtype, GAREM2,

- contributes to neurite outgrowth of neuroblastoma cells by regulating Erk signaling. *J Biol Chem* 2013;288:29934–42.
- [13] Choi S, Warzecha C, Zvezdova E, Lee J, Argenty J, Lesourne R, et al. THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1. *Nat Immunol* 2017;18:433–41.
- [14] Zvezdova E, Mikolajczak J, Garreau A, Marcellin M, Rigal L, Lee J, et al. Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Sci Signal* 2016;9:ra51.
- [15] Stefanova I, Hemmer B, Vergelli M, Martin R, Biddison WE, Germain RN. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol* 2003;4:248–54.
- [16] Hebeisen M, Baitsch L, Presotto D, Baumgaertner P, Romero P, Michielin O, et al. SHP-1 phosphatase activity counteracts increased T cell receptor affinity. *J Clin Invest* 2013;123:1044–56.
- [17] Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol* 2003;4:670–9.
- [18] Lebbink RJ, de Ruiter T, Verbrugge A, Bril WS, Meyaard L. The mouse homologue of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 is an inhibitory receptor that recruits Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-2, but not SHP-1. *J Immunol* 2004;172:5535–43.
- [19] Celis-Gutierrez J, Blattmann P, Zhai Y, Jarmuzynski N, Ruminski K, Gregoire C, et al. Quantitative interactomics in primary T cells provides a rationale for concomitant PD-1 and BTLA coinhibitor blockade in cancer immunotherapy. *Cell Rep* 2019;27:3315–30. e7.
- [20] Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol* 2012;13:439–47.
- [21] Bruhns P, Marchetti P, Fridman WH, Vivier E, Daeron M. Differential roles of N- and C-terminal immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs during inhibition of cell activation by killer cell inhibitory receptors. *J Immunol* 1999;162:3168–75.
- [22] Yang J, Liu LJ, He DD, Song X, Liang XS, Zhao ZJ, et al. Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* 2003;278:6516–20.
- [23] Plas DR, Johnson R, Pingel JT, Matthews RJ, Dalton M, Roy G, et al. Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science* 1996;272:1173–6.
- [24] Chiang GG, Sefton BM. Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 2001;276:23173–8.
- [25] Matalon O, Fried S, Ben-Shmuel A, Pauker MH, Joseph N, Keizer D, et al. Dephosphorylation of the adaptor LAT and phospholipase C-gamma by SHP-1 inhibits natural killer cell cytotoxicity. *Sci Signal* 2016;9:ra54.
- [26] Binstadt BA, Billadeau DD, Jevremovic D, Williams BL, Fang N, Yi TL, et al. SLP-76 is a direct substrate of SHP-1 recruited to killer cell inhibitory receptors. *J Biol Chem* 1998;273:27518–23.
- [27] Stebbins CC, Watzl C, Billadeau DD, Leibson PJ, Burshtyn DN, Long EO. Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol Cell Biol* 2003;23:6291–9.
- [28] Mesecke S, Urlaub D, Busch H, Eils R, Watzl C. Integration of activating and inhibitory receptor signaling by regulated phosphorylation of Vav1 in immune cells. *Sci Signal* 2011;4:ra36.
- [29] Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* 2012;209:1201–17.
- [30] Li J, Jie HB, Lei Y, Gildener-Leapman N, Trivedi S, Green T, et al. PD-1/SHP-2 inhibits Tc1/Th1 phenotypic responses and the activation of T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2015;75:508–18.
- [31] Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 2017;355:1428–33.
- [32] Nguyen TV, Ke Y, Zhang EE, Feng GS. Conditional deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in thymocytes suppresses both pre-TCR and TCR signals. *J Immunol* 2006;177:5990–6.
- [33] Frearson JA, Alexander DR. The phosphotyrosine phosphatase SHP-2 participates in a multimeric signaling complex and regulates T cell receptor (TCR) coupling to the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in Jurkat T cells. *J Exp Med* 1998;187:1417–26.
- [34] Zvezdova E, Lee J, El-Khoury D, Barr V, Akpan I, Samelson L, et al. In vivo functional mapping of the conserved protein domains within murine Themis1. *Immunol Cell Biol* 2014;92:721–8.
- [35] Fu G, Casas J, Rigaud S, Rybakina V, Lambalez F, Brzostek J, et al. Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* 2013;504:441–5.
- [36] Paster W, Bruger AM, Katsch K, Gregoire C, Roncagalli R, Fu G, et al. A THEMIS:SHP1 complex promotes T-cell survival. *EMBO J* 2015;34:393–409.
- [37] Zhang SQ, Yang WT, Kontaridis MI, Bivona TG, Wen GY, Araki T, et al. Shp2 regulates Src family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell* 2004;13:341–55.
- [38] Kawabuchi M, Satomi Y, Takao T, Shimonishi Y, Nada S, Nagai K, et al. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* 2000;404:999–1003.
- [39] Saveliev A, Vanes L, Ksionda O, Rapley J, Smerdon SJ, Rittinger K, et al. Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in T cell development and activation. *Sci Signal* 2009;2:ra83.
- [40] Mariathasan S, Zakarian A, Bouchard D, Michie AM, Zuniga-Pflucker JC, Ohashi PS. Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* 2001;167:4966–73.
- [41] Voisinne G, Kersse K, Chaoui K, Lu L, Chaix J, Zhang L, et al. Quantitative interactomics in primary T cells unveils TCR signal diversification extent and dynamics. *Nat Immunol* 2019;20:1530–41.
- [42] Okada T, Nitta T, Kaji K, Takashima A, Oda H, Tamehiro N, et al. Differential function of themis CABIT domains during T cell development. *PLoS One* 2014;9:e89115.
- [43] Lesourne R, Zvezdova E, Song KD, El-Khoury D, Uehara S, Barr VA, et al. Interchangeability of themis1 and themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J Immunol* 2012;189:1154–61.
- [44] Paster W, Brockmeyer C, Fu G, Simister PC, de Wet B, Martinez-Riano A, et al. GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J Immunol* 2013;190:3749–56.
- [45] Minoo P, Zadeh MM, Rottapel R, Lebrun JJ, Ali S. A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1C-terminal tyrosines in cytokine signaling. *Blood* 2004;103:1398–407.
- [46] Zhang WG, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 1998;92:83–92.

