

Université de Montréal

**Étude de l'implication de la force du signal transmis
par le récepteur des cellules T dans le développement et
la survie des lymphocytes T mémoires**

Par Julie LEIGNADIER

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en microbiologie et immunologie

Décembre 2009

© Julie LEIGNADIER

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse est intitulée :

**Étude de l'implication de la force du signal transmis
par le récepteur des cellules T dans le développement et
la survie des lymphocytes T mémoires**

Présenté par :
Julie LEIGNADIER

A été évalué par le jury composé des personnes suivantes :

Docteur Rafick Pierre Sekaly, président rapporteur

Docteure Nathalie Labrecque, directrice de recherche

Docteure Naglaa Shoukry, membre du jury

Docteur Grégoire Lauvau, examinateur externe

Docteure Trang Hoang, représentante du doyen de la FES

TABLES DES MATIERES

TABLES DES MATIERES	i
RESUME.....	v
ABSTRACT	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xiv
GENERALITE ET ACTEURS DU SYSTEME IMMUNITAIRE.....	1
I. <i>Les cellules présentatrices d'antigène.....</i>	2
A. Structure des molécules du CMH.....	2
B. Mécanisme de présentation des antigènes par les CMH.....	3
II. <i>Les lymphocytes T.....</i>	4
A. Les cellules T CD4 ⁺	5
1. Les Th1/Th2	5
2. Les Th17	6
3. Les Th folliculaires (Tfh).....	6
4. Les LT régulateurs (Treg).....	6
B. Les cellules T CD8 ⁺	7
III. <i>La réponse immunitaire adaptative des LT CD8⁺.....</i>	7
LA REPONSE DES LYMPHOCYTES T A L'ANTIGENE	9
I. <i>La reconnaissance de l'antigène.....</i>	9
A. Maturation des LT	9
B. Structure du RCT.....	10
C. La transmission du signal RCT	11
1. Caractéristiques physico-chimiques de l'interaction du RCT/CMH/peptide.....	11
a- Le modèle de « kinetic proofreading ».....	12
b- Le modèle de l'engagement en série (« serial triggering »).....	14
2. L'importance de la durée d'interaction entre le LT et la CPA.....	15
II. <i>Activation du RCT.....</i>	17
A. La synapse immunologique.....	18
B. La signalisation du RCT	21
C. Les molécules de costimulation.....	22
1. Les membres de la superfamille des immunoglobulines.....	23
a- CD28/CTLA-4	24
b- ICOS/ICOSL.....	25
c- PD-1/PD-L1	26
2. Membres de la superfamille TNFR.....	26
a- OX40/OX40L	26
b- 4-1BB/4-1BBL.....	27
c- CD40/CD40L.....	28
D. Les molécules d'adhésions	29
III. <i>Le pic de la réponse immune.....</i>	30

A.	Phase d'expansion	30
1.	Les cellules T effectrices	31
a-	Les LT CD4 ⁺	31
b-	Les LT CD8 ⁺	31
2.	Activité cytotoxique des LTe CD8 ⁺	32
a-	La perforine	32
b-	Les granzymes	33
(i)	La granzyme A	33
(ii)	La granzyme B	34
c-	FAS/FASL et TRAIL/TRAILR	34
B.	La phase de contraction	35
1.	Les mécanismes de l'apoptose	35
a-	Les récepteurs apoptotiques	35
b-	Les caspases	36
2.	Les différentes voies d'apoptose	36
a-	La voie apoptotique extrinsèque	36
b-	La voie de signalisation intrinsèque	37
3.	La mort par apoptose des LTe	38
a-	L'apoptose par AICD	38
(i)	Carence en cytokine	39
b-	Suicide ou homicide?	40
c-	L'apoptose par ACAD	40
d-	Autres mécanismes régulant l'apoptose	40
(i)	La voie NFkB	41
(ii)	La voie HPK1/HPK1-C	41
(iii)	Les cathepsines	41
(iv)	La famille Nur77	42
C.	Les mécanismes de sélection : la vie ou la mort??	43
1.	La différenciation linéaire	44
2.	Modèle de différenciation divergente	46
3.	Modèle de différenciation progressif	48
D.	Facteurs intrinsèques et extrinsèques régulant le développement des LTm	51
1.	Facteurs intrinsèques	51
a-	Les molécules de surface	51
b-	T-bet et Eomesodermine (Eomes)	52
c-	Serine protéase inhibitrice (Spi)	53
d-	ID2: inhibitor of DNA binding 2	53
e-	Bcl-6	54
f-	B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1)	55
2.	Facteurs extrinsèques	56
a-	La force du signal RCT et de costimulation	56
b-	Intéraction entre LT et la CPA	57
c-	Les cytokines à la chaîne commune γ	59
d-	Les autres cytokines	60
LA PHASE DE LA MEMOIRE IMMUNOLOGIQUE		62
I.	<i>Caractéristiques et propriétés des LTm</i>	62
II.	<i>Les populations de LTm</i>	62
A.	Les LTcm et LTem	62
B.	Les LTm épuisés	65
III.	<i>Rôle de l'aide CD4 dans le maintien des LTm CD8⁺</i>	65
A.	Qu'est-ce que l'aide CD4 ⁺ ?	65
B.	Les mécanismes de l'aide CD4 ⁺	66
1.	La voie CD40/CD40L	66
2.	IL-2	67
3.	La cytokine IL-12	68
4.	La signalisation CD28/B7	68

	iii
5. CD70/CD27	69
6. 4-1BB/4-1BBL	69
7. La cytokine IL-15	69
HOMEOSTASIE DES LYMPHOCYTES T NAIFS ET MEMOIRES	71
I. <i>La survie des lymphocytes naïfs</i>	71
A. Le rôle du RCT	71
B. Les cytokines de type I	72
1. Voie de signalisation des cytokines impliquées dans l'homéostasie des LTn	73
2. Les cytokines IL-7 et IL-15	74
a- La cytokine IL-7	74
b- La cytokine IL-15	75
3. Les autres molécules intervenants dans l'homéostasie des LTn	75
C. La prolifération homéostatique des LTn	77
1. La « lymphopenia-induced proliferation »	77
a- Le rôle du signal RCT	77
b- La cytokine IL-7	79
2. Les autres mécanismes de prolifération homéostatiques	79
a- La « cytokine-induced proliferation »	79
b- La chronic-LIP	80
II. <i>Homéostasie des LTm</i>	80
A. Homéostasie des LTm CD8 ⁺	81
1. Les LTm CD8 ⁺ spécifiques d'un antigène	81
2. Les LTm CD8 ⁺ naturels	83
B. Homéostasie des LTm CD4 ⁺	83
1. Les LTm CD4 ⁺ spécifiques d'un antigène	83
2. Les LTm CD4 ⁺ naturels	84
III. <i>La niche des LTm</i>	85
LES PROBLEMATIQUES	87
LES RESULTATS DE L'ARTICLE N°1	90
Lowering TCR expression on naïve CD8 ⁺ T cells does not affect memory T cell differentiation	91
LES RESULTATS DE L'ARTICLE N°2	106
Epitope density controls CD8 ⁺ memory T cell differentiation ¹	107
LES RESULTATS DE L'ARTICLE N°3	140
Memory T lymphocyte survival does not require T cell receptor expression	141
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	168
I. <i>La force et la qualité du signal RCT</i>	168
A. Les différents seuils du signal RCT	169
B. Recrutement des précurseurs	173
C. La reconnaissance du complexe CMH/peptide du soi	174
II. <i>Cinétique de la réponse des LT CD8⁺</i>	176
A. Déplacement du pic de la réponse	176
B. Étude du cycle cellulaire	177
III. <i>Le recrutement des MAPKs</i>	180
A. Compartimentalisation des MAPKs	180
B. Phosphorylation des MAPK et le flux calcique	181
IV. <i>Les facteurs de transcription</i>	183
V. <i>Intervention des microARNs</i>	186

<i>VI. Étude de l'activité de Nor-1</i>	188
A. Nor1 au niveau de la mitochondrie.....	188
B. Nor-1 au niveau du noyau	191
<i>VII. Etude de la voie mTOR</i>	192
<i>VIII. Modèle final</i>	193
<i>IX. Le maintien des LT mémoires</i>	195
A. Sensibilité des cytokines.....	197
B. Les niches des LT.....	198
1. Les marqueurs migratoires.....	198
2. Chacun sa niche homéostatique.....	199
CONCLUSION	201
BIBLIOGRAPHIE	203

RESUME

Suite à la rencontre d'un antigène (Ag) présenté à la surface des cellules présentatrice de l'Ag (CPA), les lymphocytes T naïfs, ayant un récepteur des cellules T (RCT) spécifique de l'Ag, vont proliférer et se différencier en LT effecteurs (1). Suite à l'élimination de l'Ag la majorité des LTe vont mourir par apoptose alors que les restants vont se différencier en LT mémoire (LTm) protégeant l'organisme à long terme. Les mécanismes qui permettent la différenciation des LTe en LTm sont encore inconnus.

Pour comprendre comment les LTm CD8⁺ sont générés à partir des LTe, nous avons émis l'hypothèse que la densité de l'Ag présenté par les CPA peut avoir un impact sur la sélection des LT CD8⁺ répondant l'Ag à se différencier en LTm. De manière intéressante, nos résultats montrent qu'une immunisation avec des cellules dendritiques (DCs) exprimant un haut niveau de complexe CMH/peptide à sa surface permet le développement de LTm. À l'inverse, le développement des LTm est fortement réduit (10-20X) lorsque les souris sont immunisées avec des DCs exprimant un niveau faible de complexes CMH/peptide à leur surface. De plus, la quantité d'Ag n'a aucune influence ni sur l'expansion des LT CD8⁺ ni sur l'acquisition de leurs fonctions effectrices, mais affecte de manière critique la génération des LTm. Nos résultats suggèrent que le nombre de RCT engagé lors de la reconnaissance de l'Ag est important pour la formation des LTm. Pour cela nous avons observé par vidéo-microscopie le temps d'interaction entre des LTn et des DCs. Nos résultats montrent que le temps et la qualité de l'interaction sont dépendants de la densité d'Ag présenté par les DCs. Effectivement, nous observons une diminution dans le pourcentage de LT faisant une interaction prolongée avec les DCs quand le niveau d'Ag est faible. De plus, nous observons des variations de l'expression des facteurs de transcription clefs impliqués dans la différenciation des LTm tels qu'*Eomes*, *Bcl-6* et *Blimp-1*. Par ailleurs, la densité d'Ag fait varier l'expression du *Neuron-derived orphan nuclear receptor 1* (Nor-1). Nor-1 est impliqué dans la conversion de Bcl-2 en molécule pro-apoptotique et contribue à la mort par apoptose des LTe pendant la phase de contraction. Notre modèle propose que la densité de l'épitope contrôle la génération des CD8⁺ LTm. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la génération des LTm permettra le développement de meilleures stratégies pour la génération de vaccin.

Dans un second temps, nous avons évalué le rôle du signal RCT dans l'homéostasie des LTm. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de souris transgénique pour le RCT dont son expression peut être modulée par un traitement à la tétracycline. Ce système nous a permis d'abolir l'expression du RCT à la surface des LTm. De manière intéressante, en absence de RCT exprimé, les LTm CD8⁺ peuvent survivre à long terme dans l'organisme et rester fonctionnels. De plus, une sous population des LTm CD4⁺ a la capacité de survivre sans RCT exprimé dans un hôte lymphopénique alors que l'autre sous population nécessite l'expression du RCT.

Mots clefs : Lymphocyte T, récepteur spécifique des cellules T, mémoire immunologique, densité d'antigène

ABSTRACT

Following antigen (Ag) encounter presented at surface of antigen presenting cell (APC), naïve T lymphocytes, which express a T cell receptor (TCR) specific for Ag, undergo massive proliferation and differentiate into effector T cells (*I*). After elimination of the pathogen, most effector T cells die, while the remaining differentiates into memory T cells (LTm) which are responsible for long-term protection of the organism. The mechanism that promotes the differentiation of effectors T cells into memory T cells is still largely unknown.

To understand how Tm cells are generated from effectors, we hypothesized that the density of antigen on the APC could have an impact on the selection of CD8⁺ T cell responders differentiating into memory. Very interestingly, our results show that immunization of mice with dendritic cells (DCs) expressing high levels of peptide-MHC complexes on their surface allow a strong development of LTm. In contrast, the development of memory T cells was strongly reduced (10-20X) when mice were immunized with DCs expressing two-fold less level of peptide-MHC complexes. In agreement with the results described above, the amount of Ag does not have any influence on T cell expansion and acquisition of effector functions, but critically affects memory T cell generation. Our data suggest that the numbers of TCR engaged in MHC/peptide recognition are important for the formation of memory T cells. To do that, we evaluated by time-lapse videomicroscopy the time of interaction between LTn and DCs. Effectively, we observed a significant reduction in the percentage of cells making prolonged interaction with DCs when the level of Ag is decreased. Moreover, we observed a modification in the expression of key transcription factors involved in the differentiation of Tm cells, such as *Eomes*, *Bcl6* and *Blimp-1*. Further analysis reveals that the Ag density influences the expression of Neuron-derived orphan nuclear receptor 1 (Nor1). Nor-1 is involved in the conversion of Bcl-2 into a pro-apoptotic molecule and contributes to effector death by apoptosis during contraction phase. Our model proposes that density of Ag controls the generation of LTm. A better understanding of the role of TCR signals in the generation of LTm will help to develop better vaccination strategies.

Second time, we have evaluated the role of TCR signals in Tm cell homeostasis. To do that, we have used a tetracycline-inducible expression system of the TCR in mice.

This system allows us to abolish TCR expression on Tm cells. Interestingly, we show that the ablation of TCR expression did not influence the survival and functionality of Ag-specific CD8⁺ LTm cells. Furthermore, our results show that a subset of CD4 Tm cells can survive in the absence of TCR expression in nonlymphopenic hosts while another subset requires the TCR expression to survive.

Keywords: T lymphocyte, T cell receptor, immunological memory, density of antigen

▪

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schématisation des molécules du CMH.	3
Figure 2: La présentation antigénique.....	4
Figure 3: Différenciation et migration des LT CD4 ⁺ :.....	5
Figure 4: La réponse des LT CD8 ⁺	8
Figure 5: Structure du complexe RCT/CD3.....	10
Figure 6: Schématisation du modèle de la « kinetic proofreading »:.....	13
Figure 7: Schématisation du « Serial triggering » :	15
Figure 8: Schématisation des différentes étapes d'interaction du LT CD4 ⁺ avec l'CPA avant son activation.....	16
Figure 9: Distribution des protéines membranaires dans la synapse immunologique en fonction du temps :	18
Figure 10: Formation de la synapse immunologique au cours du temps:	19
Figure 11: Dynamisme du processus de reconnaissance de l'antigène et de l'activation des micro-regroupements du RCT et CD28:.....	20
Figure 12: Voie de signalisation en aval du RCT :	22
Figure 13: Représentation des molécules de costimulation et de leurs ligands.	23
Figure 14: Schématisation des voies apoptotiques des LT.	38
Figure 15: Représentation de la différenciation linéaire.	44
Figure 16: Représentation de la différenciation divergente des LT.	46
Figure 17: Représentation de la différenciation progressive des LT.	49
Figure 18: Schématisation de la force et de la qualité du signal RCT.	56
Figure 19: Récepteur des cytokines de la famille de γ c.	73
Figure 20: Schématisation de la signalisation de l'IL-7R et IL-15R.....	74
Figure 21: Représentation des différents modèles de la prolifération homéostatique des LTn.	77
Figure 22: Schématisation des différents seuils du signal RCT.....	170
Figure 23: Représentation des résultats hypothétiques attendus.....	171
Figure 24: Scénario pour l'article n°1.....	172
Figure 25: Scénario pour l'article n°2.....	172
Figure 26: Représentation du modèle pseudodimère du RCT	175
Figure 27: hypothèse sur la durée de la phase d'expansion.....	177
Figure 28: Rôle de la voie PI3K/AKT/mTOR dans la prolifération des LT	178

Figure 29: Schématisation de l'implication de la voie PI3K/PKB dans la prolifération cellulaire des LT.....	179
Figure 30: Cinétique de migration des DCs maturées injectées à la base de la queue de la souris vers la rate.....	182
Figure 31: Les cibles de Blimp-1.....	184
Figure 32: Activité des facteurs de transcription dans notre modèle d'étude.....	186
Figure 33: Représentation de l'activité de la protéine UCP dans le déclenchement de l'apoptose.....	189
Figure 34: Représentation de l'hypothèse sur l'intervention de Nor-1 au niveau de la mitochondrie via Bcl-2 et UCP.....	190
Figure 35: Représentation de l'activité inhibitrice de cAMP sur la signalisation du RCT et de l'influence de CREB sur l'activité des facteurs de transcription.....	192
Figure 36: Représentation des voies de signalisation des LT CD8 ⁺ activés selon notre modèle d'étude.....	195
Figure 37: les différents signaux de survie des LTn et LTm.....	198

LISTE DES ABBREVIATIONS

- (t)Bid** : (truncated) BH3 interacting domain death agonist
- ACAD** : Activated cell autonomous death
- AICD** : Activated induced cell death
- Bak** : Bcl-2 homologous antagonist/ killer
- Bax** : Bcl-2 associated X protein
- Bcl-2** : B cell lymphoma 2
- Bcl-xL** : B-cell lymphoma extra large
- Blimp-1** : B lymphocyte-induced maturation protein 1
- BTLA-4** : B and T lymphocyte attenuator 4
- CDK** : cyclin dependant kinase
- cFLIP** : cellular caspases 8 (FLICE) like inhibitory protein
- CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité
- CPA** : Antigen presenting cell
- CTL** : Cytotoxic T lymphocyte
- CTLA-4** : Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
- DC** : Dendritic cell
- DD** : Death domain
- DISC** : Death inducing signalling complex
- Erk1/2** : Extracellular signal regulated kinase 1/2
- FADD** : Fas associated death domain
- FasL** : Fas ligand
- FRB** : Fibroblastic reticular cell
- GM-CSF** : Granulocyte macrophage colony stimulating factor
- Grb2** : Growth receptor-bound protein 2
- ICAM-1** : intercellular adhesion molecular 1
- ICOS (L)** : Inducible T cell costimulator (ligand)
- IFN(R)**: interferon receptor
- Ig** : Immunoglobulin
- IKB** : Inhibitor of NF-kB
- IKK** : Inhibitor kappa B cell kinase
- IL-X(R)** : Interleukine X (récepteur)

JAK : Janus Kinase
JNK : Jun N terminal kinase
KLF2 : Kruppel-like transcription factor
KLRG1 : Killer cell lectin like receptor G1
LAG-3 : Lymphocyte activation gene 3
LAT : Linker for activation T cell
LB : lymphocyte B
Lck : Leukocyte specific protein tyrosine kinase
LCMV : Lymphocytic choriomeningitis virus
LFA-1 : Lymphocyte function associated antigen 1
LIP : Lymphopenia induced proliferation
LM : Listeria monocytogène
LT (n/e/m) : Lymphocyte T (naïf/effecteur/mémoire)
LTcm : LTm central
LTem : LTm effecteur
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MHC :major histocompatibility complex
MPEC : Memory precursor effector cells
NF-AT : Nuclear factor of activated T cell
NF-κB :Nuclear factor Kappa B cells
NK : Natural killer
Nor-1 : Neural derived orphean receptor
PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase
PKC : protein kinase C
PLCγ : phospholipase Cγ
RCT : Récepteur des cellules T
RCT : T cell receptor
RE : Réticulum endoplasmique
ROS : reactive oxygen species
S1P1 : Sphingosine-1 phosphate receptor 1
SHP1/2 : SH2 containing protein tyrosine phosphatase 1/2
SI : Synapse immunologique
SLEC : Short lived effector cells
SLP76 : SH2 domain containing leukocyte protein 76KDa

SMAC : Supra molecular activation cluster
SOCS : Suppressor of cytokine signalling
STAT : Signal transducer and activator of transcription
Syk : Spleen tyrosine kinase
T-bet : T box transcription factor
TCR : T cell receptor
TET : Tétracycline
Tg : transgène
TGF(R): Tumor growth factor (receptor)
Th : T helper
TLR :Toll like receptor
TNF(R) : Tumor necrosis factor (receptor)
TRADD : TNF receptor associated DD
TRAF : TNFR-associated factor
TRAIL : TNF related apoptosis inducing ligand
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4 : Very late antigen 4
VSV : Vesicular stomatitis virus ma commun
VV : vaccina virus
Zap70 : Zeta chain associated protain 70 KDa

REMERCIEMENTS

Comme dans toute bonne tradition, la première personne à être remerciée doit être ma directrice de recherche le Docteur Nathalie Labrecque. Merci Nathalie de m'avoir offert ton savoir et tes connaissances scientifiques. Grâce à toi, je sens que j'ai bien avancé dans mon adolescence scientifique. Mes 5 ans à tes côtés ont été accompagnés de quelques tempêtes de neige, mais heureusement nous n'avons jamais fini en bonhomme de neige. Je te remercie pour ta passion et ton enthousiasme devant des résultats que parfois je jugeais trop sévèrement. Et surtout je te remercie de m'avoir laissé tester mes hypothèses de jeunes scientifiques qui dans certains cas ont été glorifiantes. Je te remercie de m'avoir permis de présenter mes résultats dans le cadre de congrès internationaux et de m'avoir soutenu durant toutes mes présentations orales. Finalement Merci Nathalie de m'avoir permis de me baigner dans la culture Québécoise pendant 5 ans... heureusement que tu m'as acceptée dans ton laboratoire, car je ne sais pas si j'aurai eu l'occasion de vivre une telle expérience.

Je tiens à remercier aussi mon président du Jury le Docteur Rafick-Pierre Sékaly ainsi que le docteur Naglaa Shoukry qui m'ont accompagné dans mes épreuves les plus dures de mon doctorat: mon examen pré-doctoral et maintenant ma thèse. Je remercie aussi le Docteur Grégoire Lauvau d'avoir eu l'excellente idée de venir aux États-Unis pour participer à la soutenance de ma thèse. Merci Madame Shoukry, Monsieur Sékaly et Monsieur Lauvau d'avoir accepté de lire, corriger, écouter et débattre de ma thèse.

Je tiens à remercier ma famille, et plus particulièrement mes Parents. Sans eux, en plus de ne pas être sur Terre, je n'aurai jamais trouvé les ailes pour réussir mes études et mon doctorat au Québec. Merci Maman, Merci Papa pour tout ce que vous m'avez donné et appris. Vous êtes les principales personnes de ma réussite.

Dans tout mon parcours d'études, j'ai eu une chance extraordinaire de rencontrer des personnes qui pour moi sont exceptionnelles, car ces personnes ont cru en moi et ont su me féliciter et m'encourager. Dans l'ordre chronologique des rencontres, je tiens en premier à remercier, Mr Baldwin, Mme Michau, Mme Benassis mes professeurs de l'école primaire qui ont eu un beau pressentiment à mon sujet, Mme Nassi qui est la personne principale de mon choix d'étude, ma professeure de biologie en 5^{ème}; Mme Philibert ma professeure de français en 3^{ème}; Mme Billot qui a fait évoluer ma critique d'article; le Dr Valitutti qui m'a transmis sa passion de l'Immunologie, mon professeur d'Immunologie en

2^{ème} et 3^{ème} année de faculté; le Dr Hudrisier que j'ai harcelé de questions pendant toutes mes années de facultés sur l'Immunologie; le Dr Favier, mon premier tuteur en science; le Dr Foucras qui m'a offert mon premier vrai stage dans un laboratoire ; la secrétaire du DEA du CIML qui a su voir ma motivation pour l'Immunologie; et finalement le Dr Sékaly qui en me félicitant m'a donné de la confiance pendant mon doctorat.

Je remercie aussi Dominique de m'avoir soutenue dans cette épreuve de ma vie qui n'a pas toujours été dans le positif, mais tu as toujours su me remonter le moral. Et je te remercie de vouloir continuer l'aventure avec moi en partant pour la Suisse. Je t'aime tellement.

Je tiens aussi à remercier mes ami(e)s aussi bien du Québec que de la France. Je vous remercie d'être là tout le temps: je remercie la première Québécoise à avoir pris soin de moi: Véro, t'es une personne que je trouve tellement géniale, je remercie Tom qui a été mon confident (Merci tellement Tom!), je remercie aussi Miriam avec qui j'ai vécu ces 5 ans au laboratoire de Nathalie avec beaucoup d'intensité; je remercie aussi Renée-Maude la plus mieux meilleure géniale abitibitienne que je connaisse, je remercie Roonette pour son soutien et ses conseils, et je remercie Myléne, Marion, Ariane, Morélia, Claire et Line qui m'ont jamais oublié avec la distance je tiens tellement à vous.

Je tiens aussi à remercier tous les collègues de travail que j'ai eu dans le laboratoire de Nathalie, eux aussi ils m'ont soutenu dans la démarche de ma thèse: Merci Marie-Pierre, Julie L, Eve-Line, Marilyne, Melissa, Natacha, Marc-André, Jean-François, Claudine, Sophie, Héloïse, Paméla, Julien, Erin, Mélanie et Julie D (l'ordre est aléatoire je vous remercie avec le même sentiment).

Je dois aussi remercier mon plus grand sponsor, Ressouce Conseil ADL qui m'a fourni durant toute ma rédaction un fauteuil tellement confortable que j'ai pu passer deux mois à rédiger sans courbature. Merci de votre gentillesse.

Et finalement, je ne peux oublier mes chats Argos et Roméo qui ont été fidèlement présents durant toute ma rédaction et qui m'ont obligé à prendre quelque pause pour les flatter.

Merci.

GENERALITE ET ACTEURS DU SYSTEME

IMMUNITAIRE

Les bactéries, les virus, les parasites ainsi que les cellules néoplasiques représentent des dangers pour les organismes. C'est pour lutter contre ces corps étrangers que le système immunitaire s'est développé au cours de l'évolution. Ce système est divisé en deux: le système immunitaire inné ou adaptatif.

Le système immunitaire inné ou naturel est présent dès la naissance et représente la première ligne de défense de l'organisme. Il permet une réaction rapide, non spécifique et sans mémoire. Ce système immunitaire inné se divise en deux catégories : cellulaire ou humorale. La réponse cellulaire innée est mise en place immédiatement dès la reconnaissance de motifs moléculaires présents à la surface des pathogènes, appelés PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) par les PRRs (*pattern recognition receptor*). Les PRRs représentent des récepteurs exprimés à la surface de plusieurs types cellulaires (les cellules dendritiques (DCs: *dendritic cells*) ou les macrophages), les plus connus sont les TLR (*toll like receptor*). La réponse humorale innée fait intervenir des facteurs solubles tels que les anticorps naturels, le complément et les facteurs dérivés de réactions inflammatoires comme la prostaglandine.

Le système immunitaire adaptatif également appelé immunité acquise représente la capacité à un organisme à répondre à des antigènes étrangers par une réponse immunitaire spécifique. Cette immunité se caractérise par la mise en place d'anticorps spécifiques, et de lymphocytes effecteurs et mémoires qui sont capables de réagir seulement contre les antigènes qui ont induit leurs productions. L'immunité spécifique n'est pas immédiatement efficace après le contact avec un antigène, plusieurs jours de latence sont nécessaires, correspondant à la prolifération et différenciation de clones cellulaires spécifiques et à la production d'anticorps. Ce système immunitaire adaptatif se divise en deux catégories : la réponse humorale ou la réponse cellulaire.

La réponse humorale adaptative correspond à la production d'anticorps (Immunoglobuline A (IgA), IgE, IgG, IgM) par les lymphocytes B (LB) devenus

plasmocytes. La réponse adaptative cellulaire se caractérise par une reconnaissance soit de la forme native du pathogène par les LB via leur récepteur BCR (*B cell receptor*), soit d'un fragment antigénique associé au CMH (*complexe majeur d'histocompatibilité*) disposé à la surface des CPAs (*cellules présentatrice de l'antigène*) reconnu par les lymphocytes T (LT) via leur RCT (*Récepteur des cellules T*). Les LT se divisent en deux catégories selon la structure du RCT exprimé à leur surface : RCT $\alpha\beta$ qui représente 95% des LT et les RCT $\gamma\delta$ qui eux représentent seulement 5% des LT.

I. Les cellules présentatrices d'antigène

Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) se caractérisent par leur capacité à présenter des éléments étrangers aux cellules du système immunitaire. Les CPAs les plus connues sont les macrophages, les LB, les cellules de Langerhans et les DCs. Ces cellules sont primordiales pour démarrer la réponse immunitaire adaptative. En effet, les CPAs se caractérisent par leur capacité à phagocyter par multiples mécanismes le corps étranger, à le segmenter en fragments antigéniques (dit antigènes) et à présenter chacun des antigènes à leur surface via une molécule de CMH spécifique. Les DCs sont considérées comme des CPAs professionnelles dues à leur importante capacité de phagocyter et à la présence de dendrites qui offrent une plus grande capacité de présentation d'antigène résultant ainsi à l'activation des LT. Les CPA expriment les molécules de classe I (CMH I) et de classe 2 (CMH II) ce qui leur permet de présenter des antigènes intracellulaires et extracellulaires.

A. Structure des molécules du CMH

Le CMH I se retrouve à la surface de toutes les cellules nucléées de notre organisme. Il est composé d'une chaîne α (ayant 3 domaines) et d'une chaîne β plus petite (1 seul domaine) appelée β 2-microglobuline. Ce CMH a la capacité de présenter des peptides immunogènes de 9 acides aminés provenant d'antigènes endogènes au niveau de sa poche antigénique. La présentation d'un complexe CMH I/peptide antigénique permettra d'activer les LT CD8⁺ spécifiques de cet antigène (**Figure 1**)

Le CMH II a la capacité de présenter les peptides immunogènes d'antigènes exogènes ayant une longueur de 12 à 20 acides aminés au niveau de sa poche antigénique. Il est composé d'une chaîne α et β . Chacune de ces chaînes est composée

de deux domaines. La présentation d'un complexe CMH II/peptide antigénique permet d'activer les LT CD4⁺ spécifiques à cet antigène (**Figure 1**).

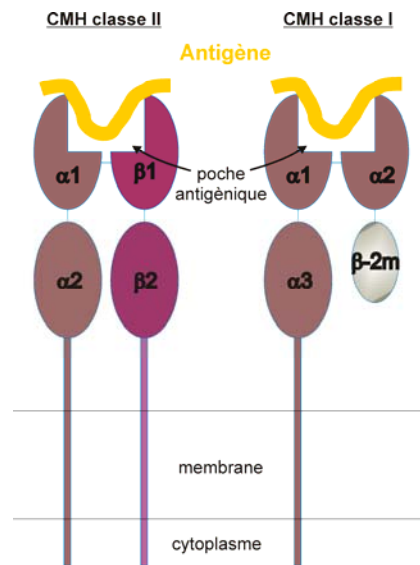


Figure 1: Schématisation des molécules du CMH.

À gauche représentation de la molécule du CMH de classe II et à droite de la molécule du CMH de classe I

B. Mécanisme de présentation des antigènes par les CMH

Comme décrit ci-dessus, les antigènes endogènes sont présentés par le CMH de classe I. En effet, la protéine synthétisée dans la cellule est marquée par l'ubiquitine, ce qui l'oriente vers le protéasome pour y être fragmentée en peptide immunogène contenant 8 à 9 acides aminés. Ces peptides sont par la suite transportés vers dans le réticulum endoplasmique (RE) via les molécules transporteuses TAP1 et 2 (*T cell activating protein 1/2*). Au niveau du RE, le CMH classe 1 est assemblé à l'aide de molécules chaperonne : calcinerin, calreticulum et ERP57. Le complexe CMH I, calreticulum et ERP75 s'associent à TAP pour faciliter l'ancrage du peptide antigénique au niveau du CMH de classe I. La fixation du peptide entraîne la dissociation du complexe CMH I/ peptide antigénique de TAP pour être transloqué vers la membrane plasmique (2) (**Figure 2**).

Le CMH de classe II s'assemble dans le RE, il est entouré d'une protéine appelée la chaîne invariable (Ii). Cette chaîne protège la poche antigénique de la molécule CMH de classe II par la fixation un peptide inopportun appelé CLIP, ceci afin d'éviter la présentation d'un antigène du soi. Le complexe CMH/Ii/CLIP, à travers le réseau golgien, se dirige vers la membrane. La vésicule golgienne va fusionner avec la vésicule

endosomale possédant des fragments de peptides immunogènes provenant de l'endocytose d'un antigène exogène. L'acidité de l'endosome va détruire la chaîne Ii alors que la dégradation du peptide CLIP nécessite l'activation de la molécule de classe II non classique, HLA-DM qui se fera au niveau de l'endosome tardif. Une fois le peptide CLIP éliminé, le peptide antigénique peut prendre place dans la poche antigène du CMH de classe II. Ainsi, le complexe CMH II/peptide antigénique est alors transporté vers la membrane plasmique (3) (**Figure 2**).

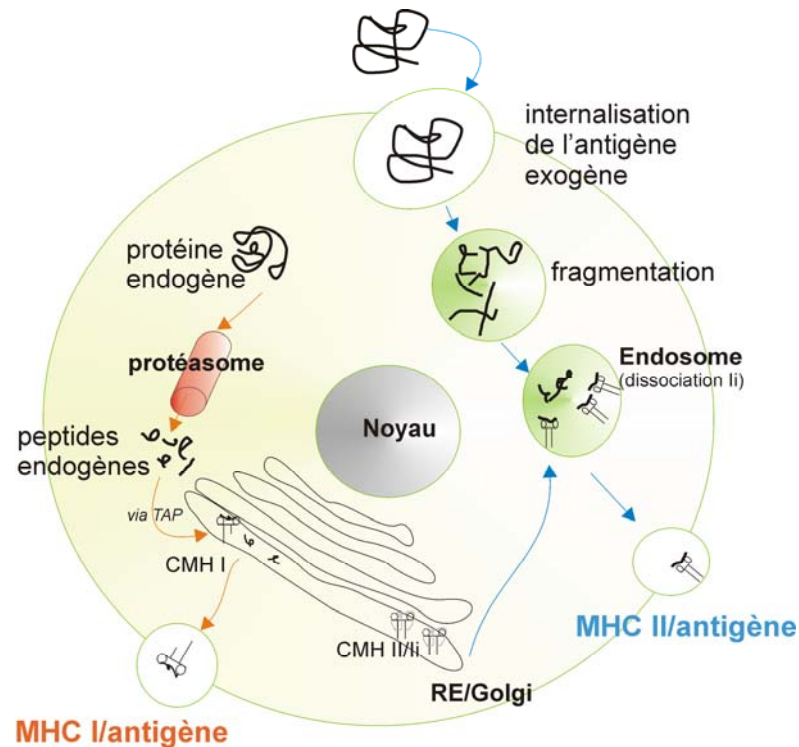


Figure 2: La présentation antigénique

Illustration des mécanismes de présentation des antigènes par la molécule de CMH de classe I (à gauche) et du CMH de classe II (à droite).

II. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sortant du thymus sont des LT naïfs (LTn) car ces cellules n'ont jamais encore rencontré l'antigène pour lequel leur RCT est spécifique. Leur activation est dépendante de cette rencontre qui leur permet de proliférer et de se différencier en LT effecteur (1). Il existe deux types de LT qui sont décrits ci-dessus : les LT CD4⁺ (dit LT « *helper* ») et les LT CD8⁺ (dit LT cytotoxiques).

A. Les cellules T CD4⁺

Les cellules T CD4⁺, dites cellules T « *helper* » (Th), reconnaissent les antigènes présentés dans un contexte de CMH de classe II. Les CD4⁺ se divisent en plusieurs sous groupes : les Th1, Th2, et plus récemment identifié les Th17, les Treg et les Th folliculaires (Tfh). La différenciation de ces sous unités de cellules CD4⁺ est régulée par des cytokines et par la force du signal RCT entraînant l'activation de facteurs de transcription spécifique pour donner suite à la reconnaissance du complexe CMH/peptide (4) (**Figure 3**).

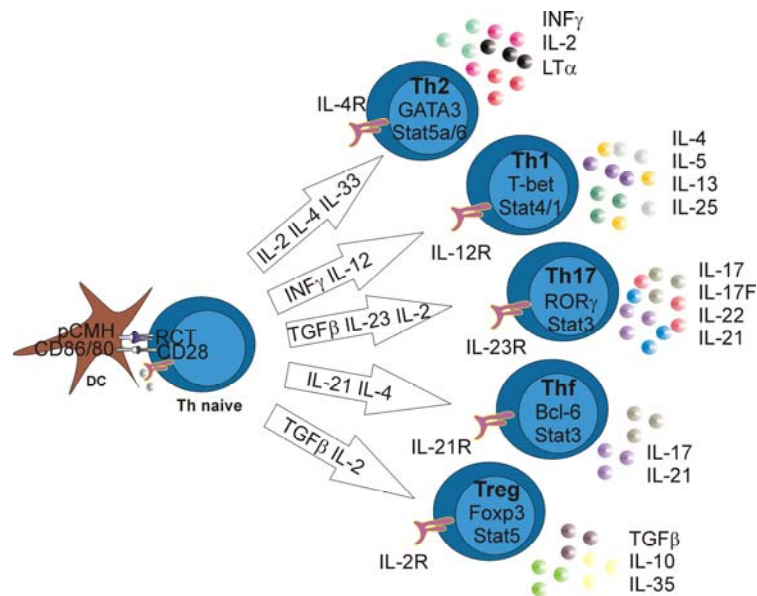


Figure 3: Différenciation et migration des LT CD4⁺:

Suite à la reconnaissance de l'antigène, les LTn CD4⁺ se différencient en Th1, Th2, Tfh, Th17 ou Treg. Ce programme de différenciation est contrôlé par des cytokines : IL2 et IFN- γ permet la différenciation en Th1, IL-4 favorise la formation des Th2, TGF- β et IL-6 génèrent des Th17, le TGF- β et IL-2 sont nécessaire pour former des Treg, et IL-21 favorise la génération des Tfh. L'expression de facteurs de transcriptions orchestre le programme de différenciation des sous unités Th : T-bet pour Th1, GATA3 pour Th2, ROR γ T pour Th17, Foxp3 pour Treg et Bcl-6 pour Thf. Adapté de l'article (5).

1. Les Th1/Th2

La différenciation des LT CD4⁺ vers la population Th1 est induite par la combinaison des cytokines IL-12 et l'IFN- γ (*interferon- γ*). IL-12 est produit par les cellules du système immunitaire inné. Suite à son interaction avec son récepteur (IL-12R), le facteur de transcription STAT4 va s'activer et se transloquer dans le noyau pour induire la transcription de l'IFN- γ . L'IFN- γ via son récepteur active STAT1 qui va permettre à son tour l'activation du facteur de transcription clef des Th1 : T-bet (*T-box*

transcription factor) (6). Les Th1 ont la capacité de produire de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, INF- γ et le TNF- α (*Tumor necrosis factor- α*)) afin de lutter contre les pathogènes intracellulaires (7) (**Figure 3**).

Les Th2 sont nécessaires pour aider la réponse humorale à combattre les pathogènes extracellulaires parasitaires via la sécrétion des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. La différenciation des cellules CD4⁺ en Th2 se fait par l'activation de la voie de signalisation du récepteur à IL-4. Ce signal permet d'activer le facteur de transcription STAT6 qui va mener à l'expression du facteur de transcription clef pour la différenciation Th2 : GATA3 (*GATA binding protein 3*) (8, 9) (**Figure 3**).

En tant que cellules « helpers », les Th1 et Th2 aident les LB en agissant sur la commutation de classe des Igs. En effet, les Th1, par le biais de l'IFN- γ , dirigent la production d'IgG2a alors que les lymphocytes Th2 permettent l'augmentation de la synthèse d'IgE et d'IgG1. Les Th interviennent aussi au niveau de la fonctionnalité de la mémoire CD8⁺ immunologique, caractéristique qui sera plus élaborée dans le manuscrit.

2. Les Th17

Les Th17 produisent les cytokines l'IL-17A, IL-17F, IL-21 et de l'IL-22. Ils ont un rôle dans l'élimination des bactéries extracellulaires, des champignons, mais aussi dans la lutte contre les maladies chroniques inflammatoires et auto-immunes (10). La différenciation en Th17 nécessite une combinaison de TGF- β (*Tumor growth factor- β*) avec des cytokines pro inflammatoires telles qu'IL-6, IL-21 et IL-23 afin de permettre le recrutement du facteur de transcription clef des Th17 : ROR γ t (*Retinoid related orphan receptor γ*) (11) (**Figure 3**).

3. Les Th folliculaires (Tfh)

Les cellules CD4⁺ en présence de la cytokine IL-21 se différencient en Tfh (12, 13). Les Tfh sont impliqués dans la régulation de la réponse effectrice et mémoire des cellules B (14-16). Il a dernièrement été démontré que le facteur de transcription clef des Thf est Bcl-6 (17) (**Figure 3**).

4. Les LT régulateurs (Treg)

Les Treg interviennent via différents mécanismes dans le maintien de l'homéostasie, de la tolérance périphérique et préviennent les maladies auto-immunes

(18, 19). Ces cellules se caractérisent par l'expression du facteur de transcription Foxp3 (*forkhead transcription factor 3*) (20-22). Les Treg se divisent en deux sous-groupes : les nTreg (*natural T reg*) provenant directement du thymus et de phénotype CD4⁺CD25⁺ et les iTreg (*adaptive Treg*) qui se trouvent en périphérie et sont générés via une stimulation du RCT combinée avec des cytokines TGF-β et IL-12 (23, 24) (**Figure 3**).

B. Les cellules T CD8⁺

Les cellules CD8⁺ reconnaissent les antigènes présents à la surface des CPA via le CMH de classe I. Ces lymphocytes ont un rôle essentiel dans la protection de l'organisme contre les virus, les bactéries intracellulaires et les tumeurs. La caractéristique de ces cellules est de se différencier en cellule cytotoxique (CTL : *Cytotoxic T lymphocyte*). Le mécanisme cytotoxique de référence est la voie de la perforine/granzyme. En effet, suite à la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le RCT, les CTL polarisent la machinerie lytique vers le contact CTL/cellule cible (25). Les CTL peuvent aussi utiliser la voie des membres de TNF (*Tumor necrosis factor*) comme Fas/FasL (*Fas ligand*) ou TNF/TNFR (*TNF receptor*) pour éliminer une cellule infectée. L'élaboration des mécanismes cytotoxiques est décrite plus loin dans le manuscrit. Durant mon doctorat, les LT principalement étudiés sont les LT CD8⁺ spécifique d'un antigène provenant de la protéine ovabulmine.

III. La réponse immunitaire adaptative des LT CD8⁺

Les LTn CD8⁺ parcourent l'organisme à la recherche d'un antigène présenté à la surface des CPA via le CMH. Lorsque le récepteur des LTn CD8⁺ reconnaît spécifiquement un complexe CMH/peptide, les LTn prolifèrent et se différencient en LTe. Le rôle des LTe est d'éliminer l'agent infectieux de l'organisme. Pour donner suite à cette élimination, 90 à 95% des LTe vont mourir par apoptose enfin de rétablir l'homéostasie des LT, et les 5 à 10% des LTe qui survivent à cette phase de contraction vont se différencier en LT mémoires (LTm) (26). La fonction des LTm est de permettre une protection contre le pathogène rencontré tout au long de la vie d'un organisme. Les LTm se caractérisent par des propriétés qui leur sont propres et surtout qui les rendent plus efficaces que les LTn, d'où leur importance dans l'organisme. La réponse immunitaire adaptative se divise donc en 3 phases : (i) la phase d'expansion avec la formation des LTe suite à la reconnaissance antigénique, (ii) la phase de contraction qui

permet le rétablissement de l'homéostasie des LT et (iii) la phase-mémoire qui se caractérise par la présence et le maintien des LTm (**Figure 4**). Chacune de ces phases sera élaborée dans l'introduction de ce manuscrit.

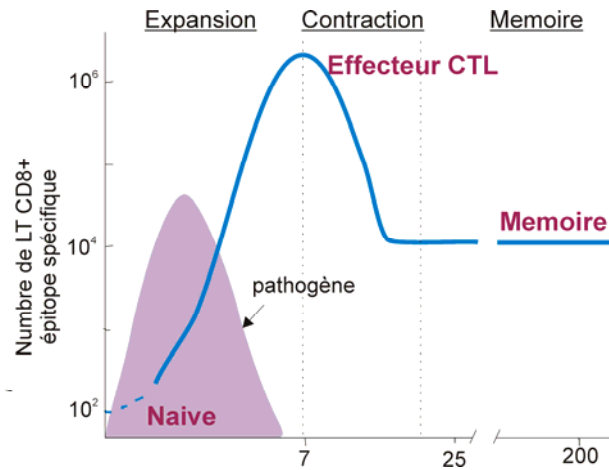


Figure 4: La réponse des LT CD8⁺

Graphique représentant la prolifération massive et la phase de contraction des LT CD8⁺ en réponse à une infection avec un pathogène virulent. La courbe solide représente le nombre de LT CD8⁺ antigène spécifique au cours du temps, et la courbe bleue représente l'évolution du pathogène dans le temps en réponse à la réponse des LT CD8⁺. Adapté de l'article (26).

LA REPONSE DES LYMPHOCYTES T A

L'ANTIGENE

I. La reconnaissance de l'antigène

A. Maturation des LT

Les LT dérivent des cellules souches pluripotentes provenant de la moelle osseuse. L'entrée de ces progéniteurs hématopoïétiques dans le thymus (organe lymphoïde primaire) résulte à une prolifération massive qui est à l'origine du développement des thymocytes immatures. Durant le développement des thymocytes, plusieurs molécules de surface vont s'exprimer, incluant les corécepteurs CD4 et CD8, afin de générer des thymocytes matures qui une fois à l'extérieur du thymus représenteront la population des LT du système immunitaire périphérique.

La maturation des thymocytes se divise en trois grandes parties : (i) l'étape de la cellule double négative qui n'exprime aucun des corécepteurs (DN : $CD4^-CD8^-$), (ii) la seconde étape se caractérise par l'expression simultanée des deux corécepteurs, ceux sont des cellules doubles positives (DP : $CD4^+CD8^+$), (iii) et la dernière étape se symbolise par l'expression unique d'un seul corécepteur, ceux sont les cellules matures simples positives (SP : $CD8^+CD4^-$ ou $CD8^-CD4^+$). Toutes ces étapes sont associées avec la formation du récepteur des cellules T : le RCT (*Récepteur des cellules T*). En effet, les RCT permettent une sélection des thymocytes suivant leur spécificité. Les chaînes composant le RCT subissent des réarrangements géniques et des sélections complexes qui sont à l'origine de la diversité du répertoire des LT.

Toutes ces étapes sont à l'origine de la maturation des LT. En effet dans le thymus, le RCT va être testé pour sa capacité à reconnaître le CMH du soi et les antigènes du soi. Ainsi, les cellules qui sont capables de se lier avec suffisamment d'affinité avec le CMH du soi et qui n'ont pas fortement réagi aux antigènes du soi vont pouvoir survivre et sortir du thymus. Ces étapes de sélections sont respectivement appelées la sélection positive et la sélection négative. Ces systèmes de sélections ont

pour principe d'éviter la présence de LT auto réactifs dans l'organisme et donc de prévenir le développement de maladies auto-immunes.

B. Structure du RCT

Le RCT est composé de deux chaînes polypeptidiques glycosylées (α et β) appartenant à la super famille des Igs. Chaque chaîne est composée d'un domaine variable en amino terminal et d'un domaine constant en carboxyterminal. Les deux chaînes (α et β) sont reliées entre elles par un pont disulfure (27, 28) (**Figure 5**). L'association de la partie variable des deux chaînes du RCT permet la reconnaissance du complexe CMH/antigène. Les sites de liaison antigénique sont analogues aux CDR (*complementarity-determining regions*) des Igs (29). Les CDR1 et 2 se lient préférentiellement au CMH alors que le CDR3 s'attache préférentiellement au peptide antigénique (30, 31). L'interaction du RCT avec le complexe CMH/peptide résulte à une réorganisation de la membrane découlant à la formation de la synapse immunologique.

Les chaînes α et β du RCT sont associées au complexe CD3 invariable représenté par 4 polypeptides CD3 ϵ , CD3 α , CD3 δ et l'homodimère CD3 ζ (**Figure 5**). Ce complexe est essentiel pour la signalisation du RCT, puisque ce dernier est composé d'un très court domaine intracellulaire à la différence des sous-unités CD3. En effet, ces sous-unités contiennent une ou plusieurs séquences intracytoplasmiques appelées ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*: (D/E)X₂YX₂(L/V)X₆₋₉YX₂(L/V)) qui sont responsables de la transduction du signal RCT pour donner suite à la reconnaissance antigénique.

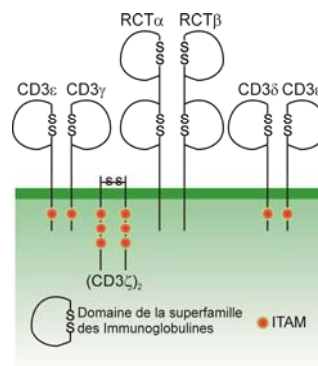


Figure 5: Structure du complexe RCT/CD3.

Représentation des chaînes α et β du RCT associées avec le complexe CD3 (CD3 ϵ , γ , δ , et ζ). Les points rouges représentent les motifs ITAMs présents dans les domaines intracellulaires des chaînes du complexe CD3. Adapté de l'article (28).

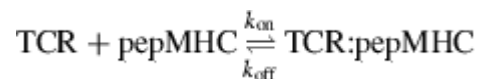
Le complexe RCT/CD3 est aussi associé à des corécepteurs (CD4 ou CD8) dont leur fonction n'est pas seulement de permettre la distinction entre les LT CD4⁺ et LT CD8⁺ mais permet de stabiliser l'interaction du RCT avec le complexe CMH/peptide. En effet, il a été montré que les corécepteurs CD4⁺ et CD8⁺ reconnaissent respectivement le site invariable du CMH classe I et II (32). L'engagement du RCT et du corécepteur induit l'activation des voies de signalisation qui en combinaison avec les molécules de costimulation et les récepteurs des cytokines assurent la réponse immune. En effet, les corécepteurs sont associés à la Src kinase Lck (*leukocyte-specific protein tyrosine kinase*) qui intervient dans les cascades de signalisation du RCT. Néanmoins, l'activation de Lck des corécepteurs est indépendante à leur interaction avec la portion invariable du CMH. En effet, il a été montré de son activation dépendant de sa déphosphorylation par la phosphatase CD45 (33). Cette déphosphorylation permet l'entrée de Lck au niveau du complexe CD3 entraînant ainsi le début de l'activation des voies de signalisation du RCT qui seront décrits dans le paragraphe II de cette section.

Ainsi, l'activation complexe RCT/CD3/co-récepteur suite à la reconnaissance d'un complexe antigénique est l'événement central de la réponse immune. De nombreuses études ont en vain essayé d'expliquer, décrire et analyser les différents aspects de cette interaction. Ainsi, des concepts sur la transmission du signal RCT qui ont été établis sont décrits dans le paragraphe suivant.

C. La transmission du signal RCT

1. Caractéristiques physico-chimiques de l'interaction du RCT/CMH/peptide

Un RCT a la capacité de reconnaître un antigène présenté sur le CMH avec une haute sensibilité et une faible affinité. Ce paradoxe est toujours le sujet de beaucoup d'étude. L'interaction entre ces deux complexes est un phénomène simple et réversible qui est décrit par la réaction (34):



impliquant le taux d'association (K_{on}), de dissociation (35), et le demi-temps d'interaction qui est dérivé de k_{off} ($t_{1/2} = \ln 2 / K_{\text{off}}$). L'équilibre du complexe est défini par $K_D = 1/K_A$ (K_D , constante de dissociation; K_A , constante d'association) et peut-être déterminé selon la formule standard de scatchard :

$$K_D : [RCT][CMH/peptide]/[RCT/CMH/peptide].$$

Ainsi en utilisant des complexes CMH/peptide solubles qui empêchent un anticorps anti-RCT de se fixer à son RCT présent à la surface des cellules, l'équipe de Matsui et coll. a pu déterminer pour la première fois que la constante de dissociation (36) entre le RCT et le complexe CMH/peptide est de l'ordre de 10^{-4} M et 10^{-7} M (37, 38). Parallèlement, l'équipe de Weber estime, en utilisant une protéine chimère d'un RCT avec un Ig pour inhiber la réponse LT, que le K_d est de 10^{-5} M (39). Ces résultats montrent que l'affinité du RCT pour le complexe CMH/peptide est très faible. De plus, d'autres études ont déterminé la demi-vie d'association du complexe RCT/CMH/peptide à quelques secondes, ce qui signifie que la cinétique d'interaction de ce complexe est définie par un taux d'association lent et un taux de dissociation rapide (37, 40). Cette faible affinité du RCT pour le complexe CMH/peptide est associée à une haute sensibilité pour permettre au RCT de reconnaître les 0,03% de ligands qui lui sont spécifiques à la surface d'une CPA (41). En effet parmi tous les complexes CMH/peptide présents à la surface d'une CPA, un minimum de 60 à 200 complexes spécifiques est nécessaire pour activer le LT (41). Afin de comprendre la sensibilité et la spécificité de la réponse des LT, deux écoles de pensée se sont établies pour expliquer comment le RCT s'active en présence d'une quantité si faible de ligands.

a- Le modèle de « kinetic proofreading ».

Historiquement, « *kinetic proofreading* » a été exploré dès 1974 pour mieux comprendre la précision remarquable de la réplication de l'ADN et de la synthèse des protéines (42-47). Puis 20 ans plus tard, McKeithan (48) utilise ce modèle pour expliquer et mieux concevoir comment la sélection et le développement de la cellule T peuvent se faire. En effet, dans le thymus, la cellule meurt lorsqu'elle reçoit un signal trop fort ou un signal trop faible, par contre un signal intermédiaire est nécessaire pour permettre à la cellule de se différencier et de devenir mature. Ainsi en périphérie, il est difficile de comprendre comment un grand nombre de faibles signaux (exposition de l'antigène du soi) versus un petit nombre de forts signaux (antigène étranger) peuvent activer le LT. C'est alors que McKeithan définit la cascade de signalisation du RCT comme une série d'étapes séquentielles réversibles permettant d'atteindre un signal optimal afin d'activer la cellule (48).

McKeithan et coll. ont aussi établi la présence d'un délai de temps entre la liaison initiale et le signal optimal d'activation. En effet, ceci explique pourquoi un complexe CMH/peptide non spécifique qui a un taux de dissociation rapide n'entraîne pas une pleine activation de la cellule T, alors qu'un complexe spécifique dans les mêmes conditions en est capable. Ceci signifie que complexe CMH/peptide ayant une faible affinité avec le RCT ne permet pas d'activer pleinement la cellule T.

Le déroulement de ce modèle (**Figure 6**) est : suite à l'interaction du complexe CMH/peptide/RCT, des modifications biochimiques apparaissent entraînant la formation d'une série de complexes intermédiaires (C_i) pour finalement arriver à un complexe actif final (C_N). Chacune des modifications du complexe est réversible et peut se dissocier pour revenir à un état basal ceci par l'intervention des phosphatases. Néanmoins pour obtenir une pleine activation de la cellule T, il est nécessaire de créer le complexe final C_N (48).

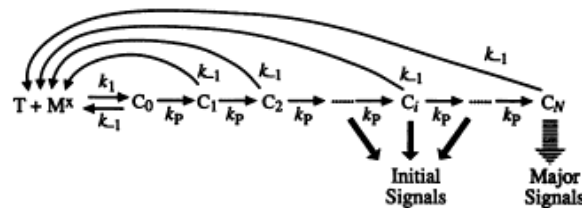


Figure 6: Schématisation du modèle de la « kinetic proofreading »:

Le complexe initial (C_0) formé par l'interaction du RCT (T) et du complexe CMH/peptide (Mx) subit N modifications biochimiques entraînant la formation de complexe intermédiaire (C_i) jusqu'à l'obtention du complexe pleinement actif (C_N). Chaque étape est réversible pouvant mener à la forme basale du complexe. La totale activation de la cellule T doit venir des signaux du complexe final (C_N). D'après l'article (48).

Ainsi, McKeithan a proposé que deux antigènes qui diffèrent de 10 fois en quantité de complexes CMH/peptide exprimés à la surface de la CPA résulte à une différence de 10.000 fois sur l'activité du RCT (48). Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de peptides altérés, partiellement agonistes ou antagonistes ayant une durée d'interaction trop courte avec le RCT, ce qui engendre une activation partielle de la cellule T puisque la cascade d'intermédiaires ne peut pas atteindre le niveau final (C_N) (49). Ce modèle est peaufiné par les observations de l'équipe de Rabinowitz et coll.. L'auteur explique qu'un peptide antagoniste va déclencher la cascade d'intermédiaires (C_i) mais la dissociation du complexe CMH/peptide/RCT est trop précoce pour

permettre l'exécution totale de la cascade d'intermédiaires. Ainsi, l'arrêt de la cascade d'intermédiaires résulte à une inhibition de l'activité de la cellule T (50). De plus, l'auteur met en évidence qu'un ligand qui fixe longuement le RCT résulte à une activation positive de la signalisation de la cellule T versus, un ligand qui fixe brièvement le RCT qui entraîne à une signalisation négative du RCT donc une inhibition de la cellule T. Ainsi, ce modèle explique la capacité au RCT à reconnaître spécifiquement un complexe CMH/peptide présent en faible concentration, puisque cette interaction aura une durée prolongée et permettra une signalisation positive de la cellule T. Tandis que dans des conditions de forte concentration de complexe CMH/peptide non spécifique, la durée d'interaction sera réduite ce qui résultera à une inhibition de la cellule T.

La présence d'intermédiaire (C_i) dans la cascade signalisation décrite dans le modèle de "*kinetic proofreading*" est appuyé par les travaux de Risueno et coll. qui montrent, *in vitro* et *in vivo*, une modification de la conformation du RCT suite à la reconnaissance d'un peptide agoniste, phénomène qui n'est pas visible avec un peptide antagoniste (51).

b- Le modèle de l'engagement en série (« serial triggering »)

Pour comprendre comment un RCT de faible affinité reconnaît spécifiquement un complexe CMH/peptide faiblement représenté sur la CPA (41), l'équipe de Valitutti a établi le modèle « *serial triggering* » (52). Ce modèle consiste à une internalisation et recyclage du RCT en réponse à une reconnaissance spécifique du complexe CMH/peptide (53, 54). Ainsi, le paradoxe de la haute sensibilité associée à la faible affinité s'expliquerait par le fait qu'un petit nombre de CMH/peptide (41) a la capacité d'engager des interactions en série avec un très grand nombre de RCT, ce qui entraînerait un signal soutenu et amplifié (55). Ceci expliquerait la cinétique rapide de dissociation du RCT, qui permet à un simple CMH/peptide d'engager plusieurs RCT par étapes successives de liaison-engagement-dissociation. Ainsi, il est nécessaire d'un temps minimum d'interaction entre le RCT et le complexe CMH/peptide pour permettre la transduction du signal et l'internalisation du RCT. Mais pour que ce phénomène puisse être fonctionnel au niveau de l'interface entre le LT et la CPA, trois facteurs sont importants : l'adhésion, les composants de signalisation et les molécules de RCT. En effet, l'adhésion doit être efficace entre les deux cellules pour faciliter l'interaction du

complexe CMH/peptide/RCT. Il est nécessaire aussi d'un approvisionnement continu des composants de la signalisation au niveau du RCT engagé et de nouvelles molécules de RCT de manière à remplacer ceux qui s'internalisent suite à l'engagement du complexe CMH/peptide. Par ailleurs, il a été montré que l'utilisation de peptides altérés entraîne une activation partielle de la cellule T aboutissant à son anergie (56, 57), comparable aux peptides antagonistes (58). En effet, le taux de dissociation d'un peptide altéré ou antagoniste est aussi élevé que celui d'un peptide agoniste, donc le RCT se dissocie avant qu'il y ait eu une pleine activation de sa signalisation (37, 49). De plus, un peptide altéré entraîne la phosphorylation des ITAMs du RCT sans avoir la capacité de recruter Zap70 (57, 59). Ce qui expliquerait qu'il est possible qu'une liaison de courte durée entre le RCT et le complexe CMH/peptide entraîne une activation partielle du RCT (peptide altéré) et qu'une liaison de durée encore plus courte entraîne une absence totale de signal (peptide antagoniste) dont la résultante est l'anergie de la cellule T. Ceci met en évidence que la demi-vie d'interaction doit être optimale (60). Ainsi, ce modèle (**Figure 7**) explique la propriété paradoxale du RCT pour un complexe CMH/peptide spécifique : sensibilité versus spécificité. La sensibilité s'explique par des cinétiques de reconnaissance optimales par le RCT de peptides agonistes présents en faible quantité, ce qui résulte à la pleine activation de la cellule T. La spécificité se caractérise par une inhibition de la capacité d'engagement en série du RCT lorsque la cinétique de reconnaissance n'est pas optimale (peptides altérés/ antagonistes) (52).

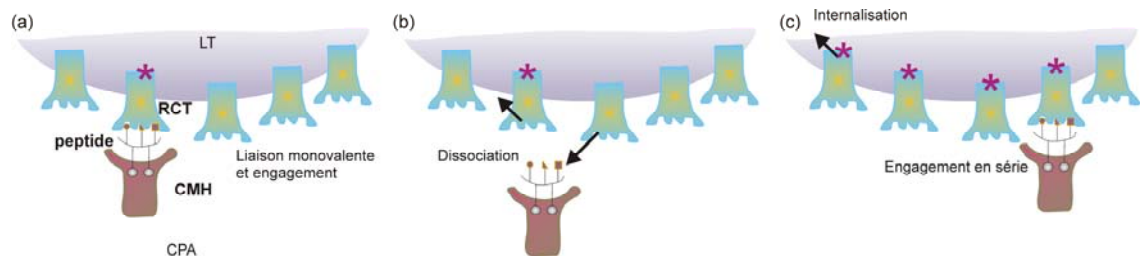


Figure 7: Schématisation du « Serial triggering » :

Un seul complexe CMH/peptide a la capacité d'activer plusieurs RCT : a) activation du RCT engagé () avec le complexe CMH/peptide. b) Le RCT se dissocié du complexe CMH/peptide lui laissant l'opportunité de s'engager avec un autre RCT. c) Tous les RCT activés (*) induisent le signal puis sont internalisés. Adapté de l'article (52)*

2. L'importance de la durée d'interaction entre le LT et la CPA

La microscopie à multi photons dans les ganglions révèle que la durée de contact entre un LT et CPA (comme les DCs) est hétérogène et se compose de 3 phases (61-64). Le premier stade est un engagement de courte durée de la cellule T avec la CPA

(stade I et II de la **Figure 8**). La seconde phase d'une durée plus longue (8 à 24h) entraîne la formation de conjuguées entre les deux types cellulaires suite à la reconnaissance de l'antigène (stade III et IV de la **Figure 8**). Cette étape est associée à l'induction de la cytokine IL-2 et IFN- γ ce qui corrèle avec les données montrant qu'une longue durée d'interaction entre LT et la DC suscite la production de cytokines (63). Et la troisième étape se traduit par un retour de la cellule T à un haut niveau de mobilité et de prolifération (stade V de la **Figure 8**) (63).