- [47] Schneider H, Cai YC, Prasad KVS, Shoelson SE, Rudd CE. T-cell antigen Cd28 binds to the Grb-2/Sos complex, regulators of P21(Ras). *Eur J Immunol* 1995;25:1044–50.
- [48] Brockmeyer C, Paster W, Pepper D, Tan CP, Trudgian DC, McGowan S, et al. T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *J Biol Chem* 2011;286:7535–47.
- [49] Roncagalli R, Hauri S, Fiore F, Liang YM, Chen Z, Sansoni A, et al. Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. *Nat Immunol* 2014;15:384–92.
- [50] Gaud G, Roncagalli R, Chaoui K, Bernard I, Familiades J, Colacios C, et al. The costimulatory molecule CD226 signals through VAV1 to amplify TCR signals and promote IL-17 production by CD4(+) T cells. *Sci Signal* 2018;11:eaar3083.
- [51] Nishida M, Nagata K, Hachimori Y, Horiuchi M, Ogura K, Mandiyan V, et al. Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains. *EMBO J* 2001;20:2995–3007.
- [52] Pedros C, Gaud G, Bernard I, Kassem S, Chabod M, Lagrange D, et al. An epistatic interaction between Themis1 and Vav1 modulates regulatory T cell function and inflammatory bowel disease development. *J Immunol* 2015;195:1608–16.
- [53] Garreau A, Blaize G, Argenty J, Rouquie N, Tourdes A, Wood SA, et al. Grb2-mediated recruitment of USP9X to LAT enhances themis stability following thymic selection. *J Immunol* 2017;199:2758–66.
- [54] Naik E, Dixit VM. Usp9X is required for lymphocyte activation and homeostasis through its control of ZAP70 ubiquitination and PKCbeta kinase activity. *J Immunol* 2016;196:3438–51.
- [55] Duguet F, Locard-Paulet M, Marcellin M, Chaoui K, Bernard I, Andreoletti O, et al. Proteomic analysis of regulatory T cells reveals the importance of Themis1 in the control of their suppressive function. *Mol Cell Proteomics* 2017;16:1416–32.
- [56] Howden AJM, Hukelmann JL, Brenes A, Spinelli L, Sinclair LV, Lamond AI, et al. Quantitative analysis of T cell proteomes and environmental sensors during T cell differentiation. *Nat Immunol* 2019;20:1542–54.
- [57] Brzostek J, Gautam N, Zhao X, Chen EW, Mehta M, Tung DWH, et al. T cell receptor and cytokine signal integration in CD8(+) T cells is mediated by the protein Themis. *Nat Immunol* 2020;21:186–98.
- [58] Liu Y, Cong Y, Niu Y, Yuan Y, Tan F, Lai Q, et al. Themis is indispensable for IL-2 and IL-15 signaling in T cells. *Sci Signal* 2022;15:eabi9983.
- [59] Chabod M, Pedros C, Lamouroux L, Colacios C, Bernard I, Lagrange D, et al. A spontaneous mutation of the rat Themis gene leads to impaired function of regulatory T cells linked to inflammatory bowel disease. *PLoS Genet* 2012;8:e1002461.
- [60] Torre S, Faucher SP, Fodil N, Bongfen SE, Berghout J, Schwartzentruber JA, et al. THEMIS is required for pathogenesis of cerebral malaria and protection against pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2015;83:759–68.
- [61] Prasad M, Brzostek J, Gautam N, Balyan R, Rybakina V, Gascoigne NRJ. Themis regulates metabolic signaling and effector functions in CD4(+) T cells by controlling NFAT nuclear translocation. *Cell Mol Immunol* 2021;18:2249–61.