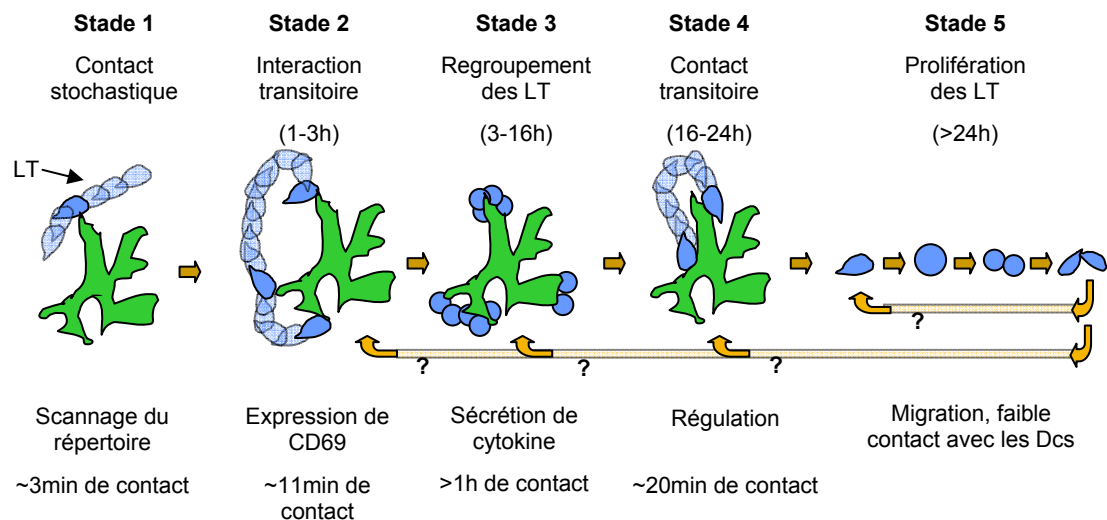


Figure 8: Schématisation des différentes étapes d'interaction du LT CD4+ avec l'CPA avant son activation.

Description des différents stades d'interaction entre le LT (bleu) et la CPA (65) au cours du temps et des événements d'activation que les LT acquièrent selon le temps d'interaction entre les deux types cellulaires. Adapté de l'article (66).

En parallèle à ces études, l'équipe de Bousso démontré que la fréquence de précurseurs de LTn est un paramètre à ne pas négliger (67). En effet, en visualisant *in vivo* le temps d'interaction entre les DCs et LT, et en faisant varier la quantité de précurseurs de LT spécifiques pour l'antigène présent à la surface des DCs, les auteurs observent une variation dans la capacité et la stabilité des LT à interagir avec les DCs (67). Dans des conditions où le nombre de précurseurs est faible (1×10^6), l'interaction peut s'établir avec une et plusieurs DCs durant 2 jours (67). Par opposition, lorsque la quantité de précurseurs spécifiques est importante (10×10^6) cela entraîne une diminution de la stabilité des conjugués T/DCs (67). Les auteurs suggèrent que la censure de l'interaction entre la CPA et le LT dans des conditions de nombre élevé de précurseurs permet, lors de la phase d'expansion, un contrôle négatif sur la réponse immunitaire

(67). De plus, il est montré que le temps d'interaction est important pour la pleine activation des LT. En effet, dans une coculture de LT/CPA l'ajout, à différent temps, d'un anticorps bloquant l'interaction entre les deux types cellulaires montre qu'une stimulation prolongée de 10 à 24 heures est requise pour obtenir une production optimale d'IL-2 ou pour induire la prolifération (68). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un anticorps anti-CMH II brisant l'interaction LT/DC (62). *In vivo*, il a été montré que plusieurs heures d'interaction sont indispensables pour observer une prolifération des LT CD8⁺ et une production d'IFN- γ et de granzymes B. De plus, dans une souris déficiente pour la molécule d'adhésion ICAM-1, le temps d'interaction entre le LT CD8⁺ et les DCs est réduit entraînant ainsi une activation inefficace des CTL se traduisant par une diminution de la production *in vitro* et *in vivo* de l'IFN- γ et du nombre de LTm CD8⁺ généré *in vivo* (69). Par ailleurs, il a récemment été démontré que l'avidité du complexe CMH/peptide/RCT a un impact sur le temps d'interaction entre les deux types cellulaires et donc sur l'efficacité de la lyse des cellules infectées par les CTL (70). En effet, grâce à l'utilisation de deux peptides ayant une avidité différente pour le complexe CMH/peptide/RCT, Jenkins et coll. montre que la lyse des cellules cibles est plus efficace dans des conditions de faible avidité, puisque les LT CD8⁺ auront un temps d'interaction avec leur cible plus courte et donc pourront rentrer en contact avec plus de cellules infectées pour pouvoir les éliminer (70). Toutes ces études mettent en évidence que la durée du contact intercellulaire module l'acquisition et l'efficacité des fonctions effectrices dues à une maîtrise sur l'induction de l'expression génique qui sera décrite plus loin dans le manuscrit (71-73).

II. Activation du RCT

L'activation du RCT n'est pas uniquement la résultante de la reconnaissance spécifique d'un complexe CMH/peptide. Elle est aussi dépendante (i) d'une restructuration de la membrane plasmique regroupement toutes les molécules de signalisation (autant au niveau intracellulaire qu'extracellulaire) qui sont nécessaire à une activation optimale de la cellule T; et (ii) d'une sommation de signaux provenant de récepteurs exprimés à la surface des LT qui servent à l'amplification du signal RCT comme les molécules de costimulation.

A. La synapse immunologique

L'interface entre la cellule T et la CPA a valu l'étude de nombreuses recherches. En effet, cette zone est responsable l'activation des LT puisqu'elle permet un contact prolongé entre un RCT de faible affinité avec des complexes de CMH/peptide très faiblement exprimés à la surface de la CPA. Grâce aux techniques de microscopie, cette zone est décrite comme un regroupement d'une large gamme de molécules de surface et de molécules de signalisation. Cette zone d'interaction est appelée la « synapse immunologique » (SI) pour faire référence au système nerveux (74). En effet, les travaux de Kupfer et coll. mettent en évidence par des études d'immunofluorescence une polarisation des molécules du cytosquelette du RCT vers la CPA (75). Et, grâce à l'évolution de la microscopie permettant une visualisation en 3 dimensions des cellules, il a été démontré que le RCT et la molécule d'adhésion LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) sont présents en grande quantité au niveau de l'interface et qu'il y a une organisation de ces molécules en aires distinctes (76). C'est ainsi que la SI est nommée SMAC pour complexe super moléculaire (SMAC : *supra molecular activation cluster*) et se divisent en 3 zones distinctes : SMAC centrale (c-SMAC), SMAC périphérique (p-SMAC) et SMAC distale (d-SMAC), comme représenté dans la **Figure 9**.

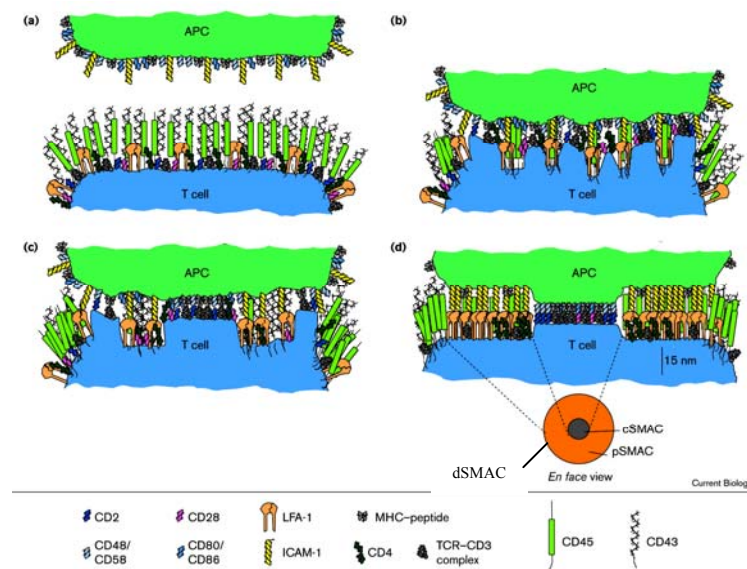


Figure 9: Distribution des protéines membranaires dans la synapse immunologique en fonction du temps :

(a) Pré-contact entre le RCT et le complexe CMH/peptide se caractérise par une distribution homogène des protéines de surface. (b) Représentation de l'activation initiale du RCT quelques minutes après le contact RCT/CMH/peptide au cours duquel se regroupent les protéines de

surface. (c) Réorganisation active du cytosquelette engendre la formation de la c-SMAC. (d) Formation de la synapse mature marquée par la délimitation de la pSMAC, c-SMAC et d-SMAC. Adapté de l'article (77).

Dans la zone centrale, c-SMAC, se retrouve au niveau de la surface cellulaire le complexe RCT/CD3, les molécules de costimulation, les corécepteurs (CD4/CD8), et au niveau intracellulaire les protéines kinases (Zap-70, Lck, Fyn), les adaptateurs (LAT, SLP76), les kinases impliquées dans la signalisation (*e.g.* PI3K (*Phosphatidylinositol 3 kinase*), PKC) et le centre organisateur des microtubules (MTOC : *microTubular organisation center*) (78, 79). Cette zone se caractérise par une structure de type radeau lipidique (appelé « raft ») dans laquelle se retrouve de manière induite ou constitutive le RCT. Les rafts sont des microdomaines de la membrane plasmique particulièrement riche en sphingolipides et en cholestérol sur lesquels sont ancrées de façons préférentielles différentes protéines de transduction du signal comme *e.g.* LAT.

La p-SMAC se caractérise par la présence de molécules d'adhésions (tel que LFA-1), de l'intégrines $\beta 1$ et au niveau intracellulaire de protéines du cytosquelette (actine, ezrine, taline) (76, 78).

La zone la plus extérieure, la d-SMAC dans laquelle se retrouve les protéines ERM (Ezrine, Radixine, Moesine), et les grandes molécules comme CD43 et CD45 (78, 80, 81).

Ces 3 zones distinctes se mettent en place suite à interaction d'au moins 30 minutes entre le LT et la CPA (82) (**Figure 10**).

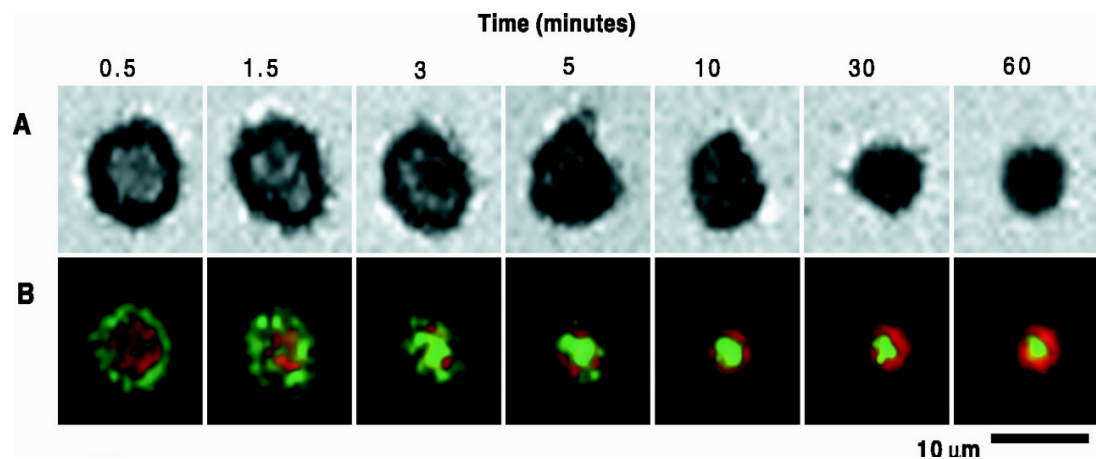


Figure 10: Formation de la synapse immunologique au cours du temps:

(A) Image en IRM (Interference reflection microscopy) du contact entre le LT et la CPA. (B) délimitation de la p-SMAC et c-SMAC au cours du temps par le marquage du complexe

CMH/peptide (65) et la molécule d'adhésion ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) (83). Résultat extrait du papier (84), avec l'autorisation de Science et de l'auteur M. Dustin.

Les premières études de la SI ont suggéré que la c-SMAC était le site de l'engagement du RCT avec son complexe CMH/peptide spécifique et le site d'initiation de la signalisation du RCT. Par la suite, il a été proposé que la c-SMAC est le site d'initiation de l'activation du signal RCT et de dégradation du RCT (82, 85, 86). Ceci a été montré par l'identification d'une présence importante d'acide lysobisphosphatidique qui est impliquée dans la dégradation des protéines ubiquitinylées et d'une forte concentration de la phosphatase CD45 qui inhibe la signalisation du RCT en déphosphorylant les molécules de la signalisation (82, 85, 86). La balance entre les deux processus est déterminée par la qualité de l'antigène, ainsi la c-SMAC permet l'amplification d'un faible signal agoniste (87). Dès 2005, les études sur le rôle de la c-SMAC dans l'initiation de l'activation du RCT ont été mises en doute par une technique de microscopie appelée TIRFM (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*). En effet, cette technique permet aux auteurs de mesurer les mouvements des molécules de signalisation durant l'activation de la cellule T. Ainsi les travaux de Yokosuka et coll. ont démontré que de microdomaines de regroupement du RCT se formaient au niveau de la zone p-SMAC pour initier et maintenir le signal du RCT (86). Par la suite, les travaux de l'équipe de Dustin et coll. confirment que ces microdomaines sont impliqués dans le soutien du signal RCT au niveau de la p-SMAC mais que par la suite ces microdomaines migrent vers la zone c-SMAC afin de former la SI mature (82, 88) (**Figure 11**).

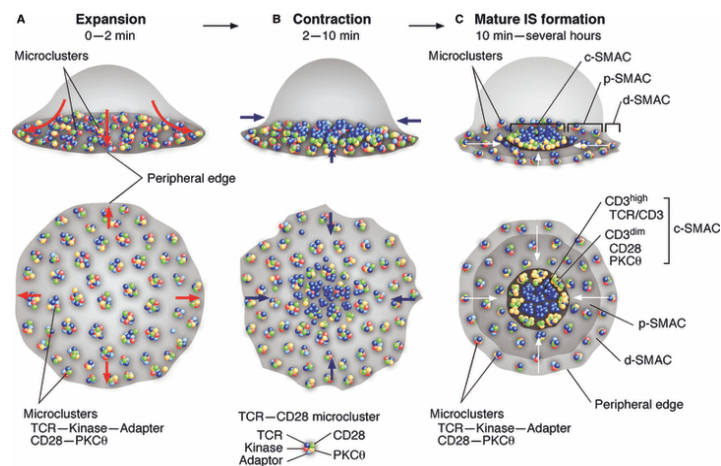


Figure 11: Dynamisme du processus de reconnaissance de l'antigène et de l'activation des micro-regroupements du RCT et CD28:

RCT (TCR=bleu foncé), Zap70 (83), SLP76 (bleu clair), CD28 (65), et PKCθ (jaune). Extrait de l'article (89).

Or l'activation de la cellule T ne repose pas seulement sur la formation de la synapse immunologique, mais est aussi dépendante (i) de la présence ou de l'absence des molécules de costimulation, (ii) de la concentration de l'antigène et (iii) de la durée de l'interaction entre la cellule T et la CPA. Ces 3 paramètres déterminent la qualité/force du signal RCT déclenché suite à la reconnaissance de l'antigène.

B. La signalisation du RCT

En effet, dès que le RCT reconnaît spécifiquement le complexe CMH/peptide, la phosphatase CD45 va déphosphoryler la Src Kinase Lck qui pourra à son tour phosphoryler les ITAMs du complexe CD3 du RCT. Cette étape va permettre le recrutement et l'activation des protéines tyrosine kinase Syk (*spleen tyrosine kinase*) et Zap70 (*zeta chain associated protein 70KDa*). Après ces étapes de phosphorylation, les substrats de Syk/Zap70 et des Src kinases vont à leur tour s'accumuler à proximité du complexe RCT/CD3, permettant la propagation et la diversification des signaux via les molécules adaptatrices LAT (*linker for activation T cell*) ou SLP76 (*SH-2 domain containing leukocyte protein 76KDa*). LAT interagit directement ou indirectement avec la PLC- γ (*phospholipase C γ*) initiant le signal calcium et l'activation de la protéine kinase C (PKC) notamment la PKC θ . SLP76 recrute Vav1, GEF (*guanine exchange factor*) des GTPase de la famille Rho, intervenant dans la réorganisation du cytosquelette. Cette réorganisation intracellulaire est responsable de l'activation du LT (**Figure 12**). Ces voies sont finement régulées puisqu'il est possible de les inhiber par l'intermédiaire de phosphatases ou par l'internalisation du RCT. Ces voies de signalisation sont associées aux cascades de signalisation des cytokines et surtout à la formation de la synapse immunologique.

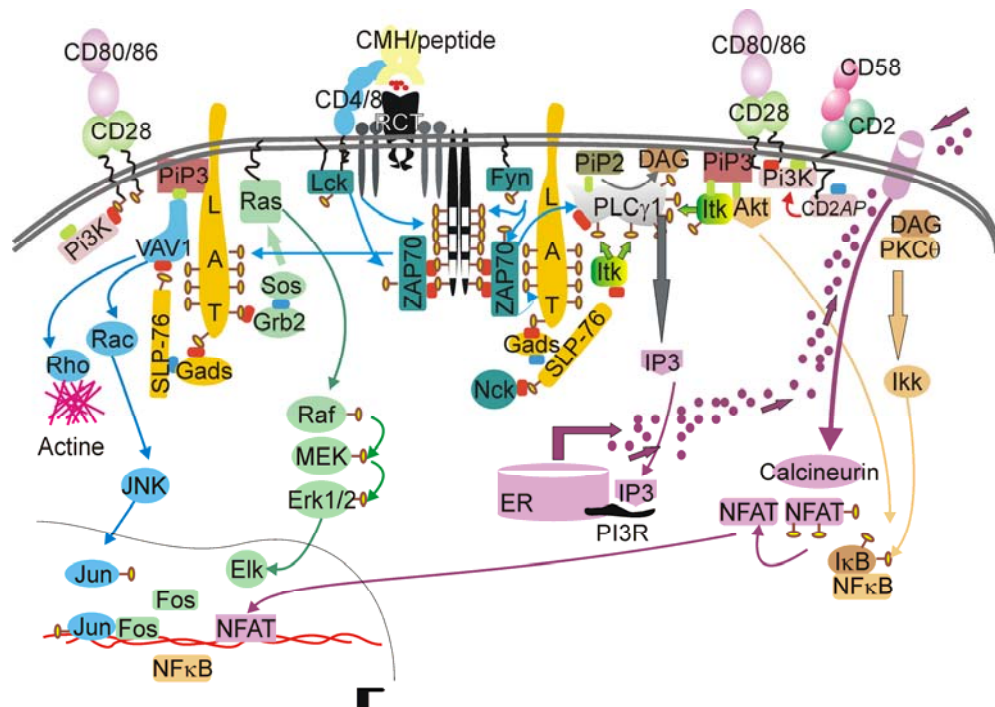


Figure 12: Voie de signalisation en aval du RCT :

Représentation de la voie du calcium (violet), PKCθ (orange), MAPK (65) et PI3K (bleu) qui convergent vers le noyau pour activer les facteurs de transcription nécessaire à la pleine stimulation du LT. Adapté de figure extraite de l'article de Valitutti et Espagnolles dans Encyclopedia of life science 2005

L'activation d'une cellule T, comme décrit précédemment, n'est pas seulement dépendante de l'activation du RCT. En effet, un second signal fourni par les CPA est nécessaire. Ce signal dit de costimulation fait intervenir des molécules de costimulation dont les ligands sont exprimés à la surface des CPA suite à leur activation par un signal danger (comme de l'inflammation). La molécule de costimulation qui est constitutivement exprimée sur les LT, CD28, reconnaît le ligand B7.1/B7.2 présent à la surface des DCs activées (90). Cette reconnaissance permet une amplification du signal RCT comme il est schématisé dans la **Figure 12**. En effet, la molécule CD28 intervient dans la signalisation de PI3K et dans la formation du facteur de transcription AP1 (89). D'autres molécules sont aussi capables de fournir un signal de costimulation des LT comme il est décrit dans le paragraphe suivant. La reconnaissance de l'antigène par les LT en absence du signal de costimulation résulte à l'anergie du LT (89).

C. Les molécules de costimulation

Plusieurs molécules agissent positivement sur les cellules T au niveau de leur métabolisme et de leur capacité à proliférer, à produire des cytokines, à survivre, et à se

maintenir au cours du temps dans l'organisme. Ces molécules se divisent en trois familles : les membres de la superfamille des Igs, les membres de la famille TNFR (comme décrit dans la **Figure 13**) et les récepteurs des cytokines. Leur hiérarchie d'activation n'est pas encore complètement comprise, plusieurs pensées sont en débat à savoir si ces molécules s'engagent de manière simultanée, ou avec une différence dans le temps ou/et dans l'espace en réponse à une activation de la cellule T.

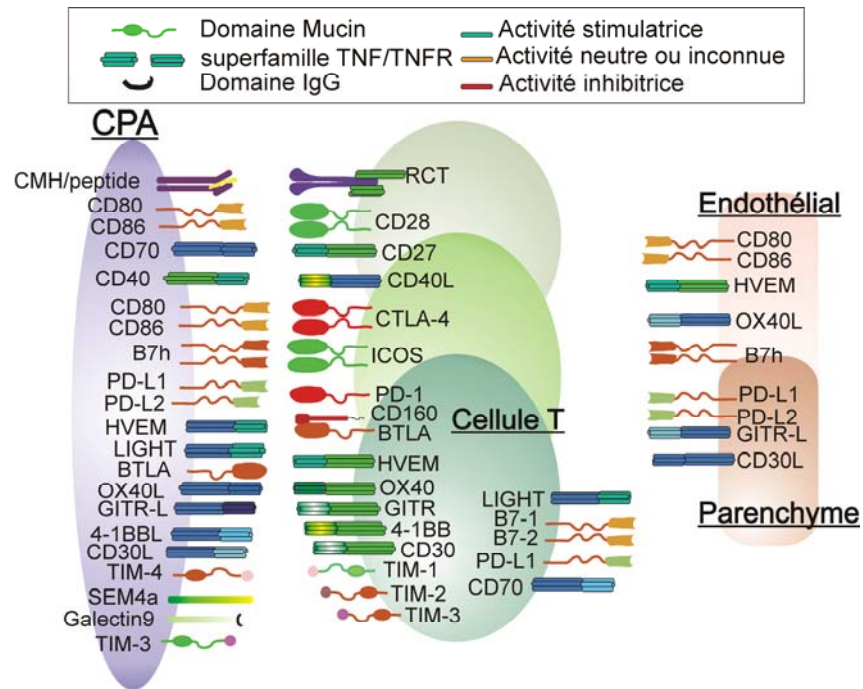


Figure 13: Représentation des molécules de costimulation et de leurs ligands.

Les molécules de costimulation sont nommées selon leur ordre d'expression par les LT (colonne du milieu) avec une expression constitutive pour les LTn (en haut au centre), suivies d'une expression précoce par les LT activés (au milieu au centre) et une expression plus tardive sur les LT_e ou LT_m (en bas au centre). Les ligands de molécules de costimulation sont exprimés par les CPA (à gauche) ou par les cellules endothéliales (en haut à droite) ou les cellules parenchymateuses (en bas à droite) ou par les deux types cellulaires (au centre à droite). Chaque molécule de costimulation peut avoir un effet positif ou négatif sur la stimulation : rouge (effet inhibiteur), vert (effet activateur) et bleu ou marron (effet neutre ou inconnu). Adapté de l'article (90)

1. Les membres de la superfamille des immunoglobulines.

Les membres de la famille des Igs permettent une activation efficace des cellules T par amplification du signal RCT en réponse à la reconnaissance du complexe CMH/peptide. En effet, l'absence des molécules de costimulation entraîne l'anergie de la cellule T (91). Les molécules de costimulation décrit dans ce paragraphe sont CD28 avec ses ligands B7.1/B7.2 et son antagoniste CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen*

4), la molécule ICOS (*inducible T cells costimulator*) avec pour ligand ICOSL et l'inhibiteur PD-1 avec ses ligands PD-L1/PD-L2.

a- CD28/CTLA-4

A l'origine, la molécule CD28 est considérée comme une molécule d'adhésion (92, 93), par la suite la voie de signalisation de CD28 est élucidée (94). En effet, la stimulation de CD28 provoque la phosphorylation des tyrosines de nombreux substrats cellulaires. C'est ainsi que par la suite la signalisation de la molécule CD28 est identifiée comme le « signal 2 » du RCT sachant que l'activation du RCT représente le « signal 1 » (95). La combinaison des deux signaux est importante pour l'augmentation de la production de la cytokine IL-2 et la progression des cellules dans le cycle cellulaire (95). Par ailleurs, l'absence du signal 2 entraîne la cellule dans un état d'anergie (95).

Suite à la l'interaction de CD28 avec ses ligands B7.1/B7.2 (CD80/CD86), la phospholipase PI3K est recrutée au niveau du domaine cytoplasmique de CD28 entraînant une cascade de signalisation distinguée de celle du RCT qui aboutit à l'activation la protéine kinase Akt (**Figure 12**). Cette kinase est impliquée dans la translocation du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor kappa B cell*) dans le noyau permettant l'expression de gènes codant pour les facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-x_L (*B-cell lymphoma extra large*). La voie PI3K permet, via l'association de LAT et Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*), la translocation du facteur de transcription NF-AT (*nuclear factor of activated T cell*) et du AP-1 afin d'assurer la transcription optimale de ses gènes cibles comme celui codant pour IL-2 (95, 96) (**Figure 12**). De plus, la voie PI3K/Akt favorise l'absorption du glucose et de la glycolyse par augmentation de l'expression du récepteur au glucose, mécanisme essentiel pour le soutien de la synthèse moléculaire (97). En 1999, l'équipe de Lanzavecchia a montré qu'une stimulation anti-CD3 et anti-CD28 permet une redistribution des radeaux lipidiques, phénomène non observable lors d'une stimulation avec uniquement un anti-CD3 (98), ceci suggère que la formation de la SI est dépendante de l'activation de CD28. Cependant, ces données sont contredites en 2002 par l'utilisation de souris déficientes pour CD28 où la SI est formée normalement (99).

Néanmoins, CD28 a un rôle important dans la réponse immunitaire puisque les souris déficientes pour CD28 ou des souris traitées avec des anticorps antagonistes

bloquant l'interaction de CD28 avec son ligand, manifestent une réduction de la réponse immunitaire face à des infections pathogéniques, des allogreffes, la GVHD (*graft versus host disease*) et de l'asthme (100). De plus, il est connu que l'absence de CD28 est associée : (i) à une diminution de la prolifération *in vitro* et *in vivo* des LT (101-103), (ii) à un problème dans la différenciation Th1/Th2 (104, 105), et (iii) à une inhibition de la formation des centres germinatifs et de la commutation des classes de Igs (106, 107). La molécule costimulatrice CD28 est aussi impliquée dans l'augmentation de l'expression de cytokines (IL-2, IFN- γ , IL-4 (108)), de chémokines (109), ainsi que de leurs récepteurs (110-112). De plus, CD28 est important pour l'induction de l'expression de molécules de costimulation qui sont impliquées dans une seconde vague de signalisation dans la cellule T (tels que CD40L, ICOS, OX-40, 4-1BB et CTLA-4) (111, 113). Toutes ces modifications liées à l'activation de CD28 sont nécessaires pour un établissement efficace des fonctions effectrices du LT et la re-stimulation des LTm lors d'une seconde infection (114). En effet, l'utilisation de souris déficientes pour CD28 ou pour son ligand a démontré l'importance de CD28 dans la réponse du système immunitaire en réponse à une réinfection qui se manifeste par une réduction de l'expansion des LTm (114).

L'inhibiteur de CD28 est CTLA-4. Ces deux molécules de costimulation ont les mêmes ligands présents sur les CPA maturées CD80/CD86 (115). CTLA-4 réside dans les vésicules intracellulaires de la cellule T et son expression à la surface est proportionnelle à la force du signal RCT (116, 117). CTLA-4 inhibe l'activation de la cellule T (i) par compétition avec CD28 pour ces ligands CD80/CD86, CTLA-4 ayant une plus haute affinité (118, 119), (ii) en délocalisant CD28 de la SI (120), et (iii) en modulant la signalisation par l'activation de la protéine phosphatase 2A (PP2A) et de la tyrosine phosphatase SHP-2 (121-123). CTLA-4 va entraîner une diminution de l'interaction de la cellule T avec la CPA ainsi qu'une diminution de la production des cytokines et de la prolifération (124).

b- ICOS/ICOSL

ICOS est exprimé suite à l'activation de la cellule T pour délivrer un signal positif à la cellule tout comme CD28. Son expression peut être induite par l'engagement de CD28 (125-128) mais aussi par la cytokine IL-4 (129). ICOS, comme CD28 à la capacité de lier PI3K à son domaine cytoplasmique (125). Par contre, une variation de la séquence cytoplasmique d'ICOS lui confère, contrairement à CD28, l'incapacité de

recruter Grb2 qui est nécessaire à la transcription du gène codant pour l'IL-2 (127, 130). Son ligand, ICOSL, est exprimé aussi bien sur les cellules lymphoïdes que non lymphoïdes. La voie de signalisation de ICOS/ICOSL est importante pour la réponse Th1/Th2 (131), pour la prolifération des cellules B et leur différenciation en plasmocytes (132) et pour l'inhibition de l'apoptose par augmentation de l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-xl (126).

c- PD-1/PD-L1

PD-1 est un récepteur inhibiteur de la signalisation des LT. L'activation de PD-1 entraîne une inhibition de la prolifération et de la production des cytokines. PD1 est exprimé à la surface des LT, des NK (*natural killer*), des LB et des monocytes activés. Les ligands de PD-1, PD-L1 et PD-L2, sont exprimés sur les DCs, les macrophages, les cellules de la moelle osseuse et sur les LT pour PD-L1 seulement (133). Le ligand PD-L1 est plus exprimé que PD-L2. PD-1 transduit son signal inhibiteur, si et seulement si, il est engagé avec son ligand simultanément avec le RCT ou le RCB (*Récepteur des cellules B*). L'activation de PD-1 entraîne le recrutement des phosphatases SHP1 et SHP2 qui déphosphorylent les molécules effectrices de la signalisation du RCT et BCR. De plus, PD-1 réduit l'activité de CD28 en supprimant l'activation d'Akt, du métabolisme du glucose et de l'expression des gènes codant pour les protéines de survie comme Bcl-x_L (134). La voie PD-1 est impliquée dans le phénomène d'épuisement des LT CD8⁺ comme il est plus détaillé plus loin dans le manuscrit. Les souris déficientes pour PD-1 développent une splénomégalie et sont susceptibles au développement de maladies auto-immunes (135, 136).

2. Membres de la superfamille TNFR

Les membres de cette famille se distinguent des autres molécules costimulatrices par la présence de leur "*Death Domain*" (DD) qui permet le recrutement des protéines adaptatrices TRAF (*TNFR-Associated Factor*). Ces récepteurs sont impliqués dans l'activation positive ou négative des voies de l'apoptose. Cette famille regroupe de nombreux membres dont OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) et CD40 (**Figure 13**) qui seront abordés dans les prochains paragraphes.

a- OX40/OX40L

OX40 a été identifié en 1987 par l'utilisation d'un anticorps réagissant envers les cellules CD4⁺ de rat (137). Il est principalement exprimé sur les LT CD4⁺ versus les LT CD8⁺, sur les LB, les DCs et les éosinophiles. Son expression peut être induite sur les LTn entre 12 à 24h suite à l'activation du complexe RCT/CD3. *In vivo* son pic d'expression est entre 2 à 3 jours post-immunisation. Il peut être réexprimé en 4h après une re-stimulation des cellules effectrices et mémoires (138). Le ligand d'OX40, OX40L, est exprimé à la surface des CPAs telles que les DCs, les LB, et les macrophages. Son expression est induite suite à une maturation de la CPA via les TLR et maintenue pendant plusieurs heures voire plusieurs jours après activation de la CPA (139).

Des études *in vivo* et *in vitro* sur des cellules déficientes pour OX40 ou OX40-L ont montré une diminution dans le nombre de cellules CD4⁺ générées suite à une réponse contre le virus LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*), ou le virus VSV (*vesicular stomatitis virus*), ou contre une protéine antigénique ou encore un haptène (140-143). Cette réduction cellulaire est associée à une diminution des LTm générées (144). En effet, l'injection d'un anticorps anti-OX40 après l'immunisation, entraîne une accumulation du nombre de cellules T CD4⁺ antigènes spécifiques au cours du temps (144, 145). Des résultats similaires ont été obtenus avec des souris transgéniques exprimant de manière constitutive OX40-L à la surface des DCs sous le contrôle du promoteur CD11c (146). Toutes ces données suggèrent que l'interaction OX40/OX40L est impliquée dans la survie et le maintien des cellules CD4⁺ activées au cours du temps (139, 147, 148). En effet, les travaux de l'équipe Croft et coll. montrent que OX40 régule, en synergie avec CD28, l'expression des molécules anti-apoptotique Bcl-x_L et Bcl-2 (149). Le rôle d'OX40 sur la survie des LTm CD4⁺ sera expliqué plus loin dans cette thèse.

b- 4-1BB/4-1BBL

La molécule 4-1BB a été découverte en 1989 lors d'une étude d'une librairie d'ADN complémentaire de clone de LT activés (150). Dès que la cellule T est activée, l'expression de 4-1BB est augmentée et maintenue (151-156). La molécule 4-1BB est aussi présente à la surface des cellules NK et des Treg CD4⁺CD25⁺. Le ligand de 4-1BB, 4-1BBL, est exprimé à la surface des CPAs activées incluant les DCs, les LB et les macrophages (139).

C'est par l'utilisation d'anticorps anti-4-1BB (157), ou d'une molécule soluble 4-1BBL (158), ou de CPA surexprimant 4-1BBL (156, 159) qu'il a été montré, contrairement à la molécule OX40, que 4-1BB peut costimuler le LT de manière indépendant au signal CD28.

Les souris déficientes pour 4-1BBL montrent une diminution de 2 à 10 fois du nombre de LT CD8⁺ antigène spécifique suite à une allogreffe (159), ou à une infection avec le virus LCMV (160, 161) ou le virus influenza (159). Ces résultats sont associés à une réduction du nombre de cellules mémoires générées. L'implication de 4-1BB dans la survie des LTm CD8⁺ sera détaillée plus loin dans le manuscrit. Par ailleurs, il a été montré que 4-1BB influence la réponse immunitaire secondaire à un virus (160, 162). Ces études ont été confirmées par les travaux de Cooper et coll. qui montrent, à l'aide d'un système de transfert adoptif et d'une protéine de fusion de 4-1BB, une diminution de 2 fois du nombre de LT CD8⁺ spécifiques à l'antigène après une immunisation avec un antigène émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund (163). Ces données sont associées à une réduction de la capacité des CTL à produire de l'IFN- γ ceci sans affecter leurs fonctions cytolytiques (160, 163). Ainsi, la molécule 4-1BB est impliquée dans la régulation du nombre et de la différenciation des LT CD8⁺ suite à la rencontre antigénique.

c- CD40/CD40L

La molécule CD40 a été identifiée pour la première fois sur des LB (164), et par la suite sur les DCs, les monocytes, les plaquettes et les macrophages, on peut aussi la retrouver à la surface des cellules non hématopoïétiques telle que les myofibroblastes, les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales (165). Le ligand de CD40, CD40L, est principalement exprimé à la surface des cellules CD4⁺ activées plus tôt que des cellules CD8⁺, on le retrouve aussi à la surface des LB et des plaquettes (165). Dans des conditions d'inflammation, CD40L est présent à la surface des monocytes, des cellules NK, mastocytes et des basophiles (165).

CD40 et CD40L sont des régulateurs importants de la réponse immunitaire humorale et cellulaire. En effet, en 1993 plusieurs laboratoires ont associé le syndrome d'hyper IgM à une mutation dans le gène codant pour CD40L (166-170), ce qui implique CD40L dans la commutation de classe des Igs. Des expériences *in vitro* ont

montré que l'association d'un anticorps anti-CD40L avec de la cytokine IL-4 entraîne une production IgE alors qu'avec la cytokine IL-10 c'est une sécrétion d'IgM, IgA et IgG qui est favorisée (171). L'interaction CD40/CD40L est montrée comme ayant une fonction dans l'expansion des LB, la formation des centres germinatifs, et dans la génération des plasmocytes et des LB mémoires (172, 173). De plus, il a été observé que les patients atteints du syndrome d'hyper IgM succombent en général d'une infection parasitaire due à une incapacité à développer une réponse lymphocytaire T. Ces observations suggèrent que l'interaction CD40/CD40L est importante dans la réponse des cellules T (174, 175). Des LT CD4⁺ déficients pour CD40L transférés dans un hôte normal sont incapables de s'activer et de proliférer suite à l'immunisation avec la protéine KLH (*Keyhole Limpet Haemocyanin*) ou HEL (*Hen Egg Lysozyme*) (176, 177). De plus, il a été montré dans un modèle murin de diabète (NOD : *Non-Obese Diabetes*), qu'un traitement avec un anti-CD40L chez une jeune souris femelle empêche le déclenchement d'une insulite et l'apparition de la maladie, et ce même traitement chez une vieille souris entraîne un ralentissement de la maladie (178). Ces études suggèrent une l'implication de l'interaction CD40/CD40L dans les maladies auto-immunes (178-182). L'interaction CD40L/CD40 entraîne une augmentation de l'expression des molécules de costimulation et d'adhésion sur la CPA telles que CD80/CD86, CD23, LFA-1, ICAM-1, 4-1BBL et CD44 et le CMH I et II (183, 184). Il a été aussi observé que des LB activées avec un anti-CD40 entraînent une augmentation de la production des cytokines (TNF- α , IL-1 β , LT- α (*lymphotoxine α*), GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating Factor*), IL-6, et IL-12) (185-187). L'expression de ces différentes molécules de costimulation et la sécrétion de ces cytokines, suite à l'interaction de CD40/CD40L, privilégient un environnement favorable pour une pleine activation et différenciation des LT CD4⁺. D'autres études ont démontré l'importance de l'interaction CD40/CD40L dans la fonctionnalité des LTm CD8⁺ suite à une réinfection, ces études seront décrites plus loin dans cette thèse.

D. Les molécules d'adhésions

Une relation a été mise en évidence entre l'adhésion intercellulaire et la génération d'une réponse immune efficace. En effet, des maladies génétiquement rares sont associées à une déficience des molécules d'adhésion de la famille des intégrines qui

mènent à des infections récurrentes et, dans de nombreux cas, à une mort précoce des patients (188, 189).

L'interaction des intégrines avec leurs ligands résulte en un changement de conformation au niveau de leur domaine cytoplasmique qui permet d'avoir une activité bidirectionnelle : vers l'intérieure de la cellule ("*outside in signalization*"), et vers l'extérieur de la cellule ("*inside-out signalization*") (190). En effet, par leur changement de conformation, les intégrines ont la capacité de recruter des molécules du cytosquelette, permettant une augmentation de leur adhésivité (191-200). Ainsi ces intégrines favorisent la formation de la SI (76, 84, 201) et facilite la reconnaissance de l'antigène (202). Les intégrines représentent une grande famille de récepteurs hétérodimériques, les plus importantes étant : LFA-1 qui interagit avec ICAM présent à la surface des CPA, intégrine $\alpha_4\beta_7$ qui se lie à MADCAM1 (*mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1*) et VLA4 (*Very late antigen*) qui reconnaît VCAM-1 (*vascular cell-adhesion molecule 1*). Les intégrines ont un rôle direct dans la durée de contact entre le LT et la CPA ce qui peut influencer le devenir d'un LTn.

III. Le pic de la réponse immune

A. Phase d'expansion

Suite à la reconnaissance d'un complexe CMH/peptide spécifique, les LTn se divisent rapidement (3 à 4 divisions par jour pour les LT CD8⁺) entraînant une expansion de LT spécifiques à l'antigène supérieure à 1000 fois en quelques jours (203). Cette expansion est associée à des changements moléculaires permettant la formation des LTe. L'expansion cellulaire des LT se fait dans les organes lymphoïdes secondaires. Il faudra une diminution de l'expression des molécules de « *homing* » CD62L et CCR7 pour permettre aux LTe de rentrer dans la circulation sanguine via la lymphe et de se disséminer dans l'organisme pour combattre l'infection (204). Ainsi, par l'action combinée des LTe CD4⁺ et CD8⁺ l'organisme sera très rapidement nettoyé du pathogène et protégé à long terme de ce dernier. Les cytokines IL-2 et IL-15 peuvent moduler la migration des LT par augmentation ou répression de l'expression de CCR7 et CD62L respectivement (204, 205). Les molécules de *homing*, CD62L et CCR7, sont nécessaires pour l'entrée des LT dans les ganglions, mais pas pour leur entrée dans les tissus périphériques (204, 206). La phase d'expansion permet aux LTn spécifiques de passer

de 100-200 précurseurs spécifiques à 10^5 - 10^6 fois plus suite à une infection virale et ceci en 8 jours (83). Les mécanismes qui contrôlent le taux d'expansion clonale ne sont pas bien définis et sont souvent attribués à la quantité d'antigène présente *in vivo*. Suite à une infection avec le virus VV (*vaccina virus*) associé avec une faible ou haute quantité de l'épitope de l'ovalbumine, le groupe de Wherry montre que l'amplitude de la réponse des LTe CD8⁺ est proportionnelle à l'abondance de l'épitope (207). D'autres expériences révèlent que la charge d'antigène régule le nombre de LTe ceci par un transfert adoptif de LT dans une souris normale qui est, par la suite, immunisée avec différentes doses de stimuli (208-211). Le phénomène de prolifération n'est pas indéfini, même dans une situation d'infections chroniques l'expansion clonale cesse par un épuisement du LTe CD8⁺. La phase d'expansion est nécessaire pour augmenter le nombre de précurseurs et pour permettre la formation de LT ayant des fonctions effectrices spécifiques. Durant cette phase, plusieurs paramètres participant au devenir du LT seront décrits plus loin dans le manuscrit.

1. Les cellules T effectrices

a- Les LT CD4⁺

Les LTn CD4⁺ prolifèrent moins rapidement que les LTn CD8⁺, ainsi un délai de 1 à 2 est jours est nécessaire aux cellules CD4⁺ pour atteindre le pic de prolifération par rapport aux LT CD8⁺ suite à une infection virale (212). Ceci s'explique par le fait que physiologiquement il n'est pas nécessaire d'avoir beaucoup de LT CD4⁺ activés par rapport au LT CD8⁺, car un LT CD4⁺ a la capacité d'aider plusieurs LT CD8⁺ et LB. La différenciation des LT CD4⁺ n'est pas seulement dépendante de la stimulation antigénique, mais aussi des facteurs extrinsèques tels que les cytokines comme décrit précédemment. Le rôle majeur des LTe CD4⁺ est d'inhiber la réplication virale par sécrétion de cytokines antivirales, d'activer les DCs et d'aider les LT CD8⁺ et les LB (212). L'aide des LT CD4⁺ dans la réponse des LT CD8⁺ sera détaillée plus loin dans le manuscrit.

b- Les LT CD8⁺

Une brève stimulation de 2 à 24h *in vitro* est suffisante pour permettre la différenciation des LTn en LTe (213, 214), ce qui suggère que la différenciation est

programmée très tôt dans l'activation du LTn. Ce concept de programmation sera détaillé plus loin dans le manuscrit.

Les LTe CD8⁺ se caractérisent par leur capacité à éliminer les cellules infectées grâce à leurs fonctions effectrices cytolytiques. En effet, grâce à la libération de granules lytiques riches en perforine et granzyme au niveau de l'interface du LT et de la cellule infectée, les LTe CD8⁺ vont engendrer l'apoptose de la cellule cible. Les LTe CD8⁺ interviennent dans l'élimination des cellules cibles via leurs mécanismes de dégranulations de granules lytiques, mais aussi via l'activation de récepteurs d'apoptoses tels que TRAILR (*TNF-related-apoptosis-inducing-ligand receptor*) et Fas.

2. Activité cytotoxique des LTe CD8⁺

a- La perforine

Les patients ayant une mutation au niveau du gène codant pour la perforine manifestent une diminution de leur réponse immunitaire face à des infections de pathogènes intracellulaires (215, 216). Les souris Perf^{-/-} développent spontanément des lymphomes associés à une immunodéficiência et à une incapacité à se protéger contre une infection virale (217-219).

La perforine, qui est sous forme de monomère dans les granules lytiques, est libérée par exocytose au niveau de l'interface entre la CTL et la cellule cible (220). Ainsi une fois ancrée à la membrane, la perforine se polymérise pour former un pore cylindrique de 5 à 20 nm dans la membrane de la cellule cible (36, 221, 222). La présence des pores permet d'une part l'entrée passive des granzymes dans la cellule cible et d'autre part un débalancement osmotique de la cellule entraînant la mort cellulaire (222). Ces études sont remises en question par la démonstration que les pores générés par la perforine sont trop petits pour permettre l'entrée de molécules comme les granzymes (223, 224). En effet, l'équipe de Bleacklef et coll. montre que la perforine est dispensable puisqu'en son absence les granzymes ont la capacité de pénétrer dans la cellule cible. Pour se faire, la granzyme A agirait par association avec le récepteur mannose-6-phosphate présent à la surface de la cellule cible pour pénétrer dans la cellule via le mécanisme d'internalisation par endocytose. Ainsi une fois à l'intérieur les granzymes peuvent interagir avec leurs substrats et induire la mort cellulaire (225).

Un autre mécanisme cytotoxique a été décrit par l'équipe de Lieberman et coll.. Ils ont montré que le flux calcique généré suite à la formation des pores de perforine entraîne l'activation de mécanisme de réparation de la membrane dans la cellule cible. En effet, les vésicules intracellulaires comme les lysosomes et endosomes ont la capacité de fusionner avec la membrane cellulaire pour en réparer ses dommages (226-230). Par conséquent, le duo granzyme/perforine va être internalisé dans la cellule cible par endocytose pour pouvoir induire la mort cellulaire.

Même si des études montrent que, la perforine n'est peut-être pas essentielles pour l'entrée dans la cellule des protéases, elle reste essentielle pour la cytolysse (231).

b- Les granzymes

Les granzymes appartiennent à la famille des sérines protéases, ce sont des complexes moléculaires entraînant la mort cellulaire de manière dépendante ou indépendante des caspases. Les caspases sont des protéases à cystéines qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose, nécrose et d'inflammation. Ces protéases sont inactives dans le cytoplasme de la cellule et elles doivent être hydrolysées pour être activées. Les granzymes se divisent en 2 groupes : granzyme A et granzyme B. Ces deux protéases induisent indépendamment, mais en synergie la mort cellulaire (232).

(i) La granzyme A

La granzyme A est la protéase la plus abondante dans les CTL et dans les NK (233, 234). La granzyme A clive les protéines contenant des acides aminés basiques tels que l'arginine ou la lysine, et entraîne la mort cellulaire de manière caspase indépendante par clivage de l'ADN en simple brin. L'utilisation de la technique de chromatographie par affinité avec un mutant de la granzyme A a permis d'identifier la voie de signalisation de la granzyme A (235). Ainsi, il a été montré que la granzyme A est associée au complexe SET (270-420 *KDa endoplasmic-reticulum associated complex*). Ce complexe lui-même est associé à une protéine impliquée dans la torsion de l'ADN : HMG2 (*high mobility group 2*) et à une enzyme réparatrice de l'ADN : Ape1 (*human apurinic endonuclease 1*) (236). L'interaction de la granzyme A avec ce complexe se fait principalement par une association avec le RE. Ainsi, la granzyme A va agir en clivant SET et HMG2 résultant à des perturbations d'assemblage des nucléosomes et à une incapacité au complexe SET/HMG2 à se fixer et à tordre l'ADN.

De plus, la granzyme A réduit les activités réparatrices en clivant l'enzyme endonucléase Apel via un mécanisme redox. Ces perturbations vont affecter le changement de structure de la chromatine qui est nécessaire pour la réplication, recombinaison, transcription, et réparation de l'ADN et vont faciliter l'accès de l'ADN aux endonucléases.

(ii) La granzyme B

La granzyme B clive ces cibles au niveau des acides animés acides, essentiellement l'acide aspartique. Elle peut induire la mort cellulaire par deux voies : (i) en activant directement la voie des caspases entraînant ainsi une fragmentation de l'ADN, de la membrane nucléaire et du cytosquelette (237) ou (ii) en activant la cascade de signalisation mitochondriale (238). Ces 2 mécanismes d'apoptose sont décrits plus loin dans ce chapitre.

L'absence des molécules de perforines et granzymes n'affectent l'activité cytolytique puisque d'autres récepteurs peuvent prendre la relève comme FAS/FASL et TRAIL/TRAILR.

c- FAS/FASL et TRAIL/TRAILR

L'absence de la voie Fas/FasL entraîne chez l'homme et la souris un syndrome de lymphoprolifération (239). Fas est exprimé sur les LT et son ligand, FasL, sur les cellules cibles et les LT. L'activation de la voie Fas/FasL se traduit par la trimérisation du récepteur et par le recrutement au niveau de son domaine cytoplasmique du complexe FADD (*fes-Associated death domain*). Le complexe FADD associé en outre à la procaspase 8 forme le complexe DISC (*death inducing signalling complex*) (240). C'est dans le complexe DISC que la procaspase 8 va s'autoactiver par protéolyse. Ainsi, la caspase 8 activée va pouvoir agir de 2 façons pour entraîner la mort de la cellule : (i) soit par activation directe de la caspase 3 (ii) soit par formation de l'apoptosome. Ces mécanismes sont décrits plus loin dans ce chapitre.

La voie de signalisation du récepteur TRAIL (TRAILR) est identique à celle de Fas/FasL. Cependant, TRAIL en plus d'être impliqué dans la lyse des cellules infectées et aussi impliqué dans l'élimination des cellules CTL qui n'ont pas reçu de l'aide des cellules CD4⁺ (241, 242). L'aide CD4⁺ est décrit en détail plus loin dans le manuscrit.

B. La phase de contraction

Suite à l'élimination d'un antigène, les LTe CD8⁺ antigènes spécifiques déclinent de manière impressionnante suite à l'élimination de l'antigène. En effet, 90 à 95 % de la population antigène spécifique disparaît du sang et des organes lymphoïdes secondaires dans un délai de 1 à 2 semaines. Cette diminution dramatique est associée à la survie de 5 à 10% de cellules qui auront la capacité de survivre tout le long de la vie de l'organisme sous la forme de LTm.

Plusieurs groupes ont étudié les événements associés à cette phase de mort précipitée, appelée la phase de contraction. Cette phase fait intervenir tous les mécanismes d'apoptose qu'une cellule peut effectuer et des mécanismes de sélection qui ne sont pas encore complètement connus.

1. Les mécanismes de l'apoptose

La mort cellulaire par apoptose se fait par l'activation de récepteurs apoptotiques aboutissant à l'activation des caspases. Ces partenaires apoptotiques vont être expliqués ci-dessous afin de pouvoir introduire les deux voies apoptotiques : intrinsèque et extrinsèque.

a- Les récepteurs apoptotiques

Suite à la fixation de leurs ligands spécifiques, les récepteurs apoptotiques vont recruter l'une des deux molécules adaptatrices au niveau de leur domaine cytoplasmique appelé « death domain » (DD) : soit la molécule adaptatrice FADD ou TRADD (*TNF-Receptor Associated DD*). FADD contrôle la mort cellulaire par le recrutement et l'activation des caspase 8 et 10, tandis que TRADD contrôle les fonctions non apoptotiques par recrutement de kinases ayant un domaine DD telles que RIP-1 (*receptor-interacting protein-1*) (243), des E3-ubiquitines ligases telles que TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*), et des inhibiteurs d'apoptose tel que cIAPs (*cellular Inhibitor of apoptosis proteins*) (244). Ces composants permettent l'activation du facteur de transcription NF-κB par phosphorylation de IκB (*inhibitor of NF-κB*) et la voie des MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) telles que JNK (*jun N-terminal kinase*), p38, Erk1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase 1/2*) et AKT (245-249). Les récepteurs apoptotiques se divisent en deux catégories basées sur la première protéine adaptatrice qu'ils fixent : (i) FAS, DR4, et DR5 qui se fixent à FADD, et (ii) TNFR1 et

DR3 qui lie TRADD. Cependant, les voies de signalisation peuvent s'entrecroiser entre les deux types de récepteurs à apoptose (250-252).

b- Les caspases

Les caspases jouent un rôle central dans la régulation et l'exécution de la mort cellulaire. Les caspases sont des protéases qui se caractérisent par la présence d'une cystéine au niveau de leur site d'activation. Les caspases peuvent être synthétisées comme des protéines précurseurs d'enzyme inactif : les zymogènes (253). Leur transformation en forme active survient avec le contact des récepteurs d'apoptose avec leur ligand, ou par autoprotéolyse (254). Les résultats des réactions protéolytiques dans lesquelles les caspases sont concernées, sont la rupture du cycle cellulaire, l'élimination des mécanismes de réparation et d'homéostasie, l'initiation de la séparation de cellules du tissu adjacent, la destruction des composants structuraux de la cellule et l'expression à la surface des cellules de signaux (comme des phosphatidyl-serines) entraînant leur phagocytose par les macrophages (255). Les activités des caspases sont régulées par plusieurs inhibiteurs naturels et synthétiques. Il existe plusieurs caspases ayant des fonctions différentes dans la cellule : les caspases -1, -4, et -5 participent essentiellement aux réponses inflammatoires, les caspases-8 et -9 initient la propagation des signaux d'apoptose, tandis que les caspases-3, -6 et -7 exécutent le programme d'apoptose à travers les clivages protéiques (256).

2. Les différentes voies d'apoptose

La mort cellulaire peut être déclenchée par l'activation de 2 voies distinctes : (i) la voie d'apoptose extrinsèque, qui met en vedette les récepteurs apoptotiques, les caspases et les molécules pro-apoptotiques et (ii) la voie intrinsèque qui est régulée par une balance entre les molécules pro-apoptotiques et anti-apoptotiques.

a- La voie apoptotique extrinsèque.

La voie extrinsèque fait intervenir les récepteurs d'apoptose dont chacun reconnaît un ligand spécifique (récepteur/ligand : TNFR1/TNF, FAS/FASL, DR3/TL1A, DR4/TRAIL, DR5/TRAIL) qui va entraîner leur oligomérisation (257, 258). La transduction du signal apoptotique débute par la formation du complexe protéique DISC au niveau du domaine cytoplasmique des récepteurs d'apoptose oligomérisés (259). Le complexe DISC constitue un regroupement des molécules adaptatrices DD (FADD ou

TRADD), de deux isoformes de la pro-caspases 8 a/b, de la pro-caspase 10 et de la forme cellulaire de FLIP (cFLIP : *cellular caspase-8 (FLICE) like inhibitory protein*). La formation du DISC résulte en l'activation des pro-caspases-8 et 10 par autoprotéolyse. L'action de la caspase-8 activée est dépendante de la quantité du complexe DISC présent dans la cellule. En effet, si le niveau d'expression de DISC est élevé celui de la caspase-8 activée le sera aussi, ainsi la caspase va pouvoir directement activer les caspases-6, -3 et -7. Par contre si la quantité du complexe DISC est faible, celui de la caspase-8 activée le sera aussi, donc la caspase-8 va agir par amplification des clivages protéiques pour activer la voie apoptotique. Effectivement, la caspase-8 va cliver les protéines de la famille Bcl-2 telle que BID pour générer un BID tronqué (tBID : *truncated BID*). Le fragment tBID va se localiser au niveau de la mitochondrie entraînant l'agrégation des molécules pro-apoptotiques BAX et BAK résultant à la libération du cytochrome c dans le cytoplasme (260). Ceci va permettre à l'apoptosome de se former en s'associant au cytochrome c, à la pro-caspase 9 et à la protéase APAF1 (*apoptotic-protease-activating factor-1*). L'apoptosome va activer la pro-caspase-9 qui à son tour va stimuler les caspases-3, -6 et -7. De nombreuses études *in vivo* indiquent que le signal via Fas dans les cellules T est dirigé par activation de la voie intrinsèque dans des conditions de faible niveau du complexe DISC. En effet, il a été montré que dans les souris transgéniques pour BCL-2 ou déficientes pour BAX et BAK, les cellules T ne sont pas protégées de l'apoptose par Fas (261, 262).

Le choix entre les deux voies extrinsèques (haut ou faible niveau du complexe DISC) dépend de la sensibilité des LT envers l'apoptose. En effet, l'apoptose peut être modulée soit par une diminution de l'expression de la protéine cFLIP (263-265), soit par une expression importante des molécules anti-apoptotique de la famille BCL-2, telle que BCL-2 ou BCL-X_L (266), soit finalement par inhibition de la voie de Fas via la molécule de costimulation CD28 (267). De plus, il a été récemment montré que la voie Fas peut induire l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la survie incluant la voie NF-kB, ERK1/2, JNK et AKT (245-248).

b- La voie de signalisation intrinsèque

Cette voie permet l'activation de la cascade des caspases suite à l'activation de la cellule via un stimulus incluant le RCT, les irradiations UV, l'absence de cytokines etc. La voie intrinsèque de l'apoptose est un équilibre entre l'activation des membres anti-

apoptiques et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Figure 29). Les molécules anti-apoptotiques sont Bcl-2, Bf-1, Bcl-w, Bcl-xL, Bcl-B et Mcl-1 (268), se caractérisent par la présence de 3 ou 4 domaines BH3 et se situent dans le cytoplasme au niveau de la membrane mitochondriale, cellulaire, de l'enveloppe nucléaire ou du RE (268). Le groupe de molécule pro-apoptotiques est composé de Bax, Bak, Bok, Bcl-xS (variant du gène bcl-x), et Bcl-GL, et se caractérise par la présence de 2 ou 3 domaines BH3 et a une structure similaire à celle des molécules de pro-survies (268). Dans ce groupe se distingue un sous groupe ayant seulement un domaine BH3 (« BH3-only ») qui est constitué de Bad, Bcl-GS (un variant du gène bcl-b), Bid, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Noxa et Puma (268). Cette voie de signalisation va résulter en la perméabilisation de la membrane mitochondriale (269, 270). Comme précédemment décrit, la perturbation de la membrane mitochondriale résulte à une libération du cytochrome c et à la formation et activation de l'apoptosome (253).

3. La mort par apoptose des LTe

La mort cellulaire par apoptose des LTe est nécessaire au rétablissement de l'homéostasie et est dépendante de deux mécanismes : AICD (*Activated-Induced Cell Death*) (259) ou ACAD (*Activated-Cell Autonomous Death*) (271).

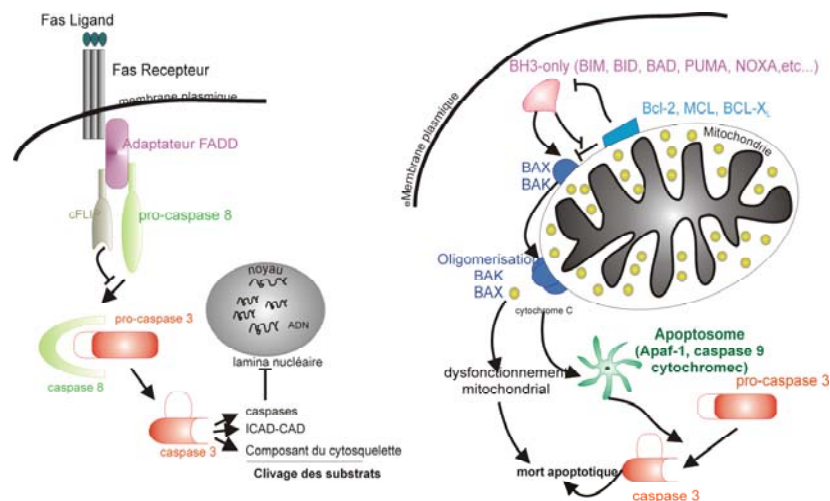


Figure 14: Schématisation des voies apoptotiques des LT.

À gauche représentation de la mort apoptotique par AICD (*Activated-Induced Cell Death*) et à droite représentation de la mort apoptotique par ACAD (*Activated-Cell Autonomous Death*)

a- L'apoptose par AICD

Ce terme a été inventé en 1989 par le groupe de Green et coll. par l'observation de thymocytes mourant par apoptose suite à une activation via leur molécule CD3 (272).

Il est maintenant connu que la mort *in vitro* des hybridomes de cellules T ou de cellules T activées après une re-stimulation via leur RCT est menée par Fas ou TNF α (273). À la différence des LTe, les LTn sont résistants à l'AICD due à la présence d'une haute quantité de cFLIP (263). La cytokine IL-2 rend les LT sensibles à la mort par AICD en diminuant le niveau de cFLIP durant la phase S du cycle cellulaire (263). Cette mort cellulaire vise la stimulation des récepteurs d'apoptose (242, 259, 274-277).