- [62] Martinez GJ, Pereira RM, Aijo T, Kim EY, Marangoni F, Pipkin ME, et al. The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells. *Immunity* 2015;42:265–78.
- [63] Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 2008;29:848–62.
- [64] Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* 2009;9:480–90.
- [65] Colacios C, Casemayou A, Dejean AS, Gaits-Iacovoni F, Pedros C, Bernard I, et al. The p.Arg63Trp polymorphism controls Vav1 functions and Foxp3 regulatory T cell development. *J Exp Med* 2011;208:2183–91.
- [66] Jagodic M, Colacios C, Nohra R, Dejean AS, Beyeen AD, Khademi M, et al. A role for VAV1 in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Sci Transl Med* 2009;1:10ra21.
- [67] Yan DP, Farache J, Mathis D, Benoist C. Imbalanced signal transduction in regulatory T cells expressing the transcription factor FoxP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:14942–7.
- [68] 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* 2000;347:173–81.
- [69] Johnson DJ, Pao LI, Dhanji S, Murakami K, Ohashi PS, Neel BG. Shp1 regulates T cell homeostasis by limiting IL-4 signals. *J Exp Med* 2013;210:1419–31.
- [70] Mercadante ER, Lorenz UM. T cells deficient in the tyrosine phosphatase SHP-1 resist suppression by regulatory T cells. *J Immunol* 2017;199:129–37.
- [71] Kamata T, Yamashita M, Kimura M, Murata K, Inami M, Shimizu C, et al. Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J Clin Invest* 2003;111:109–19.
- [72] Mauldin IS, Tung KS, Lorenz UM. The tyrosine phosphatase SHP-1 dampens murine Th17 development. *Blood* 2012;119:4419–29.
- [73] Deng CS, Minguela A, Hussain RZ, Lovett-Racke AE, Radu C, Ward ES, et al. Expression of the tyrosine phosphatase Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 determines T cell activation threshold and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002;168:4511–8.
- [74] Stromnes IM, Fowler C, Casamina CC, Georgopoulos CM, McAfee MS, Schmitt TM, et al. Abrogation of src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 in tumor-specific T cells improves efficacy of adoptive immunotherapy by enhancing the effector function and accumulation of short-lived effector T cells in vivo. *J Immunol* 2012;189:1812–25.
- [75] Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 2004;173:945–54.
- [76] Sathish JG, Walters J, Luo JC, Johnson KG, LeRoy FG, Brennan P, et al. CD22 is a functional ligand for SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase-1 in primary T cells. *J Biol Chem* 2004;279:47783–91.
- [77] Han P, Goularte OD, Rufner K, Wilkinson B, Kaye J. An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J Immunol* 2004;172:5931–9.
- [78] Keir ME, Latchman YE, Freeman GJ, Sharpe AH. Programmed death-1 (PD-1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. *J Immunol* 2005;175:7372–9.
- [79] Verhagen J, Genolet R, Britton GJ, Stevenson BJ, Sabatos-Peyton CA, Dyson J, et al. CTLA-4 controls the thymic development of both conventional and regulatory T cells through modulation of the TCR repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E221–30.