(i) Carence en cytokine

Durant l'expansion clonale, la cytokine IL-2 est importante et lorsqu'elle devient limitante, les LT qui expriment l'IL-2R meurent par apoptose due à l'absence d'IL-2 (278). En effet, il a été montré *in vivo* qu'un traitement avec l'IL-2 avant de vacciner les animaux entraîne une accumulation des LTe. Par contre, si le traitement est fait après la stimulation antigénique une délétion massive des LT est observée (279, 280). De plus, une sécrétion continue de l'IL-2 entraîne, au niveau des LT, une augmentation de l'expression de Fas et une diminution de FLIP suite à la stimulation de STAT-5 (via IL-2R β), ce qui rend les LT sensibles à la mort cellulaire via Fas (263, 281, 282). Ainsi, l'IL-2 agit aussi bien positivement (pendant la phase d'expansion) que négativement (pendant la phase de contraction) sur les LT. Ceci laisse sous-entendre que la mort par AICD peut être dépendante de facteurs de transcription activés selon le cycle cellulaire de la cellule. En effet, il a été montré que la stimulation du RCT entraîne l'activation du facteur de transcription E2F-1 (facteur impliqué dans la régulation des gènes lors de la prolifération cellulaire (283)), ainsi que les gènes régulés par p53 tel que *p73* (facteur qui régule le stress et le développement des cellules (284)) (285, 286). L'expression d'un dominant négatif ou l'inactivation des gènes E2F-1 ou *p73* chez la souris résulte à une absence d'apoptose via la voie de l'AICD (285). La mort cellulaire entraînée par la carence en cytokine est indépendante des caspases proximales, mais dépendante des caspases en aval. En effet, les souris déficientes pour Fas ou FADD, ou surexprimant un inhibiteur de la caspase 8 (tel que *crmA: cytokine response modifier a*) montrent un défaut au niveau de la voie apoptotique dépendante de Fas, sans affecter la voie dépendante de la carence en cytokine. Inversement, les souris surexprimant Bcl-2, ou déficientes pour Bim ou pour simultanément Bax et Bak montrent aucun problème au niveau de la voie d'apoptose dépendante de Fas, mais un défaut est observé au niveau la voie apoptotique dépendante de la carence en cytokine (261, 262).

b- Suicide ou homicide?

Durant l'activation des LT, ces cellules expriment transitoirement FasL et TNF. Ces ligands peuvent s'engager avec leurs propres récepteurs présents sur la cellule ou avec ceux adjacents à la cellule (287, 288). La voie Fas est prédominante dans la mort par AICD, puisque les souris Fas déficientes manifestent un délai avant la délétion de LT pour donner suite à l'administration *in vivo* d'un superantigène ou un d'antigène (289, 290). Ces résultats soulignent le fait que l'interaction Fas/FasL agit plus tôt que TNFR/TNF dans la mort AICD durant la phase de contraction (291).

c- L'apoptose par ACAD

La mort cellulaire par ACAD est dépendante du ratio entre les molécules anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille BCL-2 au niveau de la mitochondrie (271, 292) (**Figure 14**). L'ACAD se caractérise par une diminution de l'expression de Bcl-2 qui est causée par différents mécanismes: (i) soit via une diminution des cytokines qui soutiennent l'expression de Bcl-2, tel que IL-2 dont la sécrétion est réduite lors de la phase de contraction,(ii) et/ou via la présence des ROS (*reactive oxygen species*) qui inhibent la synthèse des anti-oxydants protégeant les LT de l'apoptose (293) (iii) et/ou via la présence des PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) qui inhibent l'activité d'AKT, kinase impliquée dans l'activation de Bcl-2. En effet, les cellules T déficientes pour PTEN sont résistantes à l'apoptose (294). La diminution de l'expression de Bcl-2 dans les LT est probablement le déclenchement du déséquilibre de l'équilibre entre les molécules pro-apoptotiques et anti-apoptotiques.

Les membres de la famille BCL-2 agissent dans l'apoptose au niveau du cytochrome c et de l'apoptosome (295-297). Les membres *BH3-only* appartenant à la famille Bcl-2 agissent plutôt comme senseurs des signaux apoptotiques qui se traduisent par une initiation des cascades de signalisation en activant Bax et Bak (298). Les molécules anti-apoptotiques agissent en séquestrant les *BH3-only* protéines ce qui permet la survie de la cellule. Noxa (299) et Puma (300, 301) sont les cibles du suppresseur de tumeur p53 qui est induit lors d'un dommage à l'ADN. Bad est activé via la protéine kinase A et AKT, et agit principalement dans des situations de carence en cytokine (302) (**Figure 14**).

d- Autres mécanismes régulant l'apoptose

(i) La voie NFκB

NF-κB est un facteur de transcription inactif dans le cytoplasme de la cellule due à sa séquestration avec l'inhibiteur IκB. La signalisation du RCT entraîne la phosphorylation de IκB et donc l'activation de NF-κB. NF-κB actif va se diriger vers le noyau pour exercer sa fonction de transcription de gènes spécifiques. NF-κB peut prévenir de la mort par AICD en favorisant la transcription de molécules anti-apoptotiques tels que Bcl-X_L ou en activant cFLIP (267, 303-305). La perte de NF-κB conduit à une augmentation des réactifs ROS (*Reactive Oxygen Species*) dans la cellule (306, 307). Cette augmentation supprime l'expression de Bcl-2 menant à la mort des LT via la voie intrinsèque de l'apoptose (308). De plus NF-κB module des facteurs de survie comme le surpresseur de tumeur *p73* (309). L'augmentation de l'expression de *p73* est associée à une mort par AICD (285). Ces données montrent que le facteur de transcription NF-κB est impliqué dans des signaux de survie et de mort cellulaire programmée par sa séquestration ou sa libération dans le cytosol (310, 311).

(ii) La voie HPK1/HPK1-C

HPK-1 (*hematopoietic progenitor kinase 1*) a son activité kinase fortement augmentée suite à la stimulation du RCT. Cette stimulation va entraîner le clivage de la portion C terminal de HPK1 formant ainsi HPK1-C (312, 313). La forme HPK1-C supprime les effets de survie en favorisant la séquestration de NF-κB via le complexe IκB rendant la cellule susceptible à l'apoptose. En effet, la séquestration de NF-κB empêche la transcription des gènes de survie. À l'opposé, la forme complète de HPK-1 active le complexe IκK (*inhibitor kappa B cell kinase*) qui est important pour la phosphorylation d'IκB et par conséquent la libération et l'activation de NF-κB. Ainsi, la forme complète de HPK-1 donne une résistance à la mort par AICD dans les LT (314).

(iii) Les cathepsines

Les cathepsines sont des protéases du lysosome, elles sont synthétisées sous forme de proenzymes (315), transportées dans les vésicules du lysosome et activées via un clivage protéolytique pour être transloquées dans le cytosol (315). Une fois dans le cytosol, les cathepsines peuvent induire la mort cellulaire par activation de la voie mitochondriale (316, 317) ou des récepteurs d'apoptose (318). Il a été montré que la

cathepsine B joue un rôle dans l'apoptose des cellules T (319) via l'activation des caspases (320, 321) ou via le clivage de substrat nucléaires (320, 322).

(iv) La famille Nur77.

Cette famille a été préférentiellement étudiée dans le développement des thymocytes dans le cadre de la sélection négative. Mais dans mes travaux, j'ai observé une implication d'un membre de cette famille dans la phase de contraction, je vais donc vous faire un résumé de ce que l'on sait sur cette famille.

Cette famille est composée des membres Nor-1 (*neural derived orphan receptor*), Nur77 et Nurr1, ceux sont des récepteurs aux stéroïdes orphelins (*Orphean steroid receptor*) ayant une haute homologie avec la famille des récepteurs de stéroïdes (323). Leur expression est régulée par le signal RCT via le flux calcique et ils sont impliqués dans l'apoptose des thymocytes autoréactifs durant la sélection négative (323, 324). Il a été démontré que le dominant négatif de Nur77 inhibe l'activation du RCT dans des hybridomes T *in vitro* (325, 326), et *in vivo*, il entraîne un défaut au niveau de la délétion des thymocytes autoréactifs (327, 328). De plus, les souris exprimant de manière constitutive Nor1 ou Nur77 montrent une mort massive des thymocytes (329). Il a aussi été observé que le niveau de l'activité du gène codant pour Nur77 corrèle avec l'étendue de l'apoptose des thymocytes. Or la transcription de Bim est critique pour l'apoptose des thymocytes autoréactifs, ceci permet de spéculer que la transcription de Nur77 et Bim sont impliquées dans la sélection négative des thymocytes (330). L'activation transcriptionnelle de Nur77 résulte à sa capacité à sortir du noyau pour se diriger vers la membrane mitochondriale et à interagir avec les membres de la famille BCL-2 en les rendant apoptotiques. En effet, il a été montré que Nur77 a la capacité de se fixer à la molécule anti-apoptotique Bcl-2. Nur77 se lie dans la boucle N terminale de Bcl-2 entre le domaine BH4 et BH3 ce qui entraîne un changement de conformation (331, 332). Cette modification structurale se traduit par un changement de la fonction de Bcl-2, effectivement Bcl-2 est convertie en molécule pro-apoptotique (332). Mais il a récemment été montré par l'équipe de Winotoo, que Nor-1 et Nur77 interagissent simultanément avec Bcl-2 pour engendrer la nouvelle fonction apoptotique de Bcl-2 dans les thymocytes (330). De manière intéressante il a été démontré que suite à une immunisation avec LM (*Listeria monocytogenes*), les LTe CD4⁺, au pic de la réponse, augmentent le niveau d'expression de Bim, Nor-1 et diminue celui de Bcl-2 (333) Ces

résultats tentent à suggérer que Nor-1 est impliqué dans l'apoptose de LTe par inhibition de l'activité anti-apoptotique de Bcl-2.

C. Les mécanismes de sélection : la vie ou la mort??

Suite à l'élimination de pathogène au pic de la réponse, 90 à 95% des LTe vont mourir par apoptose alors que seulement 5 à 10% vont se différencier en LTm. Les LTm sont des cellules ayant des caractéristiques spécifiques (qui seront décrites dans le chapitre suivant) leurs permettant de protéger l'organisme à long terme contre le pathogène pour lequel elles sont spécifiques. Ces cellules T sont primordiales pour la protection de l'organisme. Ainsi, la compréhension de leur formation est importante dans le but thérapeutique de l'amélioration de la vaccination entre autres.

Plusieurs études, dont celles que j'ai réalisées durant mon doctorat, ce sont intéressées à savoir comment 5 à 10% des LTe sont sélectionnés pour survivre et se différencier en LTm? Quelles sont les différences phénotypiques, génétiques des LTe qui survivent par rapport aux LTe qui meurent par apoptose?

Pour répondre à ces questions, des marqueurs intracellulaires et extracellulaires ont été étudiés afin de trouver dans la population des LTe CD8⁺ les marqueurs qui permettront de distinguer les LTe qui vont mourir par apoptose versus ceux qui vont survivre. Ces études ce sont basées sur l'expression de marqueurs de migration des LTe (expression de CD62L, CCR7), sur les fonctions effectrices des LTe (granzyme A/B, perforine, sécrétion des cytokines), et selon leur capacité à proliférer et à survivre (Bcl-2, IL-7R, CD122, CD28, KLRG1...). Cependant, l'expression de ces marqueurs varie selon le type et la durée de l'infection, selon les cytokines environnementales, la fréquence des LTn spécifiques d'un antigène (346, 347, 348, 349, 360) et leur localisation dans le corps, ce qui rend difficile la compréhension du choix décisif que font les LTe au pic de la réponse : survivre à long terme ou la mort par apoptose. C'est ainsi que des modèles de différenciation ont été décrits pour essayer de comprendre l'origine des précurseurs des LTm : (i) le modèle de différenciation linéaire qui propose une différenciation séquentielle des LTn en LTe et LTm (**Figure 15**) et (ii) le modèle de différenciation divergente qui suggère que les LTn choisissent de se différencier soit en LTe soit en LTm lors de la rencontre avec l'antigène (**Figure 16**). Or, ces deux modèles ne permettent de pas ne regrouper toutes les études faites sur la compréhension de choix

décisif (vie ou mort) des LTe. Ainsi, un troisième modèle a été mis en place dans lequel les modèles de différenciation linéaire et divergente peuvent être combinés. Ce modèle fait intervenir le concept de différenciation progressive en fonction du temps (**Figure 17**).

Dans les paragraphes suivants, chacun des modèles sera expliqué et les expériences amenant à la description de ces différents modèles seront décrites.

1. La différenciation linéaire

Dans ce modèle linéaire, les LTn se différencient en LTe suite à la reconnaissance de l'antigène. Après l'élimination du pathogène, 5 à 10% des LTe vont devenir des LTm. Soit dans ce modèle, les LTm sont issus des LTe. C'est donc un modèle de différenciation séquentielle du LTn en LTe et en LTm.

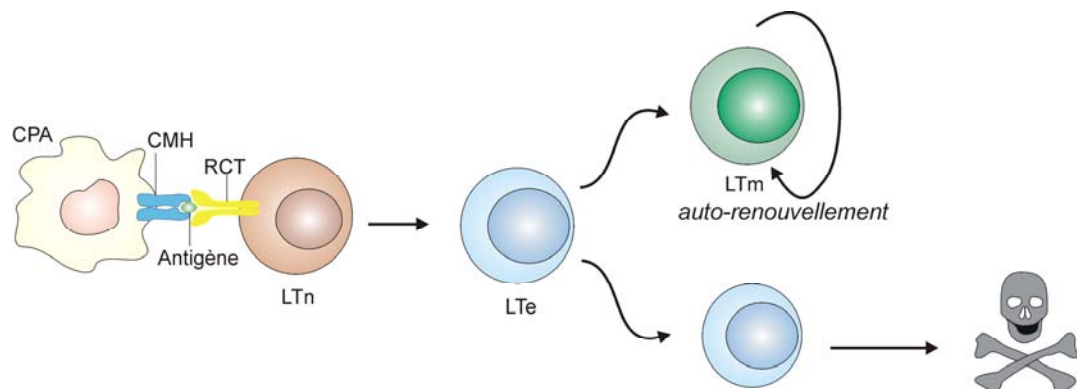


Figure 15: Représentation de la différenciation linéaire.

Suite à la reconnaissance, via le RCT, du complexe CMH/peptide présent à la surface des CPA, tous les LTn (cellule prolifèrent et se différencient en LTe (cellule bleue). Et suite à l'élimination de l'antigène, 90 à 95% des LTe vont mourir par apoptose alors que seulement 5 à 10% des LTe vont survivent et se différencier en LTm (cellule verte).

Les premières études qui soutiennent ce modèle ont été effectuées en 1999. L'étude de Jacob et coll. utilise un système de souris transgénique *CreLoxP* dans lequel les LTm et leurs précurseurs sont irréversiblement marqués par un gène rapporteur (334). L'expression de ce gène rapporteur est dépendante de l'activation du promoteur codant pour la granzyme B (334). L'immunisation de cette souris transgénique avec le virus LCMV entraîne l'apparition d'une population marquée avec le gène rapporteur $CD8^+$ au pic de la réponse et qui a la capacité de survivre à long terme ce qui démontre que les LTm dérivent de cellules ayant des fonctions effectrices (334). L'étude d'Opferman et coll. est en accord avec ce modèle. En effet, suite à une stimulation *in*

vitro, cette équipe démontre qu'il est nécessaire que les LT effectuent un certain nombre de division cellulaire (au moins 9) pour pouvoir survivre à long terme en tant que LTm (335). Les études de Kaech et coll. comparant le profil génétique des LTn, LTe et LTm suite à une infection à LCMV, ont mis en évidence que la perte des fonctions effectrices par les LTe CD8⁺ et l'acquisition des propriétés de LTm se fait de façon progressive au cours du temps (336). Très récemment, un autre modèle d'étude a été développé favorisant le modèle de différenciation linéaire. En effet, Bannard et coll. ont généré un modèle de souris transgénique permettant de suivre les LT qui ont acquis des fonctions effectrices à l'aide du gène rapporteur EYFP (*enhancer yellow fluorescent protein*) (337). Dans ce modèle de souris, le gène codant pour l'enzyme recombinaise Cre est inséré dans le gène codant pour la granzyme B et est dépendant d'un traitement au tamoxifen. Soit, dès l'activation promoteur codant pour le gène de la granzyme B et d'un traitement au tamoxifen, l'enzyme recombinaise Cre est transcrit et peut donc permettre l'expression du gène rapporteur EYFP en agissant sur ses substrats *loxP* (337). Ainsi, grâce à ce modèle de souris, les auteurs ont démontré que l'acquisition des fonctions effectrices se fait quelques divisions après la reconnaissance de l'antigène, et que les LT ayant acquies des fonctions effectrices ont la capacité de survivre à long terme en tant que LTm (337). Ainsi, cette étude est en faveur du modèle de différenciation linéaire, en suggérant que les LTm proviennent des LT ayant acquis des fonctions effectrices.

Les travaux de Hu et coll. supportent le modèle de différenciation linéaire des LT CD4⁺ pour expliquer le développement des LTm CD4⁺ (338). Pour ce faire, les auteurs mettent en culture pendant 3 jours des LT activés sans stimulation. Pendant, la culture certaines cellules meurent par apoptose tandis que d'autres survivent (338). Par la suite, les cellules T survivantes sont greffées dans une souris receveuse CMH II déficiente. Après 2 à 14 jours de greffe, les auteurs observent que 14% des LT CD4⁺ transférés sont toujours présents représentant ainsi les LTm (338). Ainsi, les auteurs suggèrent que les LTm sont des descendants des LTe. L'équipe de Weaver a développé un modèle de souris transgénique pour comprendre le choix de différenciation des LTe CD4⁺ (339). Dans ce modèle de souris transgéniques, les LT exprimant le gène codant pour l'IFN- γ seront associés à l'expression du gène rapporteur codant pour le marqueur allogénique Thy1.1 (339). Ainsi les LT IFN- γ ⁺ seront aussi Thy1.1⁺. Les auteurs démontrent que les

LTm CD4⁺ sont à l'origine de LTe IFN- γ ⁺Thy1.1⁺, ce qui suggère que les LTe sont les progéniteurs des LTm CD4⁺ (339).

Dans ce modèle linéaire, le choix des LTe qui survivent pour devenir des LTm serait basé sur la compétition pour les nutriments, les cytokines, les facteurs de croissance, l'antigène ou autres ressources environnementales qui limiteraient le nombre de LTe capable de survivre à la phase de contraction (340). Cependant même si ces différentes études soutiennent la différenciation linéaire, elles ne peuvent pas exclure l'idée que les précurseurs des LTm sont présents au pic de la réponse dans la population de LTe et que ces précurseurs se distinguent, des LTe qui meurent par apoptose, par un facteur intrinsèque qui peut être activé soit lors de la reconnaissance de l'antigène ou soit durant la phase d'expansion. On ne peut pas exclure non plus l'idée que durant la première division cellulaire du LT, suite à la reconnaissance de l'antigène, le choix de différenciation est déjà programmé, et que les précurseurs des LTm progressent en parallèle des LTe.

2. Modèle de différenciation divergente

Dans ce modèle de différenciation, suite à la reconnaissance de l'antigène, le LTn a le choix de se différencier soit en LTe qui va mourir par apoptose, soit en LTm qui va survivre à long terme dans l'organisme (**Figure 16**).

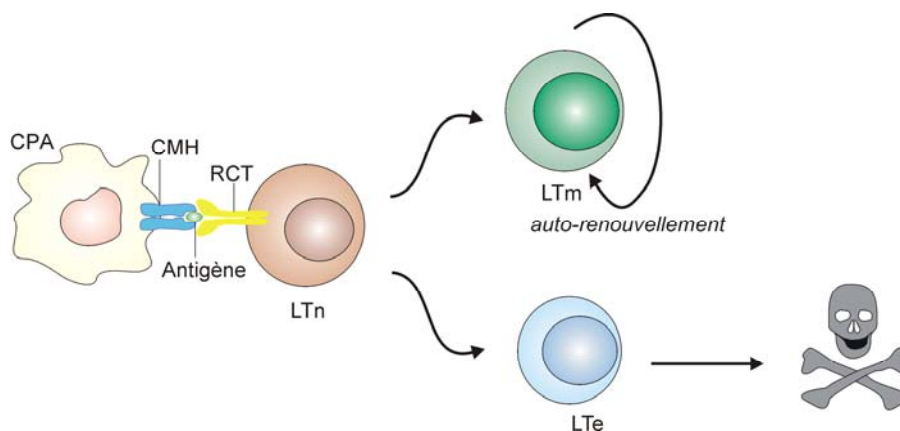


Figure 16: Représentation de la différenciation divergente des LT.

Suite à la reconnaissance de l'antigène par le RCT, les LTn (cellule marron) activés ont le choix de se différencier soit en LTm (cellule verte) soit en LTe (cellule bleue) dont leur devenir sera la mort par apoptose.

Ce modèle a été originalement supporté par les travaux de Manjunath et coll. montrant que les cytokines influencent la différenciation en LTe ou LTm. En effet, en

présence d'une haute concentration d'IL-2, les LTn acquièrent des propriétés de LTe tandis qu'en présence d'une forte concentration de IL-15, ils se différencient en LTm. D'autre part, si les LT sont stimulés en présence d'une forte concentration d'IL-2 et d'IL-15, aussi bien les LTe que LTm sont présents et se distinguent par leurs capacités de migration (205). La cytokine IL-15 favorise une migration des LT vers les ganglions, alors que l'IL-2 dirige préférentiellement les LT vers les sites d'inflammations (204).

L'équipe de Pamer défend ce modèle de différenciation divergente par l'utilisation de deux souches bactériennes qui diffèrent d'un épitope. En effet, les auteurs mettent en évidence que dans un cas les LTm CD8⁺ sont générés sans passer par le stade LTe (341). Ceci suggère que les LTn peuvent directement se différencier en LTm.

Une autre étude pouvant être considérée comme étant en faveur du modèle de différenciation divergente, est celle mettant en évidence qu'une immunisation avec les DCs accélère la génération des LT avec un phénotype de LTm. L'accélération du développement des LTm est dépendant du faible taux d'inflammation présent lors de la réponse immune (342, 343).

Par ailleurs, l'équipe de Reiner et coll. montre que lors de la première division cellulaire, la cellule fille qui est la plus proche de la CPA (cellule fille proximale) a une capacité vigoureuse de prolifération identique à celle des LTe; tandis que la cellule fille en position distale par rapport à la CPA se divise plus lentement et se différencie en LTm (344). Cette étude soulève l'idée d'une division asymétrique des LTn dès la première division cellulaire générant des cellules filles qui se distinguent par leur capacité à devenir ou non des LTm (344). Ainsi, cette étude soutient le modèle de différenciation divergente en suggérant que le choix de différenciation s'exécute dès la reconnaissance de l'antigène.

Récemment, l'équipe de Palmer a aussi développé une souris transgénique pour étudier la relation entre les LTe et les LTm CD8⁺ (345). Dans cette étude, une mutation est introduite au niveau de la portion transmembranaire de la chaîne β du RCT (345). Les auteurs ont démontré que suite à une infection avec LM, les LT transgéniques CD8⁺ spécifiques de l'antigène ont la capacité de proliférer et de se différencier en LTe (345). Cependant, le développement des LTm spécifiques de l'antigène est affecté par la mutation au niveau de la chaîne β du RCT (345). Ce défaut corrèle avec une faible

polarisation du RCT à la SI sans perturber l'interaction stable avec la CPA *in vitro* (345). De plus, les auteurs démontrent un défaut dans le recrutement de molécule PKC θ à la SI et dans l'induction du facteur de transcription NF- κ B (345). Cette étude suggère que un signal spécifique du RCT est dispensable pour la formation des LTe mais indispensable pour le développement des LTm. Cette observation suggère que le choix de différenciation est événement intrinsèque à la cellule T qui est effectuée suite à la reconnaissance de l'antigène.

3. Modèle de différenciation progressif

Tel que mentionné ci-dessus, plusieurs expériences en faveur du modèle de différenciation linéaire peuvent aussi être interprétées selon le modèle de différenciation divergente. En effet, rien n'exclut que les précurseurs des LTm évoluent en parallèle avec la population de LTe, ni que le choix de différenciation est établi par le signal RCT lors de la rencontre de l'antigène. Par ailleurs, le choix de différenciation divergente fait référence à un événement très précoce dans la stimulation de la cellule T. Cependant, il est difficile dans ce mode de différenciation de suivre les cellules filles qui, suite à la reconnaissance de l'antigène, auront les capacités de se différencier en LTm. C'est ainsi que l'idée de différenciation progressive est décrite. En effet, l'équipe de Lanzavecchia a proposé le concept de « *fitness* ». Ceci définit une différenciation progressive des LTe contrôlée par la force du signal RCT reçu par chacun des LTn au cours de leur activation (346, 347). En effet, dans cette étude il a été montré que des LT ayant une stimulation du RCT faible ou courte meurent par négligence. Par contre, les LT ayant reçu un fort et long signal RCT ont la capacité de survivre et donc éventuellement devenir des LTm (346, 347). Ce concept peut être intégré dans les deux modèles de différenciation.

Le modèle de différenciation progressif, suggère que la force et la durée de la stimulation, la costimulation, l'aide des LT CD4⁺ (qui sera décrit dans le chapitre suivant de cette thèse) et les cytokines inflammatoires (IL-12, IFN- γ , IFN- β et IFN- α) peuvent exercer un signal unique sur les LT menant à un degré de variation de stimulation et donc de différenciation du LT. De plus, l'action de ces facteurs peut spatialement et temporellement diverger, suggérant que le LT peut se différencier progressivement au cours du temps et de sa localisation (**Figure 17**).

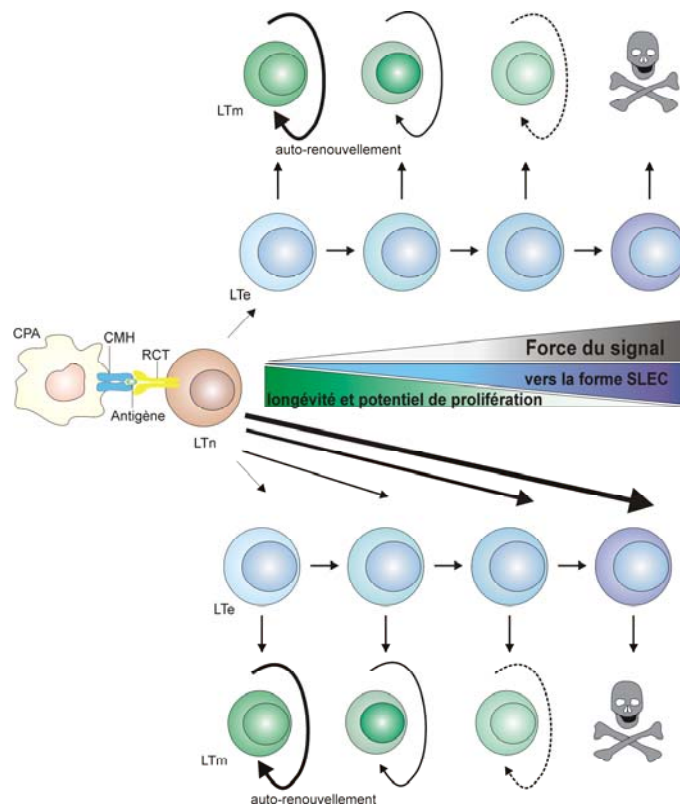


Figure 17: Représentation de la différenciation progressive des LT.

Suite à la reconnaissance de l'antigène, les LTn (cellule marron) se différencient selon un gradient de stimulation (flèche grise) acquièrent des propriétés selon un gradient de propriétés (flèche verte) qui leur permettent de survivre en se différenciant en LTm (cellule verte) ou se différencier en LTe (flèche bleue) qui vont mourir par apoptose (cellule bleue). Cette différenciation progressive dépendant de gradients peut aussi bien se réaliser dans un concept de différenciation linéaire (en haut de la figure) ou divergent (en bas de la figure). Adapté de l'article (348)

Suite aux différentes études appuyant le modèle de différenciation progressive qui seront décrites ci-dessous, il a été établi que les LT mourant par apoptose représentent des LTe ayant atteint un stade de différenciation terminal : les SLEC (*Short lived effector cell*). A la différence, les LTe ayant la capacité de survivre dans l'organisme en tant que LTm sont considérés comme des MPEC (*memory precursor effector cell*) (348, 349).

Dans les travaux de Joshi et coll. il a été montré que la quantité d'inflammation lors de la rencontre de l'antigène a une influence sur le devenir des LTe en agissant sur le programme génique des LTe. En effet, il est montré qu'en présence d'inflammation le facteur de transcription T-bet est fortement exprimé ce qui favorise une différenciation en SLEC (349). À la différence, une diminution de l'inflammation est associée à une diminution de l'expression de T-bet ce qui favorise le développement des MPECs (349).

Ces résultats montrent une influence de l'inflammation sur le programme génétique et donc sur le choix de différenciation des LTe (349). Ceci suggère que le choix de différenciation se fait progressivement dans le temps et est dépendant des cytokines environnantes. Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence que la maturation fonctionnelle des MPECs prend place au cours du temps par l'acquisition de propriétés de prolifération et d'expression de l'IL-2, Bcl-2 et CD62L (336, 350-353). De plus, il a été montré que l'expression de facteurs de transcription au cours du temps sont impliqués dans le choix entre la survie ou la mort par apoptose, tels que les facteurs de transcription Bcl-6, T-bet, Eomes, Id2 et Blimp-1 (349, 354-358). Ainsi, la différenciation progressive peut être contrôlée par des stimulations successives d'antigène ou par d'autres signaux (359). Par conséquent, des facteurs intrinsèques et extrinsèques intervenant progressivement au cours de la réponse immune influencent le devenir du LT. Ces facteurs seront détaillés dans le chapitre suivant.

L'étude de des Moulton et coll. sur la différenciation des LT CD4⁺ est associée à une différenciation divergente or on peut aussi lui associer un état de différenciation progressive (360). En effet, il a été montré que les LTn CD4⁺ spécifiques activés pendant 1, 2 ou 3 jours *in vitro* ont des caractéristiques des LTm CD4⁺ suite à un transfert adoptif dans hôte normal (360). Cependant, ces travaux dénotent un gradient de différenciation des LTn CD4⁺ défini par leur phénotype, leur capacité à sécréter de l'IFN- γ et à proliférer (360). Ainsi, l'idée de différenciation progressive est aussi applicable à cette étude.

Toutes ces études font référence à une programmation du LT selon les facteurs environnementaux pouvant influencer le devenir de la cellule T. Or, le concept de programmation peut avoir lieu lors d'un événement encore plus précoce que l'influence de l'effet des cytokines inflammatoires durant la phase d'expansion. En effet, on peut supposer que le choix de la cellule est dépendant de la force du signal RCT suite à la reconnaissance de l'antigène. Il est possible de suggérer que les LT qui pourront survivre à long terme sont des cellules dont la force du signal RCT est optimale pour activer l'expression de facteurs de transcription ou de récepteurs de cytokines impliqués dans le développement des LTm. C'est ainsi, que dans le laboratoire nous avons émis l'hypothèse que la force du signal RCT peut influencer le devenir des LT. En faveur de cette hypothèse, il a été montré qu'un défaut dans la molécule d'adhésion ICAM-1

affecte le développement des LTm CD8⁺ sans affecter la phase d'expansion (69). Ces résultats suggèrent que l'interaction entre le LT et l'APC est un événement important dans le choix du devenir des LT.

D. Facteurs intrinsèques et extrinsèques régulant le développement des LTm

Comme décrit ci-dessus, il est difficile d'identifier les précurseurs des LTm. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence des facteurs intrinsèques et extrinsèques qui interviennent dans le choix de différenciation des LT. Ces facteurs sont représentés de manière indépendante dans mon manuscrit, mais il en va de soit qu'un facteur intrinsèque peut influencer un facteur extrinsèque et inversement.

1. Facteurs intrinsèques

a- Les molécules de surface

Les populations de LTE sont très hétérogènes, et chaque sous-groupe se distingue par l'expression de certains marqueurs de surface permettant aux immunologistes d'essayer de déterminer les précurseurs des LTm.

En effet, au pic de la réponse, suite à une infection à LCMV, certains LTE expriment le récepteur à IL-7 (IL-7R^{high}) tandis que d'autres perdent l'expression de ce récepteur (IL-7R^{low}). Les LT CD8⁺ IL-7R^{high} sont considérés comme les précurseurs des LTm puisqu'ils sont capables de survivre dans l'organisme en absence d'antigène suite à un transfert adoptif contrairement aux LT CD8⁺ IL-7R^{low} (351). De plus dans l'étude de Badovinac et coll., dans laquelle les auteurs réduisent la phase de contraction par une absence d'inflammation lors de l'infection, les LT qui survivent corrént avec l'expression de l'IL-7R (343). Cependant, l'expression de l'IL-7R n'est pas le marqueur spécifique des LTm CD8⁺, puisque dans une situation d'immunisation avec un antigène émulsifié dans de l'adjuvant de Freund ou présenté par des DCs, les LTE générés expriment tous le récepteur à IL-7 bien que seuls 5 à 10% des LTE deviennent des LTm (361). Le marqueur KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor G1*) a récemment été associé à l'expression du récepteur à l'IL-7. Effectivement, les travaux de Joshi et coll. montrent que la réduction du récepteur à IL-7 corréle avec l'augmentation de KLRG1 ceci suite à une infection LCMV (349). Ainsi dans des conditions d'inflammation, les précurseurs

des LTm définis comme des cellules n'ayant pas atteint le stade de différenciation terminal, soit les MPECs, sont IL-7R^{high} KLRG1^{low} tandis que les LTe qui se rendent au stade de terminal de différenciation, soit les SLECs, sont IL-7R^{low} KLRG1^{high}. De plus, ces différences de profils coïncident avec l'expression du facteur de transcription T-bet qui est fortement exprimé chez les SLECs et faiblement chez les MPECs (349) ainsi qu'avec la présence de la cytokine IL-12 (349, 362).

b- T-bet et Eomesodermine (Eomes)

T-bet a été découvert par l'équipe du laboratoire de Glimcher en 2002 (363), c'est un facteur de transcription appartenant à la famille T-box, il est responsable de la différenciation des LT CD4⁺ en Th1 (6). Eomes appartient à la même famille et est considérée comme le « complice » de T-bet. Ces deux facteurs de transcription sont impliqués dans de nombreux aspects biologiques des LT (349, 356, 364). Effectivement, les souris doubles déficientes pour T-bet et Eomes manifestent une diminution du nombre de LTm CD8⁺ qui peut être associée à une perte de la chaîne CD122 (IL-2Rβ), chaîne commune au récepteur à IL-2 et IL-15 (IL-2 étant impliqué dans la phase d'expansion et l'apoptose et IL-15 dans la génération des LTm) (356). T-bet et Eomes participent aussi à l'induction de la transcription des gènes codant pour la granzyme B, la perforine et l'IFN-γ (364, 365). Toutes ces données suggèrent que T-bet et Eomes jouent un rôle dans l'investigation et le soutien d'un programme moléculaire régulant la différenciation des LTe en LTm (356, 366). En effet, il a récemment été montré que l'expression de T-bet influence le devenir des 2 sous groupes de LTe, SLEC et MPEC, présents au pic de la réponse après une immunisation avec LCMV (349). En présence d'inflammation et de la cytokine IL-12 une augmentation de l'expression de T-bet est observée dans les SLEC durant la phase effectrice. À la différence, l'expression de T-bet est diminuée dans les MPEC (349, 367). De plus, il a été montré que l'expression de T-bet et Eomes sont régulées par la présence d'IL-12. La cytokine IL-12 active positivement la transcription de T-bet mais négativement celle d'Eomes (356, 368). Ces données coïncident avec les résultats montrant une augmentation du nombre de LTm en absence de l'IL-12 (343, 369). Ces résultats révèlent que le niveau d'inflammation influence le taux d'expression des facteurs de transcription T-bet et Eomes qui à leur tour influencent le devenir du LTe. Un haut niveau d'inflammation, entraîne une augmentation de l'expression de T-bet et donc favorise la génération des SLECs.

Inversement, nous pouvons supposer qu'un déclin de l'inflammation favorise la transcription d'Eomes et donc la génération des MPECs. De plus, les travaux d'Interflokter et coll., montrent que T-bet réprime l'expression d'IL-7R lors du passage des LT dans le compartiment des LT_m ce qui augmente la taille de la population destinée à rester LT_e et à mourir par apoptose (367). Ainsi, le ratio T-bet/Eomes est important dans la transition LT_e en LT_m CD8⁺ (348).

c- Serine protéase inhibitrice (Spi)

Les membres appartenant à la famille des sérines protéases sont des inhibiteurs de protéases lysosomales induits par NF-κB et sont impliqués dans la protection des CTL contre l'apoptose (370). Les deux membres, Spi2A et Spi6 inactivent les molécules de granzymes B qui s'échappent des granules cytolytiques (371-373). En effet, une déficience de Spi6 ou Spi2A entraîne une diminution du nombre de CTL obtenu suite à une infection LCMV. Cette réduction du nombre de CTL est associée à une augmentation de l'activation de granzyme B qui en s'échappant des granules lytiques entraîne la mort cellulaire (373, 374). Par ailleurs, des souris déficientes en CD8⁺ et irradiées qui sont reconstituées avec des précurseurs de la moelle osseuse préalablement transfectés avec un ARNm anti-sens codant pour la protéase Spi2A, développent un défaut dans la phase d'expansion clonale et dans la taille de la population LT_m suite à une infection LCMV (372). L'inhibition de Spi2A par un ARNm antisens est associée à une augmentation de la cathepsine B et de la caspase 3 qui sont impliquées dans la mort par AICD (372). Ces données suggèrent que les sérines protéases sont impliquées dans la génération de LT_m en protégeant les LT_e de la phase de contraction (375).

d- ID2: inhibitor of DNA binding 2

Les protéines Id s'associent aux E-protéines pour empêcher ces dernières de se fixer à l'ADN. Les E protéines sont des répresseurs ou des activateurs de la transcription (376-378). Les Id protéines sont impliquées dans le développement et le maintien des LT. En effet, la déficience en Id3 mène à un blocage au stade double positif des thymocytes lors de leur développement dans le thymus (378, 379). La souris Id2 déficiente, ne montre aucun problème au niveau du développement thymique et du nombre de cellules LT en périphérie, par contre, la population de NK, de DC CD8⁺, de cellules de Langerhans et de cellules intra épithéliales sont absents (380-382). Ces

données soulignent l'importance de ces protéines dans le développement des cellules immunitaires. De plus, il a été montré une régulation dynamique de l'expression d'Id2 lors d'une infection (354). En effet, au pic de la réponse et durant la phase mémoire de la réponse immune, la protéine Id2 est fortement exprimée. Les LT CD8⁺ Id2 déficients (Id2^{-/-}) atteignent le pic de la réponse rapidement suite à une infection générant ainsi moins de LTe comparés aux LT CD8⁺ normaux. De plus, il est observé que les LTe CD8⁺ Id2^{-/-} obtenus sont éliminés rapidement résultant en une diminution de 5 à 10 fois du nombre LTm généré par rapport aux LTe CD8⁺ normaux (354). La déficiente Id2 est associée à une augmentation des molécules Bim et CTLA-4, et une diminution des molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Spi6 (354). Ces résultats suggèrent que la protéine Id2 joue un rôle important dans la survie de LTe ce qui offre un rôle indirect de Id2 dans la taille et la composition des LTm (354). En effet, il a été aussi observé que la déficience Id2 est associée à une faible fréquence des MPECs, qui est proportionnelle aux LTe formés (354). Ces résultats suggèrent que la protéine Id2 est impliquée dans la transition LTe en LTm et surtout montre une influence des E protéines dans ce phénomène.

e- Bcl-6

Bcl-6 est un répresseur transcriptionnel essentiel pour la formation des centres germinatifs des LB (383). Bcl-6 réprime directement le facteur de transcription Blimp-1 qui est impliqué dans la différenciation des LB. Bcl-6 est impliqué dans la différenciation et le maintien des LB mémoires (384). A l'aide de différents modèles de souris, il a été montré que Bcl-6 est aussi important dans la génération et le maintien des LTm. En effet, les souris déficientes pour Bcl-6 (Bcl-6^{-/-}) manifestent une diminution dans l'expression de la granzyme B (385) et dans le nombre de LTm antigènes spécifiques (355, 386), ce qui implique Bcl-6 dans le développement des LTm CD4⁺ et CD8⁺ (355, 387). Les souris Bcl-6^{-/-} ont une phase d'expansion normale, mais manifestent une phase de contraction plus prononcée. Une fonction accordée à Bcl-6 est d'inhiber la mort par AICD. De plus, il a été montré que l'homologue de bcl-6, Bcl-6b est impliqué dans la fonction des LTm CD8⁺, et que l'expression de Bcl-6b diminue la prolifération des LT en réponse à IL-2. Par ailleurs, les souris Bcl-6b déficientes ont une réponse primaire normale, mais un défaut est observé lors de la réponse secondaire (388).

f- B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1)

Blimp-1 est un facteur de transcription répressif essentiel pour la différenciation des LB en cellules sécrétrices d'anticorps (ASC : *Antibody-Secreting Cells*) (389) et est nécessaire pour leur différenciation (390). Blimp-1 joue aussi un rôle dans le maintien de l'homéostasie des LT et dans l'embryogenèse. Les souris Blimp-1 déficientes (Blimp-1^{-/-}) ou reconstituées avec du foie foetal Blimp-1^{-/-} développent une maladie immune se manifestant par une inflammation léthale au niveau de plusieurs organes qui est causée par une accumulation des LTe et LTm (391, 392). De plus, il a été montré que Blimp-1 est impliqué dans la boucle régulatrice d'IL-2 (390). Effectivement, l'expression de Blimp-1 est négativement régulée par l'IL-2 *in vitro* dans les LT CD4⁺ et CD8⁺ activés (393, 394), alors que le locus du gène de l'*Il-2* est réprimé par Blimp-1 (393). Donc, les LT qui n'expriment pas Blimp-1 sont moins susceptibles à la mort par AICD puisque l'accumulation d'IL-2 favorisera la phase d'expansion (391). Une étude récente de *microarray* comparant des LT Blimp-1^{-/-} avec des LT normaux révèle que Blimp-1 est impliqué dans différenciation terminale des LT et dans l'inhibition de l'acquisition des propriétés de LTm (357, 358). En effet, les souris Blimp-1^{-/-} infectées avec le virus influenza manifestent un défaut dans la programmation transcriptionnelle des LTe, dans l'acquisition des fonctions effectrices et dans le *homing* des LT (357). Par conséquent, Blimp1 n'est pas essentiel pour la génération des LTm, mais il est important pour le développement d'une réponse effectrice (357). Ces données sont en accord avec l'étude de l'expression génique obtenue par *microarray* au pic de la réponse dans laquelle il a été mis en évidence une diminution des gènes impliqués dans les fonctions effectrices (granzyme A/B, perforine, FasL), et des facteurs de transcriptions impliqués dans la formation de SLECs (T-bet, Id2) (357, 358). À la différence, il a été observé une augmentation du facteur de transcription Bcl-6, des molécules de « *homing* » CD62L et CCR7, de la molécule de costimulation OX-40, et de la sérine protéase Spi2A (357, 358). Toutes ces données impliquent Blimp-1 dans la formation de SLEC (358). De plus, l'absence de Blimp-1 est associée à un défaut de migration des LT lors d'une réinfection due à un défaut d'expression des récepteurs de chémokines CCR7 et CCR5 (357). De plus, l'absence de Blimp-1 déséquilibre le ratio entre T-bet et Eomes au pic de la réponse suite à une infection. Effectivement, au pic de la réponse, les LT CD8⁺ Blimp-1^{-/-} expriment un faible niveau d'expression de T-bet et inversement un haut niveau de Eomes comparé aux LT normaux, ce qui implique Blimp-1 dans le choix de

différenciation SLEC (357). De plus, les LTm CD8⁺ Blimp-1^{-/-} ont la capacité de répondre à une réinfection, mais avec moins d'efficacité que les LTm normaux (357).

2. Facteurs extrinsèques

a- La force du signal RCT et de costimulation

La force du signal RCT défini par son affinité et avidité, peut influencer l'efficacité de la réponse à une infection virale (207, 395). Le signal RCT est dépendant de trois paramètres comme précédemment décrit : (i) la concentration et l'affinité de l'antigène qui détermine le taux de RCT engagés (55, 396, 397), (ii) la présence ou absence de molécules de costimulation qui sont impliquées dans l'amplification du signal RCT (98, 398, 399), (iii) et la durée de l'interaction qui définit la durée de la signalisation (400, 401). Par contre, nous ne comprenons toujours pas comment le signal RCT durant une infection ou une vaccination peut qualitativement influencer la différenciation des LTm? Le signal RCT est dépendant de 2 paramètres : sa force et sa qualité, la force du signal étant l'intensité de l'activation des voies de signalisation du RCT et sa qualité représente la quantité de voie de signalisation activée (**Figure 18**). Bien entendu, ces 2 paramètres sont entièrement dépendants de l'affinité et de l'avidité du RCT. Pendant mon doctorat, je me suis attardée à évaluer le rôle de la force du signal RCT sur le développement de la réponse CD8⁺.

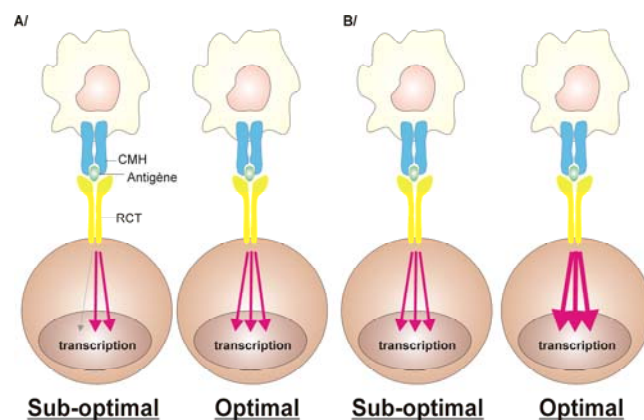


Figure 18: Schématisation de la force et de la qualité du signal RCT.

A/ Représentation de la qualité du signal RCT qui se définit par la quantité de voies de signalisation activées. B/ Représentation de la force du signal RCT qui se caractérise par l'intensité de l'activation des voies de signalisation.

Un signal limitant dans sa force et dans sa durée durant l'activation des LT peut altérer la production des LT et leur différenciation en LTm. En effet, des études *in vitro* montrent que la durée de stimulation affecte la différenciation des LT. Il suffit d'une

stimulation de 2 à 2,5 heures pour observer des divisions cellulaires de LT CD8⁺ et de 24h pour induire une différenciation en CTL (208, 213, 214). Plusieurs groupes ont mis en évidence que la force du signal RCT influence la différenciation des LT CD8⁺. En effet, certains ont utilisé la technique d'immunisation avec des DCs immatures pour mettre en valeur un défaut dans la prolifération des LT CD8⁺ et dans l'incapacité d'exprimer des molécules anti-apoptotiques et de récepteurs de cytokines impliquées dans l'homéostasie. L'immunisation avec des DCs immatures génère un signal suboptimal puisque les molécules de costimulations sont absentes à la surface de la CPA (402). Dans cette étude, c'est la signalisation des molécules de costimulation qui est affectée. Or, comme précédemment décrite, la signalisation des molécules de costimulation amplifie le signal RCT, ainsi un défaut dans leur signalisation affecte indirectement la force du signal RCT.

Le concept de "*fitness*" a été défini par l'équipe de Lanzavecchia, qui spécifie que la force du signal délivré par le RCT et les récepteurs de cytokines conduit la cellule vers un seuil de différenciation hiérarchisée dans le temps (346). Cette hiérarchie se définit par l'acquisition progressive de propriétés telles que la capacité de prolifération, suivit de l'acquisition des fonctions effectrices et éventuellement de la mort par apoptose. Ainsi, la force du signal dicte le devenir des LT CD8⁺ (346). Ceci suggère que le signal RCT requis pour favoriser le développement des LTm CD8⁺ doit être optimal du point de vue de sa force et de sa qualité (**Figure 18**).

b- Interaction entre LT et la CPA

Une reconnaissance spécifique entre un LT et une CPA via le complexe RCT/CMH/peptide entraîne l'activation du LT. En effet, des études *in vitro* réalisées avec des LT CD4⁺ humains montrent que la force du signal antigénique est dépendante du nombre de DCs, de la dose de l'antigène, de l'avidité du RCT et de la durée de l'interaction (403). Ces différents paramètres entraînent la différenciation progressive du LT CD4⁺ (403). Par conséquent, le temps d'interaction est un paramètre à ne pas négliger. En effet, des études ont montré une corrélation entre la durée d'interaction entre la DC et le LT et l'acquisition des fonctions effectrices. En effet, une brève interaction entre la DC et le LT résulte à une tolérance de la cellule T (404-406) alors qu'une interaction stable permet l'activation du LT CD8⁺ (63, 404). De plus, l'équipe de Bevan a montré que l'élimination des DCs 7h après l'immunisation entraîne une

activation des LT CD8⁺ et aussi la formation des LTm (407). Ceci montre que la durée d'interaction entre LTn et DC est importante pour le développement des LTe et LTm. Récemment il a été montré que l'absence de l'interaction LFA-1/ICAM-1 résulte à un défaut dans la durée de l'interaction du complexe RCT/CMH/peptide et dans la génération des LTm, le nombre de LTe obtenu est similaire à la condition normale, toutefois un défaut dans la production *ex vivo* IFN- γ chez ces LTe est observé (69). Ce résultat met en évidence l'importance d'une interaction stable entre le LTn et la CPA pour favoriser la formation des LTm. Mais l'interaction n'est pas le seul paramètre nécessaire à l'obtention d'un signal optimal pour la génération des LTm CD8⁺. Effectivement, les travaux de Zehn et coll. ont récemment montré *in vivo* que l'affinité du RCT pour son ligand a une influence sur l'amplitude de la réponse des LT CD8⁺ mais pas sur la fréquence de LTm générés (408). Dans cette étude les auteurs ont utilisé des peptides altérés pour observer la réponse au cours du temps. L'utilisation de peptides altérés entraîne une modification au niveau de l'affinité et de l'avidité du RCT. Les résultats obtenus dans cette étude dénotent une corrélation entre l'affinité et l'expansion clonale (408). Effectivement, plus l'affinité du peptide est faible plus l'amplitude de la phase d'expansion l'est aussi. Dans ces expériences quelque soit le nombre de LTe obtenus, celui des LTm correspond à la théorie des 5 à 10% (26, 408). Donc, ceci suggère qu'une altération de l'affinité et avidité entraîne un défaut au niveau de la phase d'expansion et par conséquent du nombre de LTm générés. Or dans cette étude la quantité d'épitope présenté à la surface des CPAs n'est pas mesurée, donc nous ne savons pas si les variations observées ne sont pas un défaut dans la quantité d'épitope présenté, qui est un paramètre à ne pas négliger si on observe les résultats décrits dans l'article n°2 de cette thèse. En effet, nous observons une corrélation entre la quantité d'épitope et le nombre de LTm générés.

Par ailleurs, d'après l'étude de Teixeira et coll. on peut suggérer l'existence d'une voie spécifique de la signalisation du RCT dans la génération des LTm (345). Cette étude démontre que cette mutation au niveau du domaine transmembranaire de la chaîne β du RCT entraîne un défaut dans la formation des LTm sans affecter la phase effectrice (345). Cette mutation est associée à un défaut de polarisation des molécules de signalisation telle que NF- κ B (345). Ceci suggère qu'une voie de signalisation du RCT faisant intervenir NF- κ B est spécifiquement impliquée dans le développement des LTm.

Ces données mettent en évidence l'importance de la force du signal RCT dans la différenciation des LTm. C'est ainsi que durant mon doctorat, nous avons établi un protocole qui nous a permis d'évaluer l'avidité du signal RCT pour son ligand dans le développement des LTm ceci sans affecter l'affinité du RCT.

c- Les cytokines à la chaîne commune γ

Les membres de la famille des cytokines γ qui influencent sur le développement des LTm sont d'IL-2, IL-7 et IL-15. Ces cytokines modulent la survie et la prolifération des LT CD8⁺ préférentiellement durant la phase de contraction. Les récepteurs de ces cytokines ont en commun la chaîne γ (CD132), IL-2R et IL-15R partage en plus la chaîne CD122 (IL-2R β), alors que l'IL-7 utilise la chaîne CD127 (IL-7R α). Ceci laisse présager que l'IL-2 et IL-15 peuvent avoir des effets similaires. Les cytokines IL-15 et IL-7 sont impliquées dans la transition LTe en LTm. En effet, l'absence de l'une des deux cytokines entraîne un défaut dans le compartiment LTm CD8⁺ (351, 409-412). Ces anomalies sont amplifiées lorsque les deux cytokines sont absentes (409, 411). Ces données suggèrent que l'IL-7 et IL-15 jouent un rôle dans la survie et le maintien des LT suite à stimulation. En effet, l'injection de l'IL-7 ou de l'IL-15 résulte à une augmentation des LTe obtenus suite à une stimulation antigène spécifique (413-416). Les effets de l'administration d'IL-7 et IL-15 sont plus impressionnants après le pic de la réponse qu'avant (414, 417). Ceci suggère que la phase d'expansion est indépendante d'IL-7 et IL-15 alors que la phase tardive de la réponse est dépendante de ces cytokines afin de former la mémoire immunologique. IL-2 joue un rôle aussi dans la modulation de la réponse CD8⁺ puisque son administration durant la phase de contraction favorise la survie des LTm CD8⁺ (418).

Le rôle de la cytokine IL-7 est soutenu par les résultats montrant que les SLECs se définissent par l'expression de KLRG1^{high} et CD127^{low} alors que les MPECs sont KLRG1^{low} et CD127^{high} dans une situation d'inflammation (349, 351, 419). Par contre, le signal IL-7 n'est pas le seul régulant la formation des LTm car dans des conditions de non-inflammation l'expression du récepteur à l'IL-7 est maintenue tout au long de la réponse immune, de même que dans une situation de surexpression de l'IL-7R la formation des LTm est assurée (361, 420, 421). Ceci suggère que les cytokines IL-2, IL-7 et IL-15 ont des fonctions complémentaires et superposées qui sont impliquées dans la transition des LTe en LTm.

d- Les autres cytokines

Au niveau de la signalisation, IL-12 est considéré comme le signal 3 de l'activation des LT (422). Le signal 1 étant le le signal RCT et le signal 2 étant le signal des molécules de costimulations. L'IL-12 est une cytokine pro-inflammatoire produite par les phagocytes influençant la formation des LT CD8⁺. En effet, les souris déficientes pour IL-12 (*p35*^{-/-}) infectées avec LM sont incapables de produire un nombre adéquat de LTe mais produisent une fréquence de LTm CD8⁺ supérieure à une souris normale (369). Cependant, la cytokine IL-12 peut remplacer l'utilisation d'adjuvant lors de son administration avec l'antigène (423-425). Ainsi, IL-12 peut directement agir sur les LT CD8⁺ en programmant les LT à persister à long terme comme les LTm CD8⁺ (423-425). Inversement, des données montrent que l'IL-12 joue un rôle clef dans la formation des SLECs (349, 369, 424, 425). En effet, IL-12 inhibe la transcription d'Eomes dans les LTe CD8⁺ suite à une infection, mais favorise l'expression de T-bet (349, 369). Ainsi, les effets de la cytokine IL-12 restent contradictoires.

L'absence d'IFN- γ est associée à un défaut dans la phase de contraction suite à une infection avec LCMV ou LM. En effet, les travaux de Badovinac et coll. montrent qu'un traitement aux antibiotiques avant l'infection avec LM entraîne la formation de LTm en absence de phase de contraction (343, 426). L'absence de contraction corrèle avec une diminution de la production de l'IFN- γ dès le début de l'infection et une augmentation de l'expression d'IL-7R à la surface des LTe CD8⁺. Ces données suggèrent que la phase de contraction est un événement programmé au début de l'infection et est dépendante de l'inflammation. De plus, à l'aide d'une technique de cotransfert de LT normaux ou déficients pour le récepteur à l'IFN- γ (*IFN- γ R*^{-/-}), il a été montré que l'IFN- γ est impliqué dans la transition de LTe en LTm puisque les LT *IFN- γ R*^{-/-} sont incapables de production des LTm CD8⁺ suite à une infection avec LCMV (427, 428). Le même résultat est observé avec le cotransfert de LT normaux ou déficients pour la cytokine IFN de type I (429). Ainsi, ces résultats suggèrent que la famille des interférons est impliquée dans la génération des LTm CD8⁺ (IFN- γ , IFN- α et IFN- β) (430).

De manière intéressante, l'équipe de Kaech a dissocié l'impact de l'antigène et de l'inflammation sur le choix SLEC/MPEC (431). Pour se faire, les auteurs ont immunisé des souris receveuses avec des DCs présentant un antigène en présence ou non de CpG

(431). Le CpG permet la production d'IL-12 et d'IFN γ . Dans un premier temps, les auteurs observent que l'inflammation entraîne une augmentation de l'amplitude de la phase effectrice et des fonctions effectrices obtenues par les LTe en comparaison avec une vaccination sans inflammation (431). Cependant, la fréquence des LTm est similaire (431). Ceci suggère que les cytokines inflammatoires favorisent la différenciation des LTe vers le stade terminal de différenciation. Dans un second temps, à l'aide de souris receveuses déficientes pour IFN- γ ou IL-12 ou suite à une immunisation avec des DCs déficientes pour IL-12, les auteurs ont clairement démontré que l'IL-12 agit directement sur les LTe pour les diriger vers le choix SLEC (431). Tandis que l'IFN- γ influence la production de l'IL-12 en agissant directement sur les cellules de l'hôte, ce qui suggère que l'IFN- γ agit de manière indirectement sur le choix SLEC des LTe (431). Ainsi, les auteurs définissent une voie linéaire de production des cytokines qui favorisent la formation des SLECs versus les MPECs : IFN- γ favorise la production d'IL-12 qui va influencer le choix de différenciation des LTe CD8⁺ vers le stade terminal de différenciation (363) (431).

LA PHASE DE LA MEMOIRE

IMMUNOLOGIQUE

I. Caractéristiques et propriétés des LTm

La génération d'une immunité à long terme et de vaccins efficaces contre des agents viraux ou bactériens sont dépendants de la formation d'un grand nombre de LTm CD8⁺ (26). Les LTm ont des caractéristiques qui leur permettent de répondre plus rapidement et plus efficacement lors d'une seconde infection (26). De plus, en comparaison aux LTn, les LTm spécifiques pour un antigène donné sont plus nombreux et ont une grande capacité à migrer aux organes non lymphoïdes (site où les infections ont généralement lieu) (432). Les LTm ont la compétence de pouvoir répondre plus rapidement et plus efficacement à une seconde infection, car ces cellules sont dans un stade de « préactivation » (26). Effectivement, les LTm expriment un niveau basal de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{kip} et un haut niveau du complexe cycline D3-CDK6 (433, 434) qui est impliqué dans l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. Les LTm maintiennent une expression élevée d'ARNm codant pour des cytokines antivirales, des chemokines et pour des protéines cytotoxiques (336, 375, 432, 434, 435). De cette façon, les LTm peuvent proliférer et développer des fonctions effectrices plus rapidement que les LTn. Le nombre de LTm à la fin de la phase de contraction peut perpétuer dans l'organisme en absence de l'antigène au moins 2 ans chez la souris et 50 chez l'homme (436, 437), ceci grâce à un processus d'auto renouvellement maintenant l'homéostasie des LTm via l'intervention de cytokines (438).

II. Les populations de LTm

A. Les LTcm et LTem

Les LTm forment à une population hétérogène qui se distingue par leurs propriétés de « *homing* », leur localisation anatomique et leur fonction (439). Basé sur l'expression de leur marqueur de migration (CD62L et CCR7) les LTm humains et murins sont classifiés comme LTm centraux (LTcm : CD62L^{high}, CCR7⁺) et LTm

effecteurs (LTem : CD62L^{low}, CCR7). La molécule d'adhésion CD62L interagit avec PNA_d (*Peripheral-Node Adressin*) situé au niveau des veinules endothéliales des ganglions lymphatiques permettant l'attachement et le « *rolling* » des leucocytes (440, 441). Tandis que CCR7 reconnaît les chémokines CCL19 et CCL21 présents à la surface luminale des cellules endothéliales dans les ganglions permettant l'arrêt des LT et l'initiation de leur extravasation (442). Ainsi, les LT CD62L^{high}CCR7⁺ et CD62L^{low}CCR7⁻ ont des propriétés de recirculation distinctes *in vivo*. Plusieurs études ont montré que les LTcm circulent entre les organes lymphoïdes alors que les LTem résident dans les tissus périphériques (439, 443, 444). Cependant, les deux sous unités de LTm sont présents dans la rate et dans le sang (352, 439). À part leur localisation anatomique, les LTcm et LTem se différencient par leur fonction (352, 439, 443). Une stimulation *in vitro* des LTcm CD4⁺ humains résulte à une production d'IL-2 et un peu d'IFN- γ , d'IL-4 ou d'IL-15 (439). Par opposition, les LTem produisent rapidement ces cytokines effectrices, mais moins d'IL-2. De plus, il est montré que seuls les LTem CD8⁺ sont riches en perforine intracellulaire (439). Le modèle proposé est que la localisation des LTem leur permet de mener rapidement des fonctions effectrices pour éliminer une quelconque invasion d'un pathogène (439). Les LTcm eux sont capables de répondre à un antigène présenté par des DCs entraînant une génération d'une seconde vague de LTe.

Par contre, le développement des LTem et LTcm est encore un mystère (différenciation linéaire et/ou divergente?). L'équipe de Manjunath et coll. utilise une souris transgénique exprimant une GFP (*Green Fluorescent Protein*) dans tous les LTn pour expliquer la différenciation des LT. La fluorescence de la GFP est perdue suite à la différenciation des LTn en CTL (205). L'auteur stimule les LTn avec leur antigène spécifique et en présence de différentes cytokines. Lorsque les LT CD8⁺ sont co-incubées avec une haute dose d'IL-2, les LT CD8⁺ deviennent des blastes exprimant des marqueurs d'activation et ayant perdu l'expression de la GFP et du récepteur chémokine CCR7 mais acquièrent la capacité à produire de l'IFN- γ et à développer une activité cytolytique. À la différence, les LT CD8⁺ en présence d'IL-15 ou d'une faible dose d'IL-2 expriment toujours la GFP, le récepteur CCR7 et par contre ne possèdent aucune propriété de fonctions effectrices cytolytiques. Après 10 semaines de transfert adoptif les LT CD8⁺ générés en présence d'IL-2 vont s'accumuler dans les tissus périphériques et

seront exclus des ganglions, identiques au comportement des LTem; tandis que les LT CD8⁺ obtenues en présence d'IL-15 se comportent comme des LTcm en migrant vers les organes lymphoïdes secondaires et sont capables de répondre très rapidement à une ré-infection (205). Ces données montrent que la quantité et la qualité des cytokines déterminent la différenciation des LT CD8⁺ par alternance des fonctions effectrices et migratoires. Cette étude donc supporte à la fois le modèle de différenciation divergente et progressive, puisque le LTn peut devenir soit un LTcm ou un LTem et cette différenciation est dépendante de la cytokine environnementale rencontrée par le LTn au cours de son activation.