-
- [80] Kinoshita H, Yasunaga JI, Shimura K, Miyazato P, Onishi C, Iyoda T, et al. HTLV-1 bZIP factor enhances T-cell proliferation by impeding the suppressive signaling of Co-inhibitory receptors. *PLoS Pathog* 2017;13:e1006120.
- [81] Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki I, Shimizu K, Maeda TK, Takemoto T, et al. Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science* 2019;364:558–66.
- [82] Rangachari M, Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Karman J, Chen A, et al. Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat Med* 2012;18:1394–400.

Titre : Analyse des capacités modulatrices de la protéine THEMIS sur la signalisation et les fonctions biologiques du checkpoint immunitaire BTLA

Mots clés : Lymphocytes T, Signalisation, activation, Points de contrôle immunitaires, développement des lymphocytes T, homeostasie

Résumé : Les checkpoints immunitaires sont des récepteurs qui régulent négativement les réponses des lymphocytes T déclenchées par les récepteurs d'antigène (TCR) par les récepteurs de co-stimulations. Les thérapies basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux visant à bloquer ces récepteurs ont considérablement amélioré l'efficacité des thérapies contre le cancer. Le checkpoint immunitaire BTLA régule l'activation des lymphocytes T et la maintenance des lymphocytes T CD8⁺ en périphérie en inhibant la signalisation émanant du TCR par l'intermédiaire de la tyrosine-phosphatase à domaine SH2, SHP-1. BTLA est exprimé au sur les lymphocytes T en cours de développement dans le thymus au stade de la sélection positive mais on ignore ses fonctions biologiques dans ce contexte. THEMIS est une protéine de signalisation essentielle au développement des lymphocytes T et au maintien des lymphocytes T CD8⁺ dans les tissus périphériques. La délétion du gène codant pour THEMIS est associée à un défaut de la sélection positive des thymocytes et à une lymphopénie. THEMIS stimule la sélection positive et le maintien des lymphocytes T CD8⁺ en inhibant l'activité catalytique de SHP-1. Nous avons émis l'hypothèse que THEMIS puisse stimuler la sélection positive et le maintien des lymphocytes T CD8⁺ en réprimant les fonctions inhibitrices de BTLA. Nous avons montré que la délétion du gène codant pour THEMIS dans des modèles de souris accroît la capacité de BTLA à inhiber l'activation et la différenciation des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺. THEMIS est recruté à BTLA et réprime l'activité phosphatase de SHP-1 en augmentant l'oxydation de sa cystéine catalytique. La déficience en THEMIS n'a cependant pas d'effet sur les fonctions inhibitrices du checkpoint immunitaire PD-1 qui dépend principalement de la tyrosine-phosphatase SHP-2. Nous montrons que la délétion du gène codant pour BTLA restaure la sélection positive dans les souris déficientes pour THEMIS, indiquant que THEMIS stimule la sélection positive en bloquant la signalisation inhibitrice de BTLA. THEMIS stimule aussi le maintien des lymphocytes T CD8⁺ périphériques en diminuant la capacité de BTLA à inhiber les signaux de survie déclenchés par les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15. Ces résultats suggèrent que les signaux inhibiteurs déclenchés par les checkpoints immunitaires dépendent des interactions avec leurs ligands mais sont aussi contraints par des protéines intracellulaires qui modulent le seuil à partir duquel ces récepteurs sont capables d'inhiber les lymphocytes T. Ces résultats ont des conséquences dans la compréhension des mécanismes thérapeutiques impliqués dans le traitement du cancer et dans les mécanismes liés à l'émergence des maladies auto-immunes

Title: Analysis of THEMIS Protein Modulatory Capacities on Signaling and Biological Functions of Immune Checkpoints BTLA

Key words: T lymphocyte, signaling, activation, immune checkpoints, T cell development, homeostasis

Abstract: Immune checkpoints are receptors that negatively regulate T lymphocyte responses triggered by antigen receptors (TCR) via co-stimulatory receptors. Therapies based on the use of monoclonal antibodies targeting these receptors have significantly improved the efficacy of cancer therapies. The immune checkpoint BTLA regulates T lymphocyte activation and maintenance of peripheral CD8⁺ T lymphocytes by inhibiting signaling emanating from the TCR through the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase, SHP-1. BTLA is expressed on T lymphocytes during development in the thymus at the positive selection stage, but its biological functions in this context are unknown. THEMIS is a signaling protein essential for T lymphocyte development and maintenance of CD8⁺ T lymphocytes in peripheral tissues. Deletion of the gene encoding THEMIS is associated with a defect in positive selection of thymocytes and lymphopenia. THEMIS promotes positive selection and maintenance of CD8⁺ T lymphocytes by inhibiting the catalytic activity of SHP-1. We hypothesized that THEMIS may promote positive selection and maintenance of CD8⁺ T lymphocytes by repressing the inhibitory functions of BTLA. We have shown that deletion of the gene encoding THEMIS in mouse models increases BTLA's ability to inhibit activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. THEMIS is recruited to BTLA and represses SHP-1 phosphatase activity by increasing oxidation of its catalytic cysteine. Deficiency in THEMIS, however, has no effect on the inhibitory functions of the immune checkpoint PD-1, which primarily depends on the tyrosine phosphatase SHP-2. We show that deletion of the gene encoding BTLA restores positive selection in THEMIS-deficient mice, indicating that THEMIS promotes positive selection by blocking BTLA's inhibitory signaling. THEMIS also promotes maintenance of peripheral CD8⁺ T lymphocytes by reducing BTLA's ability to inhibit survival signals triggered by IL-2 and IL-15 receptors. These results suggest that inhibitory signals triggered by immune checkpoints depend on interactions with their ligands but are also constrained by intracellular proteins that modulate the threshold at which these receptors are able to inhibit T lymphocytes. These findings have implications for understanding the therapeutic mechanisms involved in cancer treatment and the mechanisms underlying the emergence of autoimmune diseases.