À la différence, l'étude de Wherry et coll. défend le modèle de différenciation linéaire. Dans cette étude, les auteurs ont transféré séparément des LTcm et LTem dans des souris naïves et ont observé leur capacité à répondre à une seconde infection, à faire la prolifération homéostatique et à changer de phénotype (352). Finalement, les auteurs démontrent que les LTcm sont plus efficaces que les LTem dans la prolifération homéostatique et aussi dans la réponse à une seconde infection, quelque soit la voie d'infection (intranasale, intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée), le type d'infection (LCMV ou virus de la vaccine) et le site d'infection (poumon, ovaire ou dans le sang) (352). De plus, cette étude montre que les LTem se convertissent en LTcm au cours du temps ceci par observation de la ré-expression de CD62L à leur surface (352). Cependant, ce modèle de conversion de LTem en LTcm n'est pas reproductible dans des conditions de transfert adoptif de 500 LTn transgéniques (445). En effet, il est montré que la quantité de précurseur ou de cellules transférées a une influence sur la différenciation cellulaire (446, 447). Ainsi, les études transférant un faible nombre de précurseurs n'évaluent aucune conversion des LTem en LTcm (445, 447-449). De plus, cette conversion n'est pas observable dans les tissus non lymphoïdes (447). En plus, les données de Lefrançois et coll. réfutent l'idée d'une conversion des LTem en LTcm, il suggère plutôt un maintien de phénotype corrélé à une augmentation de la population LTcm due à ses propriétés de prolifération homéostatique et peut être à sa meilleure capacité de survie (447). D'autres études contredisant le modèle de différenciation linéaire en soulignant qu'une immunisation avec des DCs favorise le développement de LTe ayant un profil LTcm et non LTem (342, 361).

B. Les LTm épuisés

Durant une infection chronique, les LT CD8⁺ spécifiques de l'antigène perdent graduellement leurs activités effectrices les rendant moins fonctionnelles permettant la progression de l'infection. La perte des fonctions est hiérarchisée (352, 450), ceci commence par une incapacité à proliférer et à produire de l'IL-2, puis du TNF et finalement de l'IFN- γ . L'épuisement des LT CD8⁺ est expérimentalement étudié à l'aide d'infection avec une souche chronique de LCMV (la souche 13), et chez l'homme l'étude de ces cellules se fait lors d'infections chroniques avec le virus du SIDA (*syndrome d'immunodéficience acquise*), de l'hépatite B et de l'hépatite C (451). L'absence de cet épuisement permettrait de rendre plus efficaces les thérapies par la vaccination (452) et un contrôle prolongé par l'organisme des infections chroniques comme le SIDA (453, 454). Plusieurs études ont montré que les LT épuisés expriment un haut niveau du récepteur inhibiteur PD-1 (455-457), et qu'une inhibition de la voie de signalisation de PD-1 permet une restauration des propriétés perdues chez les LT CD8⁺ épuisés (455-459). Par ailleurs, l'équipe de Wherry et coll. a montré la présence d'une multitude de récepteurs inhibiteurs à la surface des LT CD8⁺ épuisés suite à une infection à la souche 13 de LCMV. Ces inhibiteurs sont aussi impliqués dans l'épuisement des LT CD8⁺ virus spécifique. En effet, les auteurs ont montré que l'inhibition des voies des récepteurs inhibiteurs PD-1 et LAG-3 entraîne la réactivation des LT épuisés et le contrôle des particules virales d'une manière plus efficace que la réhabilitation obtenue avec un blocage uniquement de la voie PD-1 (458, 459).

III. Rôle de l'aide CD4 dans le maintien des LTm CD8⁺

A. Qu'est-ce que l'aide CD4⁺?

Une brève interaction avec l'antigène permet au LT CD8⁺ d'acquérir des propriétés leur permettant de se différencier en LTm (208, 213, 460, 461). Cependant *in vivo*, la génération et le maintien des LTm CD8⁺ sont dépendants d'autres signaux. Il a été observé que l'aide des LT CD4⁺ au moment de la reconnaissance de l'antigène est importante pour la fonctionnalité des LTm CD8⁺. En effet, l'infection de souris CMH II déficientes (CMH II^{-/-}) entraîne une réponse primaire équivalente à celle d'une souris normale, mais le nombre de LTm CD8⁺ formé décline au cours du temps (462). De plus, une restimulation des LTm CD8⁺ obtenus dans une souris CMH II^{-/-} sont incapables de

développer une réponse secondaire (462). Il a été montré qu'en absence des LT CD4⁺, les LT CD8⁺ expriment un haut niveau de récepteur d'apoptose TRAIL qui lors de la seconde infection entraîne une mort massive des LTm CD8⁺. Inversement, des LT CD8⁺ déficients pour TRAIL peuvent développer une réponse secondaire même si les LTm CD8⁺ sont générés en absence de l'aide des LT CD4⁺ (242, 463). Cependant, ces travaux ont été contredits par l'équipe de Bevan. En effet, cette étude montre que chez une souris TRAIL^{-/-} CMH II^{-/-} les LTm CD8⁺ ont un défaut dans leur survie à long terme et dans la réponse à une seconde infection (464). Ceci démontre que TRAIL n'est pas impliqué dans la mort apoptotique massive observée dans les travaux décrits plus haut.

L'intervention de l'aide CD4⁺ est nécessaire dans les stades tardifs de la réponse immunitaire. Effectivement, les LTe CD8⁺ générés dans des conditions d'aide CD4⁺ ou sans aide CD4⁺ sont incapables de survivre suite à un transfert dans une souris CMH II^{-/-} ; par contre, des LTe CD8⁺ obtenus sans aide CD4⁺ ont la capacité de survivre suite à leur transfert dans une souris normale (465). Ces données suggèrent que l'aide CD4⁺ intervient tardivement dans la réponse primaire et est nécessaire pour le maintien des LTm CD8⁺. De plus, l'absence de l'aide CD4⁺ est associée à une diminution de l'expression de l'IL-7R qui est nécessaire pour la formation de la mémoire immunologique lors d'une infection inflammatoire (465, 466). Les travaux d'Intlekofer et coll. en 2007, démontrent que les LTe CD8⁺ générés en absence de l'aide des LT CD4⁺ expriment relativement un haut niveau de T-bet (367), facteur de transcription associé aux SLEC (349, 367, 467). En effet, l'auteur montre que la délétion de T-bet dans les LTe CD8⁺ obtenus en absence d'aide des LT CD4⁺ retrouve leur capacité à former des LTm CD8⁺ fonctionnels (367).

B. Les mécanismes de l'aide CD4⁺

1. La voie CD40/CD40L

L'implication de voie CD40/CD40L dans la réponse des LT CD8⁺ a été montré dès 1998 par l'utilisation d'un anticorps agoniste de CD40 qui substitue l'aide CD4⁺ (468-470). Ainsi, un modèle explique l'aide CD4⁺ par l'intervention de la signalisation de CD40/CD40L qui favorise l'activation des CPAs (468-471). Effectivement, les LTn CD4⁺ exprimant CD40L peuvent interagir avec les CPAs via CD40 entraînant ainsi leur maturation qui est nécessaire à l'activation des LTn CD8⁺ (468, 470). Ce modèle a été

soutenue par des expériences utilisant des anticorps bloquants l'interaction CD40/CD40L dont la résultante est une déficience de la réponse CD8⁺, ou par l'utilisation de DCs CMH II^{-/-} associée avec un anticorps activant de CD40 et dont la résultante est un maintien des LT CD8⁺ (468-471). Cependant à l'époque, l'expression de CD40 était seulement associée aux CPAs et CD40L aux LT CD4⁺. Or en 2002, il a été montré que les LT CD4⁺ pouvaient fournir l'aide nécessaire aux LTn CD8⁺ à se différencier en LTm en présence de CPA déficientes pour CD40 (472). L'explication vient du fait que les CD8⁺ ont la capacité d'exprimer CD40 à leur surface. Ainsi dans ce modèle, l'aide CD4⁺ aux LT CD8⁺ se fait par un contact direct entre les deux cellules via CD40/CD40L et en présence de CPA présentant les complexes antigéniques. De plus, l'étude de Lee et coll. montre que la réponse primaire et secondaire des LT CD8⁺ contre le virus influenza nécessite de l'aide CD4⁺ provenant de cellules non T (473). Cependant, l'interaction directe des LT CD8⁺ avec les LT CD4⁺ pour fournir l'aide CD4⁺ a été contredit par les travaux de Bevan (474). En effet, suite à une immunisation de souris normales ou CD4^{-/-} ou CD40^{-/-}, les auteurs observent aucun défaut dans la génération de la réponse primaire et une déficience est observée pour la réponse secondaire seulement dans les souris CD4^{-/-} (474).

Des deux modèles d'aide CD4⁺ (via une maturation des DCs ou via une interaction directe entre LT CD4⁺ et CD8⁺), c'est le modèle faisant intervenir l'activation des DCs qui est le plus soutenu. Effectivement, en 2004 les travaux de Smith et coll. soulignent l'importance de la maturation des DCs par les LT CD4⁺ pour le développement d'une réponse LTm CD8⁺ (475). En effet pour se faire, les auteurs ont stimulés des LT CD8⁺ avec des DCs provenant de souris normales ou CMH II^{-/-} qui ont été préalablement infectées avec les virus de l'herpes. Suite à la stimulation, les LT CD8⁺ seront transférés dans une souris normale qui sera infectée avec le virus de l'herpes (475). Dans cette expérience les auteurs observent que seuls les DC provenant de la souris normale seront capables d'assurer une réponse à l'infection. Ceci suggère que le développement de LTm CD8⁺ efficace est réalisable si et seulement si les DCs sont activées via les LT CD4⁺ (475).

2. **IL-2**

L'équipe de Bevan a démontré en 2006 que la cytokine IL-2 est importante pour l'expansion des LTm suite à une ré-infection (476). Pour ce faire, les auteurs ont généré

une souris chimérique avec un mélange 1 :1 de LT provenant d'une souris normale et d'une souris IL-2R α déficiente (IL2-R α ^{-/-}) (476). Suite à une infection de cette souris chimérique, les auteurs observent que les deux types cellulaires ont la même aptitude à répondre à l'infection, mais lors d'une re-infection les cellules IL2-R α ^{-/-} sont désavantagées (476). De plus, pour que l'IL-2 puisse permettre une réponse secondaire efficace, il a été montré que cette cytokine devait être présente lors de la réponse primaire (476). Une autre étude a montré que l'effet de l'IL-2 sur la maintenance et le développement des LTm est dépendant de la chronicité de l'exposition de l'antigène (477). De plus, dans cette étude les auteurs ont démontré par déplétion des LT CD4⁺ dans une souris chimérique avec des LT normaux et des LT IL2-R α ^{-/-} que les LT CD4⁺ ne sont pas l'unique source pour la cytokine IL-2 (477).

3. La cytokine IL-12

La cytokine IL-12 est majoritairement produite par les DCs matures, et est jugée importante dans la régulation de la réponse LT CD8⁺ (423), mais son intervention au niveau de l'aide CD4 est encore en débat. En effet, il a été montré que l'utilisation de DC dérivées de souris déficientes pour l'IL-12 et présentant le peptide ovalbumine n'entraînent aucun défaut ni dans l'établissement de la réponse effectrice des LT CD8⁺ ni dans la réponse secondaire des LTm CD8⁺ suite à une seconde immunisation (478). Ceci suggère que la cytokine IL-12 n'est pas essentielle dans l'aide CD4⁺. Or une injection de la cytokine IL-12 favorise l'expression de CD40 à la surface des CPAs qui est nécessaire à l'aide CD4⁺ via la signalisation CD40/CD40L (479).

Le rôle de l'IL-12 dans l'aide des LT CD4⁺ reste encore contre versé et indirecte.

4. La signalisation CD28/B7

L'activation des CPAs via CD40/CD40L se traduit entre autres par une augmentation du niveau d'expression des molécules de costimulation à leur surface. Il a été observé qu'un blocage de CD28 avec son ligand résulte à un défaut dans l'activation des LT CD8⁺ par les DCs activées via CD40/CD40L. De plus, l'utilisation d'un anticorps agoniste anti-CD28 peut mimer l'aide des LT CD4⁺ nécessaire au maintien des LTm CD8⁺ (480). Un résultat similaire est obtenu par l'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction de CD80/CD86 avec la molécule costimulatrice négative CTLA-4

(480). Ces données montrent que l'augmentation des ligands CD80/CD86 favorise l'aide CD4⁺ nécessaire au maintien des LTm CD8⁺.

5. CD70/CD27

CD70 est une molécule costimulatrice présente à la surface des CPA. Le blocage de son interaction avec son ligand CD27 empêche la stimulation des DCs via le signal CD40/CD40L (481). De plus, il a été montré qu'une interaction constitutive de CD27/CD70 entraîne une augmentation quantitative et qualitative de la réponse CTL *in vivo* suite à une infection influenza (1). L'activation de CD27 est associée à celle de CD28, ainsi ces deux molécules agiraient en coopération pour promouvoir l'aide des LT CD4 via CD40/CD40L (482). Le défaut dans ces études c'est que seule la réponse primaire a été étudiée, il aurait été intéressant de voir les effets sur la réponse secondaire suite à un blocage de l'interaction de CD70 avec son ligand durant la phase primaire de la réponse.

6. 4-1BB/4-1BBL

L'utilisation d'un anticorps agoniste pour 4-1BB permet le développement d'une réponse CD8⁺ en absence d'aide CD4⁺ (483). Dans la même étude, les auteurs montrent que l'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction de 4-1BBL présent à la surface des CPA avec 4-1BB conduit à un résultat inverse même en présence de l'aide des LT CD4⁺ (483). Par ailleurs, l'inhibition de la voie de signalisation de CD28 empêche l'effet positif observé lors de l'utilisation d'un anticorps agoniste pour 4-1BB sur la réponse LT CD8⁺ (483). Ceci signifie que l'intervention de la voie 4-1BB/4-1BBL se fait après celle de CD28/B7.

7. La cytokine IL-15

La cytokine IL-15 est impliquée dans l'auto-renouvellement des LTm CD8⁺ et dans leur protection contre l'apoptose via le récepteur TRAIL lors de la réponse à une seconde infection. De plus, cette cytokine est nécessaire pour assurer efficacement l'aide fourni par les LT CD4⁺. En effet, des DCs provenant d'une souris IL-15 déficiente sont incapables de fournir une aide CD4⁺ fonctionnelle même en présence de LT CD4⁺ (484). De plus, à l'aide de souris déplétées de leurs cellules CD4⁺ et immunisées avec le virus VV recombinant en présence ou non de la cytokine IL-15, il a été montré que l'IL-

15 permettent aux LTe CD8⁺ de résister à l'apoptose via TRAIL (484). Ceci suggère que l'IL-15 peut mimer l'aide CD4⁺.

Ce chapitre met en évidence les mécanismes essentiels pour l'obtention de LTm fonctionnels suite à une infection ou une immunisation. Or, l'une des caractéristiques principales des LTm, c'est de survivre à long terme dans l'organisme. Ainsi, les LTm répondent à des mécanismes d'homéostasie très spécifiques qui leur permet de survivre au sein de la population des LT. Dans le chapitre suivant de cette thèse, l'homéostasie des LTm et LTn est élaboré.

HOMEOSTASIE DES LYMPHOCYTES T NAIFS

ET MEMOIRES

I. La survie des lymphocytes naïfs

La survie des LTn est gouvernée par des mécanismes d'homéostasie dont le principe est de maintenir l'équilibre d'un système. Plusieurs travaux ont été menés permettant de découvrir que les signaux homéostatiques des LT sont la conséquence de l'interaction du RCT avec le complexe CMH/peptide du soi et de l'intervention des membres de la famille des cytokines ayant la chaîne γ (γ commun) tels que l'IL-7 et IL-15.

A. Le rôle du RCT

Dans plusieurs études, il a largement été démontré que la survie des LTn dans un organisme nécessite un contact avec le complexe CMH/peptide du soi, sinon leur durée de vie est réduite (485, 486). De tous les travaux publiés, trois approches expérimentales ont montré de manière élégante et convaincante l'importance de cette interaction. Les premières sont par l'utilisation de modèles d'animaux dans lesquels l'expression du RCT ou le signal proximal du RCT peut être manipulé, dans ces études les auteurs ont montré que la perte du signal RCT affecte la survie des LTn (487-489). La seconde est basée sur le concept de compétition entre des LTn appartenant à un répertoire polyclonal avec des LT transgéniques spécifiques d'un antigène, dans ces études il a été mis en évidence l'importance de la reconnaissance de l'antigène pour la survie des LTn (490, 491). Et la troisième étude joue sur la fréquence de LTn transgénique transféré dans une souris syngénique. En effet, il a été observé qu'un nombre élevé de LTn résulte à une réduction de leur survie et inversement avec un faible nombre de LTn transférés (492). Cette expérience met en évidence le concept de compétition entre le nombre de précurseurs et de complexe CMH/peptide du soi. Une étude a révélé que la fréquence de précurseur dans un répertoire polyclonal de LTn spécifique pour un antigène spécifique est de 20 à 200 cellules/souris pour les LT CD4⁺ (492, 493) et 80 à 1200 cellules/souris pour les LT CD8⁺ (494). Ceci suggère que le nombre de complexes CMH/peptide du soi

est un paramètre limitant pour la survie des LTn, d'où la diminution de leur durée de vie lorsqu'ils sont présents en nombre élevé (492).

L'interaction du RCT avec le complexe CMH/peptide du soi n'est pas le seul paramètre important dans la survie des LTn. En effet grâce aux études dans des souris lymphopéniques, il est observé une implication des cytokines dans le maintien des LTn. Par exemple, la cytokine IL-7 est associée à la capacité des LT CD4⁺ à faire une prolifération homéostatique (435). Ce qui suggère qu'IL-7 et le RCT sont nécessaires pour la survie des LTn.

La signalisation du RCT dans la survie des LTn est très peu connue, des analyses de *microarray* révèlent un profil génique similaire aux LTn répondant à un antigène étranger, mais dont le degré d'induction est plus faible et très peu de gènes associés aux fonctions effectrices sont activés (435). Ces données signifient que la survie des LTn est conduite par la voie de signalisation typique du RCT et du récepteur à IL-7, sauf que ces voies sont activées très faiblement et sont certainement stimulées en continu.

B. Les cytokines de type I

Les cytokines sont des protéines ou des glycoprotéines qui influencent de façon paracrine ou autocrine l'intensité et la durée d'une réponse inflammatoire et immune. Les cytokines sont responsables de la communication intercellulaire au sein du système immunitaire. Ainsi, les cytokines sont responsables de la survie des LTn en combinaison avec l'interaction du complexe CMH/peptide du soi.

Les cytokines de type I appartiennent à la famille de récepteurs de cytokines ayant une chaîne commune : la chaîne γ . Cette famille est composée des membres suivant: IL-2, IL-7, IL-15, et IL-21, IL-4 et IL-9 tel que représenté dans la **Figure 19**. Celles contribuant à l'homéostasie des LTn sont l'IL-7 et l'IL-15.

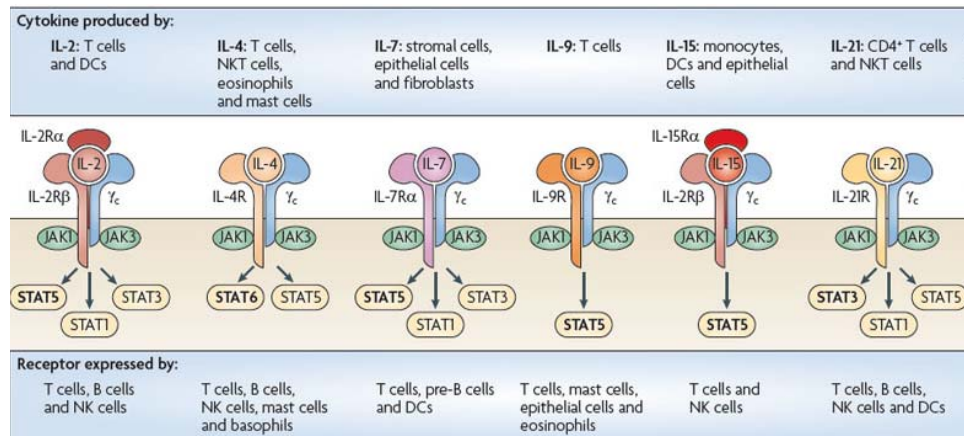


Figure 19: Récepteur des cytokines de la famille de γ_c .

En haut, description des cellules produisant les cytokines. Au milieu, représentation des récepteurs de cytokine avec leurs cytokines et les protéines kinases recrutées au niveau du domaine intracellulaire du récepteur lors de l'interaction du récepteur avec sa cytokine spécifique. En bas, énumération des cellules exprimant les récepteurs de cytokine. Adapté de l'article (495)

1. Voie de signalisation des cytokines impliquées dans l'homéostasie des LTn

Les récepteurs d'IL-7 et IL-15 utilisent ont la même voie de signalisation, sauf au niveau de leur régulation négative par les molécules SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) qui n'agit qu'au niveau de la voie de l'IL-15R (495). Leur voie de signalisation débute par le recrutement des protéines kinases JAK 1 et 2 (*janus kinase*) à leur domaine cytoplasmique. Cette interaction va permettre la formation et l'activation du dimère STAT5 a/b (*signal transducer and activation of transcription*) qui va migrer dans le noyau (496). La combinaison du signal RCT avec la présence du dimère STAT5a/b dans le noyau va favoriser la synthèse de plusieurs protéines incluant les molécules anti-apoptotique Bcl-2 (*B cell lymphoma-2*) et MCL-1 (*myeloid cell leukemia sequence-1*) qui protègent la cellule de l'apoptose (497). En effet, ces molécules anti-apoptotiques vont inhiber les molécules pro-apoptotiques telles que Bim et Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) qui sont impliquées dans l'activation des molécules apoptotiques : Bax (*Bcl-2 associated X protein*) et Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) (498, 499). Ainsi, un défaut dans cette voie de signalisation entraîne une mort par apoptose due à l'activation des molécules apoptotique Bax et Bak (**Figure 20**).

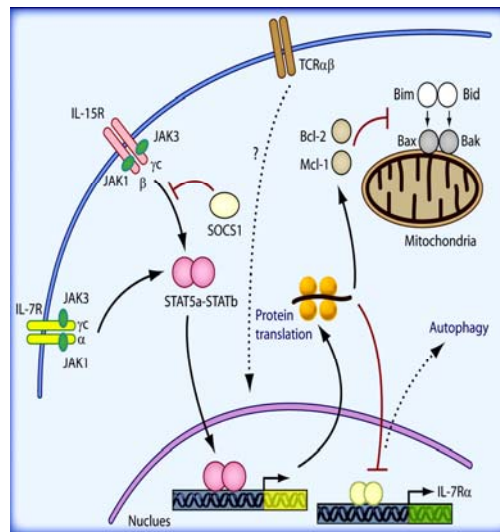


Figure 20: Schématisation de la signalisation du l'IL-7R et IL-15R.

Suite à l'interaction de la cytokine IL-7 et IL-15 à leur récepteur spécifique (IL-7R et IL-5R), les protéines kinases JAK1 et JAK3 sont recrutées au niveau de domaine cytoplasmique des récepteurs. Cette interaction permet la formation du dimère des facteurs de transcription STAT 5a/b qui vont pouvoir exercer les fonctions au niveau du noyau. La molécule SOCS1 est un régulateur négatif de la voie de signalisation de l'IL-15R. Adapté de l'article (500).

2. Les cytokines IL-7 et IL-15

Comme précédemment décrit les cytokines IL-7 et IL-15 sont montrées comme étant importantes dans la survie des LTn.

a- La cytokine IL-7

Par des études utilisant des techniques d'anticorps bloquant contre IL-7 dans une souris (501, 502), ou de transfert adoptif de cellules dans un hôte déficient pour IL-7 (503, 504), il a été montré que le nombre de LTn diminue. Tandis qu'une surexpression de l'IL-7 entraîne leur augmentation (505, 506). La régulation du signal de cette cytokine se fait par une diminution de l'expression de son récepteur (IL-7R) dès son interaction avec IL-7 et inversement, une augmentation de l'expression de IL-7R est observée en absence de l'IL-7 (507). La production de l'IL-7 se fait au niveau des cellules stromales et épithéliales de la moelle osseuse et du thymus (508, 509), et au niveau des cellules réticulaires fibroblastiques (FRC : *fibroblastic reticular cell*) de la zone T dans les organes lymphoïdes secondaires (510). Ainsi lorsque les LTn circulent entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires, les LTn sont en contact avec l'IL-7 seulement lors de leur passage dans les organes lymphoïdes secondaires. En effet, l'entrée des LTn dans les organes lymphoïdes secondaires dépend du niveau d'expression de molécules de « homing » CD62L et CCR7. Le blocage de CD62L ou

une délétion génétique de CCR7 mène à une diminution du nombre total des LTn CD8⁺ et CD4⁺ (510). Le niveau d'expression de CD62L et CCR7 est dépendent de la transcription du facteur de transcription KLF2 (*kruppel-like transcription factor 2*) et FoxO1 aussi bien pour les LTn CD4⁺ que LTn CD8⁺ (511, 512). Une déficience de l'un de ces deux facteurs de transcription résulte à un défaut d'entrée des LTn dans les organes lymphoïdes secondaires et donc à une diminution de leur espérance de vie. De plus, le facteur de transcription FoxO1 régule l'expression la chaîne α (ou nommée CD127) du récepteur à IL-7. La diminution de l'expression de la chaîne CD127 contribue à la pénurie des LTn observée chez la souris déficiente pour le facteur de transcription FoxO1 (511). Ces données montrent que les organes lymphoïdes secondaires sont des sources importantes d'IL-7 qui elle-même est essentielle pour la survie des LTn. Par contre, la cytokine IL-7 n'est pas exclusive aux LTn, il a été montré qu'IL-7 est aussi important pour l'homéostasie des LTm comme décrit plus loin dans ce chapitre.

b- La cytokine IL-15

La cytokine IL-15 joue un rôle important dans l'homéostasie des LTn CD8⁺. En effet, les souris déficientes pour IL-15 (IL-15^{-/-}) possèdent 50% de moins de LTn CD8⁺ comparés à une souris normale (513, 514). Ces données sont soutenues par les résultats obtenus avec des souris déficientes pour l'inhibiteur de la voie de signalisation de l'IL-15R SOCS-1 qui montre une hypersensibilité à la cytokine IL-15, soit une augmentation du nombre de LTn CD8⁺ est observée (515, 516). SOCS-1 appartient à la famille CIS-SOCS qui régule négativement les voies de signalisation de récepteurs aux cytokines, par neutralisation de l'activité de JAKs (**Figure 20**). L'expression de SOCS-1 est régulée par les cytokines IL-2, IL-4, IL-7 et IL-15 (517). Ainsi, la survie des LTn CD8⁺ face à IL-15 est négativement contrôlée par SOCS-1 dans des conditions normales.

3. Les autres molécules intervenantes dans l'homéostasie des LTn.

Il est aussi montré que la protéine coronin-1 est impliquée dans la migration et dans l'activation des cellules T et la survie des LTn (65, 518-520). Coronin-1 est une protéine accessoire associée à l'actine qui régule négativement la formation des filaments d'actine (521). Les souris déficientes pour coronin-1 montrent une mort spontanée des LTn alors que la production thymique n'est pas affectée. Ainsi, l'absence

de coronin-1 résulte à une incapacité des LTn à faire une prolifération homéostatique suite à un transfert adoptif dans un hôte lymphopénique. Ce défaut de prolifération homéostatique n'est pas associé à un problème de la signalisation de l'IL-7R, mais est attribué à une perturbation de la polarisation du cytosquelette d'actine et donc à un défaut de migration de LTn dans les organes lymphoïdes secondaires, qui sont la source principale de l'IL-7 (518).

D'autres études ont montré l'implication d'une sous-unité du signalosome COP9 (*constitutively photomorphogenic 9*) dans l'homéostasie des LT. Ce signalosome est composé de 8 sous unités (CSN1 à CSN 8), dans cette étude c'est la sous unité CSN8 qui est déficiente. Cette déficience est associée à mort spontanée des cellules T matures (522). COP9 est un complexe régulant négativement le système impliqué dans la dégradation des molécules de signalisation : protéasome 26S/ubiquitine, (523-525). Les mécanismes de cette mort cellulaire ne sont pas encore connus, mais peuvent être associés à la diminution du niveau d'expression du récepteur à l'IL-7 (522). De plus, dans les cellules CSN8 déficientes une dérégulation de la cycline D2 est observée entraînant un blocage de LTn en phase G0 du cycle cellulaire qui les empêche de rentrer dans le cycle cellulaire (522).

Le facteur de transcription KLF2 est décrit depuis plusieurs années comme un régulateur central dans le maintien de la quiescence et de la survie des LT matures. En effet, les souris déficientes pour KLF2 ($KLF2^{-/-}$) ont un développement thymique normal, mais manifestent une perturbation au niveau de la survie des LTn dans les organes lymphoïdes secondaires (526). La déficience $KLF2^{-/-}$ est associée à un défaut d'expression des molécules de « homing » telles que S1P1 (*sphingosine 1-phosphate receptor-1*) et CD62L qui sont respectivement impliquées dans la sortie des thymocytes matures du thymus et dans l'entrée des LT dans les organes lymphoïdes secondaires (512). De plus, il a récemment été montré que les cellules $KLF2^{-/-}$ augmentent l'expression des récepteurs de chémokines qui mènent les LTn à se disperser dans les tissus non lymphoïdes et donc à ne pas recevoir les signaux nécessaires de survie présents dans les organes lymphoïdes secondaires (527).

C. La prolifération homéostatique des LTn

La prolifération homéostatique des LTn est présente dans des situations de lymphopénie, suite à une irradiation, un traitement chimiothérapeutique, des infections et des maladies auto-immunes comme *e.g.* l'arthrite rhumatoïde. Ce mécanisme est gouverné par le complexe CMH/peptide du soi et l'IL-7. Dans des situations de lymphopénie, les LTn CD8⁺ prolifèrent plus rapidement que les LTn CD4⁺, et les deux types cellulaires acquièrent un profil mémoire. C'est à cause du phénotype mémoire exprimé par les LTn (nommé aussi LTn « *memory-like* ») que le terme le plus convenable pour la prolifération homéostatique dans cette situation est LIP (*lymphopenia-induced proliferation*) (528).

1. La « lymphopenia-induced proliferation »

La LIP est déclenchée suite à l'interaction du RCT avec le complexe CMH/peptide du soi, et par la cytokine de la famille γ (IL-7). Cependant, deux autres proliférations homéostatiques ont été identifiées, l'une dirigée par uniquement des cytokines on parle de la CIP (*cytokine-induced proliferation*) et l'autre qui gouvernée par les bactéries commensaux c'est la cLIP (*chronic LIP*) (**Figure 21**). Chacune des proliférations homéostatiques est décrite ci-dessous.

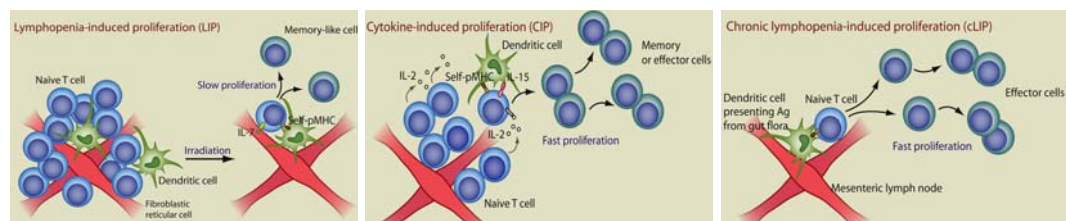


Figure 21: Représentation des différents modèles de la prolifération homéostatique des LTn. De gauche à droite, représentation de la lymphopenia-induced proliferation, cytokine-induced proliferation et chronic lymphopenia-induced proliferation. Adapté l'article (500).

a- Le rôle du signal RCT

Plusieurs études ont démontré que l'affinité du RCT a une influence sur la qualité de la LIP. En effet, les LTn exprimant un RCT ayant une haute affinité (provenant par exemple du modèle de souris OT-1) pour le ligand CMH/peptide du soi prolifèrent plus rapidement que les LTn exprimant un RCT de faible affinité (provenant du modèle de souris P14, 2C) (491). Et dans une situation où le RCT a une très faible affinité (comme avec les LTn provenant du modèle de souris HY), les LTn sont incapables de faire la LIP

(491, 529). Ceci met en évidence l'importance de la force du signal RCT pour le déclenchement de la prolifération homéostatique dans des conditions lymphopéniques. L'importance de trois régulateurs négatifs des LT pouvant affecter le taux de LIP ont récemment été mis en évidence. Le premier est LAG-3 (*lymphocyte activation gene-3*), qui est un régulateur négatif des LT activés. Dans les travaux de Workman et coll. ont montré que les LTn LAG-3 déficients (LAG-3^{-/-}) effectuent une prolifération homéostatique supérieure aux LTn normaux (530). Les auteurs montrent que cette augmentation de prolifération vient d'un défaut des LT régulateurs (Treg) qui n'ont plus la capacité de contrôler la prolifération homéostatique. En effet, des LTn CD4⁺LAG-3^{+/+} ou LTn CD4⁺LAG-3^{-/-} cotransférés avec des Treg LAG-3^{-/-} montrent une augmentation de leur capacité à effectuer une prolifération homéostatique, ceci étant due à une absence du contrôle de la prolifération par les Treg. Tandis que des LTn CD4⁺LAG-3^{+/+} ou LTn CD4⁺LAG-3^{-/-} cotransférés avec des Treg LAG-3^{+/+} montrent une diminution de la prolifération. Ce résultat s'explique par un contrôle effectué par les Treg. Ces données suggèrent que le régulateur LAG-3 contrôle négativement la prolifération homéostatique via les Treg (530).

Le régulateur négatif BTLA-4 (*B and T lymphocyte attenuator -4*) et son ligand HVEM (*herpesvirus entry mediator*) contrôlent la prolifération homéostatique (531). En effet, la génération d'une souris chimères avec des LT normaux et déficients pour BTLA-4 (BTLA-4^{-/-}) montre une augmentation de la prolifération par les LT BTLA-4^{-/-}. De plus dans les souris BTLA-4^{-/-} ou déficientes pour HVEM il a été observé une augmentation du nombre de LT au phénotype "memory-like" (531). Toutes ces données suggèrent que BTLA-4 contrôle aussi la prolifération homéostatique.

Le dernier régulateur négatif est SIT (*Src homology domain containing tyrosine 2-interacting transmembrane adaptor protein*). La souris déficiente pour SIT montre un défaut au niveau de la prolifération homéostatique surtout des LTn CD8⁺. Ce défaut est associé à une hyper phosphorylation de Zap-70 (532). En effet, SIT est impliqué dans le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 (*SH2 containing protein tyrosine phosphatase 1/2*) (533), donc son absence entraîne une suractivation de la cellule donc une augmentation de la prolifération homéostatique. De plus, il a été montré que des LT transgéniques déficients pour SIT, BTLA-4 ou LAG-3 augmentent leur capacité de LIP

quelque soit l'affinité du RCT (530-532). Ainsi, ces régulateurs influencent négativement la stimulation du RCT affectant la LIP.

A la différence d'une prolifération en réponse à un antigène, la prolifération homéostatique des LTn ne nécessite pas l'intervention des molécules de costimulation comme *e.g.* CD28 pour se déclencher. A l'exemption de la molécule de costimulation CD24 dont son absence est associée à une incapacité des LTn à faire la LIP (534). Cependant, le transfert de LTn normaux dans une souris irradiée et déficiente pour CD24 entraîne de manière inattendue une prolifération massive (535). Ainsi, le rôle de CD24 n'est pas totalement défini puisque son absence sur les LT crée une incapacité de prolifération homéostatique alors que son absence sur les DCs engendre une augmentation de la LIP.

b- La cytokine IL-7

La cytokine IL-7 est impliquée dans la LIP, puisqu'une augmentation de la concentration de l'IL-7 est observée lors d'une déplétion de cellules T (536). Ceci suggère que la LIP est gouvernée selon la disponibilité de l'IL-7 qui amplifie le faible signal déclenché en réponse à la reconnaissance du RCT avec le complexe CMH/peptide du soi (537) (**Figure 20**). La LIP nécessite un signal intact du récepteur à l'IL-7 et est surtout dépendante du signal de la chaîne CD127 du récepteur. Effectivement une mutation au niveau de la chaîne α entraîne une incapacité des cellules à faire la LIP même si le niveau d'expression du récepteur IL-7 est normal (538). De plus, il a été montré que l'IL-7 permet l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire par inhibition de l'inhibiteur de CDK (*cyclin dependant kinase*) $p27^{kip1}$ (539). Effectivement, il a été démontré que les LT déficients pour $p27^{kip1}$ sont capables de mener une LIP dans une souris irradiée IL-7 déficiente (540).

2. Les autres mécanismes de prolifération homéostatiques

a- La « cytokine-induced proliferation »

La prolifération homéostatique peut être dirigée par des cytokines, on parle ainsi de CIP (*cytokine-induced proliferation*). Les principales cytokines impliquées sont IL-2 et IL-15 (**Figure 21**). L'implication de ces cytokines a été mise en évidence par l'utilisation de modèles d'animaux déficients pour la chaîne α du récepteur à l'IL-2 et la chaîne commune du récepteur à l'IL-2 et IL-15 (chaîne β nommé aussi CD122) (541,

542). Effectivement, ces souris déficientes développent une lymphadenopathie qui est reliée à une prolifération homéostatique sans être dans des conditions de lymphopénie, ce symptôme est associé à une forte production d'IL-2 par des LT activés. De plus, les souris déficientes pour la chaîne CD122 expriment un haut niveau de la cytokine IL-15 qui est associée à une prolifération massive (542).

b- La chronic-LIP

La prolifération homéostatique peut-être due à la réponse à des antigènes commensaux. Ceci a été mis en évidence par le transfert d'une population polyclonale de LT dans des souris RAG (*recombination activating gene*) déficientes ou SCID (*severe combined Immunodeficiency*) (543, 544). Effectivement, il a été observé dans ces expériences une prolifération homéostatique rapide d'une faible fraction des LT transférés et ceci de manière indépendante de l'IL-7. L'expansion de ces cellules est associée à une augmentation de l'expression de marqueurs d'activation et à l'acquisition de fonctions effectrices (543-545). Ceci sous-entend que ces cellules ont répondu à un antigène étranger présent dans l'organisme. En effet, lorsque ces expériences sont effectuées avec des souris receveuses SCID ou RAG exemptées de germes, la population de LT qui prolifère rapidement n'est plus présente (543). Ainsi, cette prolifération homéostatique réfère au cLIP (*chronic LIP*) directement associé à la présence d'un antigène étranger présent dans l'intestin par exemple (**Figure 21**).

II. Homéostasie des LTm

Le principe de l'homéostasie est de maintenir un système dans un équilibre. Ce mécanisme est donc essentiel pour les LTm qui ont pour rôle de protéger l'organisme à long terme (26). Ainsi, les LTm doivent avoir la capacité de se maintenir au cours du temps. Pour se faire, les LTm ont une capacité d'autorenouvellement qui assure leur homéostasie dans l'organisme. Cependant, les LTm CD4⁺ et CD8⁺ sont divisés en deux sous-groupes : les LTm spécifique d'un antigène étranger et les LTm naturels répondant aux bactéries commensales. Les mécanismes utilisés pour assurer le phénomène homéostatique de ces deux types de LTm sont différents.

A. Homéostasie des LTm CD8⁺.

1. Les LTm CD8⁺ spécifiques d'un antigène

Les LTm CD8⁺ spécifiques d'un antigène peuvent survivre dans l'organisme de manière indépendante au CMH I et à l'antigène (437, 546, 547). Par contre, les cytokines interviennent dans l'homéostasie des LTm CD8⁺. En effet, une injection avec du poly I:C ou du lipopolysaccharide chez la souris entraîne une augmentation du taux d'auto-renouvellement des LTm CD8⁺ (548, 549). Ces adjuvants permettent la sécrétion de l'IFN de type I (IFN-I). Or, l'IFN-I est connu pour inhiber la prolifération, mais ayant le pouvoir d'induire la synthèse de l'IL-15 qui mène à l'autorenouvellement des LTm (412, 513, 550, 551). Le rôle de l'IL-15 dans l'homéostasie des LTm CD8⁺ explique le niveau d'expression élevée de la chaîne CD122 à leur surface (552). En effet, 70% des LTm CD8⁺ sont CD122^{high} alors que 30% sont CD122^{low} (412, 514). L'action de l'IL-15 sur l'homéostasie des LTm CD8⁺ n'est visible que pour la population CD122^{high} qui représente la population LTm CD8⁺ antigènes spécifiques. En effet, le transfert adoptif des LTm CD8⁺ CD122^{high} ou CD122^{low} dans une souris déficiente pour IL-15 résulte à une disparition de la population CD122^{high} et un maintien de la population CD122^{low} (412, 514). La disparition de la population CD122^{high} est associée à un défaut de prolifération (412). De plus, une surexpression de l'IL-15 génère une augmentation du nombre de LT CD122^{high} (553). Des études montrent que le niveau de basal de l'IL-15 est dépendant de l'IFN-I (554). Cette idée est supportée par les travaux utilisant des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN-I. Dans ces souris, le nombre de LTm CD8⁺ est inférieur à la moitié de ceux trouvés dans une souris normale (554). De plus, une déplétion totale des LTm CD8⁺ CD122^{high} est observée dans les souris déficientes pour STAT1, facteur de transcription dépendant de l'IFN-I et IFN- γ (554). La production de l'IFN-I est régulée par la présence de médiateurs tels que les bactéries présentes dans l'estomac ou dans la nourriture. Cependant, des études utilisant des animaux exemptés de germes et alimentés avec de la nourriture spéciale, développent le même nombre de LTm CD8⁺ CD122^{high} qu'une souris normale (555). Donc, la sécrétion de l'IL-15 est un phénomène endogène et les LTm CD8⁺ CD122^{high} représentent bien la population de LTm CD8⁺ antigène spécifique.

Lorsque la cytokine IL-2 est injectée à la fin du pic de la réponse primaire, cette cytokine prévient les LTE de l'apoptose (418), mais ceci ne lui associe aucun rôle dans

l'homéostasie de LTm. Au contraire, l'IL-2 joue un rôle suppressif dans l'homéostasie des LTm CD8⁺. En effet, l'injection d'un anticorps monoclonal neutralisant l'IL-2 augmente le niveau basal de la prolifération homéostatique des LTm CD8⁺ (556). Effectivement, il a été suggéré que la neutralisation de l'IL-2 par l'anticorps conduit à la suppression des Treg qui sont capables d'inhiber l'activité de l'IL-15 (557).

La cytokine IL-7 appartient aussi la famille des cytokines ayant la chaîne γ c, et est aussi impliquée dans l'homéostasie des LTm CD8⁺ antigènes spécifiques. En effet, une augmentation du nombre de LTm CD8⁺ CD122^{high} est observée chez une souris surexprimant l'IL-7 et déficiente pour IL-15 (506). Similaire à ces résultats, il a été montré que les LTm CD8⁺ CD122^{high} transférés dans une souris syngénique irradiée puissent assurer une prolifération homéostatique même si l'hôte est déficient pour la cytokine IL-7 ou IL-15. Cependant, il a été observé une incapacité de la prolifération quand la souris hôte est déficiente pour les deux cytokines (411, 558). Il a été montré qu'une immunisation avec des antigènes associés à des adjuvants génère des LTm CD8⁺ dépendant de l'IL-15, alors qu'une immunisation avec des agents infectieux favorise la formation de LTm CD8⁺ qui peuvent survivre en absence de l'IL-15 due à la présence de l'IL-7 (410, 551).

Ainsi tel que décrit ci-dessus, les LTm CD8⁺ spécifiques d'un antigène sont dépendant de l'IL-7 pour leur survie et dépendant d'IL-15 pour leur prolifération homéostatique. En effet, au cours d'expériences dans lesquelles des souris déficientes pour IL-15 ont été immunisées, il a été observé dans ces souris un défaut de prolifération homéostatique des LTm générés accompagnée d'une disparition graduelle des LTm CD8⁺ spécifiques à l'antigène (551). L'importance de l'IL-7 dans la survie des LTm CD8⁺ antigènes spécifiques a été montré en utilisant des souris dont l'expression de l'IL-7R est abolie ou des souris dont le domaine intracellulaire du récepteur à l'IL-7R est muté de manière à bloquer la transmission du signal, soit l'activation de STAT5 et la production de Bcl-2 (538, 559, 560). Les LTn CD8⁺ déficients pour IL-7R sont capables de former des LTm CD8⁺ antigènes spécifiques qui ont la capacité de s'autorenouveler en réponse à l'IL-15, mais qui disparaissent graduellement. La surexpression de Bcl-2 peut compenser l'absence d'IL-7R. Ceci indique que la survie de LTm CD8⁺ est dépendante de la signalisation d'IL-7 qui permet l'expression de Bcl-2 via STAT5 (538, 560).

Par ailleurs, de récents travaux montrent que la cytokine IL-15, qui est impliquée dans le maintien des LTm CD8⁺ spécifiques de l'antigène, peut induire l'expression de 4-1BB préférentiellement sur les LTm ayant un phénotype CD8⁺CD44^{hi} et que le ligand 4-1BBL joue un rôle important dans la survie de ces cellules (561). En effet, ces études montrent que le transfert de LTm CD8⁺CD44^{hi} déficients pour 4-1BBL dans une souris non immunisée, résulte à une diminution du nombre de ces cellules au cours du temps dans la rate et dans la moelle osseuse (niche préférentielle des cellules mémoires) (561). Ces données suggèrent que lorsque les LT CD8⁺ mémoires se trouvent dans un environnement riche en IL-15, comme la moelle osseuse, l'expression de la molécule 4-1BB leur permettent de survivre au cours du temps suite à l'interaction avec 4-1BBL.

2. Les LTm CD8⁺ naturels

Les LTm CD8⁺ CD122^{low} se distinguent des LTm CD8⁺ CD122^{high}, car les CD122^{low} n'ont pas besoin de l'IL-15 pour leur autorenouvellement (412, 514). Ces cellules ont un phénotype activé (CD69^{high}, CD62L^{low}, IL-7R^{low}) (554) et sont dépendantes de la présence du CMH I (450). En effet le transfert des LTm CD8⁺ CD122^{low} dans une souris γ c déficiente ne manifeste aucun problème de homéostasie alors que dans une souris déficiente pour le CMH I, ces cellules sont incapables de proliférer (450). Ainsi, ces cellules sont dépendantes du signal RCT pour leur maintien.

B. Homéostasie des LTm CD4⁺

De même que les LTm CD8⁺, l'homéostasie des LTm CD4⁺ est différente entre les LTm naturels et les LTm obtenus suite à une immunisation ou une infection (les LTm CD4⁺ antigène spécifique).

1. Les LTm CD4⁺ spécifiques d'un antigène

A l'aide d'études utilisant des souris déficientes pour le CMH II ou des souris ayant une ablation de l'expression du RCT, il a été montré que les LTm CD4⁺ antigènes spécifiques ne nécessitent pas une interaction avec le CMH II/RCT pour leur survie et leur prolifération homéostatique (488, 562). Par ailleurs, il a été montré que les LTm CD4⁺ déclinent au cours du temps par rapport aux LTm CD8⁺ qui se maintiennent (563). Une récente étude montre que la longévité des LTm CD4⁺ est dépendante de la force du signal RCT suite à la reconnaissance de l'antigène (333). Ainsi, une forte activation des

LTn CD4⁺ (avidité du RCT optimal) mène à la formation d'une population de LTm CD4⁺ plus stable (333). De plus, les auteurs montrent que ces cellules ont une expression élevée du récepteur à l'IL-7 et un niveau faible pour le récepteur à l'IL-15 (CD122): LTm CD4⁺ CD127^{high} CD122^{low} (333). Ce résultat confirme l'importance de la cytokine IL-7 dans le maintien des LTm CD4⁺ antigène spécifique. En effet, dans des conditions lymphopéniques, les LTm CD4⁺ antigènes spécifiques nécessitent la présence d'IL-7 pour faire une prolifération homéostatique (564). De plus, une souris IL-15 déficiente injectée avec un anticorps bloquant pour IL-7R est incapable d'assurer une prolifération homéostatique basale pour les LTm CD4⁺ antigènes spécifiques (565). Ainsi, les cytokines IL-7 et IL-15 sont essentielles pour l'homéostasie et la survie sur une période prolongée des LTm CD4⁺. En effet, des études montrent que la déplétion des cellules utilisant IL-15 pour leur survie (les LT CD8⁺ et NK) entraîne une augmentation de la prolifération homéostatique des LTm CD4⁺ (564). La compétition pour IL-15 entre les LTm CD8⁺ CD122^{high}, les NK et les LTm CD4⁺CD122^{low} pourraient expliquer la diminution graduelle des LTm CD4⁺ antigène spécifique au cours du temps, puisque le récepteur est moins fortement exprimé à leur surface (563).

2. Les LTm CD4⁺ naturels

A l'aide de techniques de transfert adoptif de LTm CD4⁺ dans des souris déficientes pour CMH II ou/et IL-7 ou des souris déficientes pour IL-15 et/ou IL-7, il a été montré que les LTm CD4⁺ naturels sont hétérogènes (558, 564, 566, 567). En effet, un groupe de LTm CD4⁺ est dépendant de l'expression du CMH II pour sa survie et se caractérise par sa capacité à faire une prolifération homéostatique rapide dans une souris lymphopénique (558, 564, 566, 567). Le second groupe des LTm CD4⁺ est indépendant de l'expression du CMH de classe II et se distingue du premier groupe par sa propriété à faire une prolifération homéostatique plus lente (558, 564, 566, 567). Par contre, cette dernière est dépendante de la présence de l'IL-7 et de l'IL-15 pour favoriser la prolifération homéostatique (502, 565, 568). De même que les LTm CD4⁺ spécifiques d'un antigène, les LTm CD4⁺ naturels disparaissent graduellement au cours du temps, ce qui peut se justifier par la compétition de l'IL-15 entre les LTm CD8⁺ et les NK (563, 564).

III. La niche des LTm

La moelle osseuse sert de réservoir aux LTm (569). Effectivement, la moelle osseuse possède un nombre élevé de LT présentant un phénotype mémoire, puisque la majorité de ces LT chez la souris expriment fortement le marqueur CD44 (570, 571) et chez l'homme expriment faiblement le marqueur CD45RA (572). Le nombre de LTm CD8⁺ dans la moelle osseuse est largement supérieur à la somme de ceux trouvés dans la rate, les ganglions, le foie et le poumon (573). De plus, les LTm CD8⁺ se trouvant dans la moelle osseuse ont une capacité identique aux LTm de la rate à assurer une protection à long terme. En effet, il a été démontré que le transfert adoptif de LTm CD8⁺ spécifiques pour le virus LCMV provenant de la moelle osseuse ont la capacité d'assurer une protection anti-virale dans une souris receveuse équivalente au LTm se trouvant dans la rate (574).

La moelle osseuse est le site préférentiel de la prolifération homéostatique des LTm (573, 575). En effet, il a été montré par un transfert adoptif de LTm CD8⁺ marqués aux CFSE et à l'aide d'un traitement de BrDU que les LTm CD8⁺ sont capables d'effectuer de la prolifération homéostatique aussi bien dans les sites lymphoïdes que non-lymphoïdes (575). Cependant, c'est dans la moelle osseuse que la prolifération homéostatique est la plus importante (575). Par ailleurs, les cellules stromales et hématopoïétiques de la moelle osseuse produisent à la fois les cytokines IL-7 et IL-15 qui sont respectivement impliquées dans la survie et la prolifération homéostatique. En effet, les études de Parretta et coll démontrent que les LTm CD8⁺ expriment faiblement la chaîne CD127 du récepteur à l'IL-7, et ils suggèrent que ceci peut être une conséquence de la présence en continu des cytokines IL-7 et IL-15 (573). De plus il est montré que 25% des LT dans la moelle osseuse engagent un contact prolongé avec les DCs sans entraîner leur activation (576), ceci permet la transprésentation de l'IL-15 qui est nécessaire à la prolifération homéostatique des LTm CD8⁺ (577).

La niche de la moelle osseuse permet aussi de définir des limites dans la prolifération des LTm due à une restriction des ressources et de l'espace (578). En effet, il a été montré que l'entrée des LT CD44^{high} dans la moelle osseuse est limitée par la présence d'un large nombre des LT CD44^{high} « rivaux » présents en périphérie suggérant un processus de compétition pour rentrer dans la moelle osseuse (579). En effet, il a été montré par des infections en série avec différents virus que le pourcentage d'une

population de LTm CD8⁺ spécifique d'un antigène peut diminuer par la présence d'une nouvelle population de LTm CD8⁺ spécifique d'un autre antigène immunodominant (580). Ainsi, la compétition pour entrer dans la moelle osseuse permettrait de maintenir un répertoire polyclonal de LTm CD8⁺.

La présence des LTm dans la moelle osseuse est assurée par l'expression des molécules appartenant à la famille TNF/TNFR. En effet, le transfert adoptif des LTm dans un hôte non immunisé et déficient pour la molécule 4-1BBL montre une diminution significative des LTm CD8⁺CD44^{high} dans la moelle osseuse mais pas dans la rate (561). De plus, il a été montré que l'expression de 4-1BB sur les LTm CD8⁺ est assurée par la présence de la cytokine IL-15 (561) alors que la cytokine IL-7 favorise l'expression de OX-40 sur les LTm CD4⁺ (581). Ainsi la molécule 4-1BB participe au maintien des LTm CD8⁺ dans la moelle osseuse.

Le réservoir des LTm CD4⁺ est différent des LTm CD8⁺. En effet, les LTE et LTm CD4⁺ se situent dans les organes non-lymphoïdes. De plus, par l'utilisation de LT CD4⁺ déficient ou non pour la molécule OX-40, il a été montré que cette molécule est importante pour leur survie et leur maintien (144, 149). A l'aide d'un transfert adoptif de LTm CD4⁺, il a été montré que ces cellules interagissent avec des cellules « accessoires » CD4⁺CD3⁻CD11c⁺ via OX40 (582). En effet, cette interaction n'est pas visible lors d'un transfert avec des LTm CD4⁺ déficient pour OX40 (582). Ces cellules accessoires expriment de manière constitutive CD30 et OX40L (582). Par ailleurs, il a été montré que l'absence de l'expression de CD30 et OX-40 sur les LTm CD4⁺ entraînent un défaut dans leur survie à long terme après immunisation et une incapacité d'assurer l'aide aux LB (581). Du fait que l'IL-7 favorise l'expression de OX-40 (581), il est suggéré que le maintien des LTm CD4⁺ est assuré par la présence de la cytokine IL-7 et par l'interaction avec ces cellules accessoires.

LES PROBLEMATIQUES

Durant mon doctorat, j'ai eu l'opportunité de pouvoir répondre à trois questions fondamentales qui se traduisent par la réalisation de trois articles scientifiques.

Q1 : Combien de molécules de RCT sont nécessaires pour déclencher une réponse CD8+?

Tel que montré dans cette introduction, l'activation optimale des LT est dépendante de trois paramètres : la concentration et l'affinité de l'antigène (55, 396, 397), la présence ou non des molécules de co-stimulation (98, 398, 399) et la durée de l'interaction entre les LT et les CPA (98, 398-401). Or, toutes les études effectuées sur l'importance de cette interaction entre la cellule T et la CPA ont été réalisées avec l'utilisation de peptides altérés ou antagonistes ou par l'emploi de souris mutantes pour la voie de signalisation du RCT ou pour des molécules de costimulation. Dans notre étude, nous avons voulu étudier *l'influence de la quantité de RCT exprimé par les LTn et donc, l'influence de la force du signal transmis par le RCT sur le développement de la réponse des LT in vivo*. Pour ce faire, nous avons utilisé la souris transgénique unique chez laquelle on peut-être modulé l'expression du RCT OT-1 (487). Dans ce modèle, l'expression du RCT OT-1 spécifique pour le peptide ovalbumine dans le contexte CMH de classe I K^b, peut être moduler de façon dose dépendant par la tétracycline (TET) (487). En effet, cette souris est composée de trois transgènes (Tg) permettant la régulation de l'expression du RCT. Le premier transgène permet l'expression du transactivateur TetR-VP16 (Tta) spécifiquement dans les LT à l'aide du promoteur proximal Lck. Le transactivateur Tta est une protéine de fusion entre le transactivateur de transcription d'origine virale (VP16) et le répresseur de l'opéron tétracycline de la bactérie *E.coli* (TetR) (583). Le second Tg code pour la chaîne α du RCT OT-1 dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur minimal fusionné à 7 séquences TetO (487). L'expression du transactivateur Tta permet la transcription de la chaîne α du RCT OT-1 suite à sa liaison sur la séquence TetO en absence de Tet. Cependant en présence de la TET, la fixation de Tta sur le motif TetO est inhibée ce qui empêche l'expression de la chaîne α du RCT OT-1. Le troisième Tg est exprimé de manière

constitutive à l'aide du promoteur RCT β et code pour la chaîne β du RCT OT-1. Ainsi comme préalablement montré par les travaux de Labrecque et coll. la quantité de RCT à la surface des LT est dose dépendante de la quantité de TET administrée aux souris (487). A l'aide d'un transfert adoptif et de l'immunisation des souris receveuses, il nous a donc été possible d'évaluer *in vivo* l'influence de l'expression du RCT sur le nombre et la fonctionnalité des LTe CD8⁺ antigènes spécifiques générés ainsi que le nombre et le phénotype de LTm CD8⁺. Les résultats sont présentés sous forme d'un bref papier scientifique, qui va être publié dans la revue *Immunology and cell biology* en tant que *short communication*.

Q2 : Comment les LTe sont-ils sélectionnés pour survivre et se différencier en LTm?

En effet, jusqu'à présent peu de choses sont connues sur les signaux impliqués dans le développement des LTm. Cependant comme préalablement décrit, certains marqueurs ont été identifiés comme étant impliqués dans la génération des LTm tels que la cytokine IL-7 (351, 504), la sérine protéase Spi2A (372), le facteur de transcription Bcl-6 (355, 386, 387) et le ratio des facteurs de transcription T-bet/Eomes (349, 356, 368). D'autre part, des études mettent en valeur l'influence de l'affinité et l'avidité du RCT ainsi que la signalisation du RCT sur la génération des LTm (345, 408). Cependant, aucune étude n'a été faite sur l'implication de la force du signal dans le développement des LTm. Ainsi dans le laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que *la force et la qualité du signal RCT peuvent influencer la formation des LTm*. A l'image des études effectuées sur l'implication du signal RCT dans le devenir des LT, nous nous sommes particulièrement intéressés à la variation de l'avidité du RCT pour son signal sur la réponse LT. Pour cela, nous avons varié la densité de l'épitope présenté par les DCs lors d'une immunisation afin d'étudier la réponse des LT, ainsi que le profil phénotypique, fonctionnel et génétique des LTe au pic de la réponse. Les résultats sont présentés sous forme d'article intitulé « *Epitope density controls CD8⁺ memory T cell differentiation* » qui a été soumis dans le *PlosOne*.

Q3 : Comment les LTm survivent-ils dans l'organisme?

Dans l'organisme, les LTn et les LTm sont importants pour la protection de l'organisme contre l'invasion de pathogènes, il est donc nécessaire de maintenir de

manière constante l'homéostasie de ces cellules. Tel que décrit précédemment, les LTn et les LTm partagent les mêmes cytokines pour survivre et pour assurer leur autorenouvellement. De plus, il a été montré que la survie des LTn est aussi dépendante d'une interaction entre leurs RCT et le complexe CMH/peptide du soi à l'inverse des LTm. Par ailleurs, les LTm sont maintenus dans un état de « pré-activation » de manière à répondre plus rapidement et plus efficacement à une seconde infection. Ainsi, dans le laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que *les LTm émettent un signal constitutif de leur RCT afin de pouvoir survivre à long terme dans l'organisme de manière à ne pas entrer en compétition avec les LTn pour les cytokines*. L'idée d'un signal constitutif a déjà été observée pour les LB matures. En effet, il a été montré qu'un signal basal du RCB est impliqué dans la survie homéostatique des LB périphériques et dans le développement progressif et fonctionnel du pre-RCB et ceci de manière indépendante à la présence d'antigène (584-588). Pour répondre à l'hypothèse de la présence d'un signal constitutif du RCT pour la survie des LTm, nous avons employé le même modèle de souris que celui utilisé dans l'article n°1 et un variant de ce modèle qui se caractérise par l'absence de la chaîne V β du RCT. Cette privation permet d'avoir un modèle de souris dont l'expression de la chaîne α du RCT OT-1 peut être contrôlée par le traitement à la tétracycline dans un répertoire polyclonal de LT CD4⁺ (modèle de souris LTAOC $\alpha^{-/-}$) (487). En effet, il a été montré que la chaîne V α 2 dans le thymus favorise une différenciation des thymocytes en LT CD4⁺CD8⁻. Tandis que la chaîne V α 2 associée avec la chaîne V β 5, comme dans le modèle V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$, permet le développement de thymocytes vers une différenciation de LT CD8⁺CD4⁻ (487). Par l'utilisation de ces deux modèles de souris (V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ et LTAOC $\alpha^{-/-}$), nous avons évalué si un signal constitutif du RCT existe pour la survie des LTm en abolissant l'expression du RCT à la surface des LTm suite à un traitement à la tétracycline. Ces résultats sont présentés sous forme d'un article qui a été publié en 2008 dans le journal *PNAS* (décembre 2008, volume 105, n°51) dont le titre est « *Memory T lymphocyte survival does not require T cell receptor expression* ».

LES RESULTATS DE L'ARTICLE N° 1

Lowering TCR expression on naïve CD8+ T cells does not affects memory T cell differentiation

Julie Leignadier, Julie Rooney, Jean-françois daudelin and Nathalie Labrecque

En cours de publication en tant que *short communication* dans le journal *Immunology and cell biology*

Contribution

Les figures 1a, 1b, 1c, 1d, 2b et 2c sont un regroupement des travaux de JR et moi-même. Les figures 1e, 1f et 1g ont été réalisées par moi-même. La figure 2a par JR et NL. Les figures 2d et 2e par moi-même. Les figures supplémentaires sont la participation des auteurs JL, JR et JF. Le montage et les premières versions d'écriture de ce papier ont été réalisés par moi-même. La version finale du papier a été réalisée par le Dr Nathalie Labrecque.

Lowering TCR expression on naïve CD8⁺ T cells does not affect memory T cell differentiation

Julie Leignadier^{1,2} , Julie Rooney¹, Jean-François Daudelin¹ and Nathalie Labrecque^{1,2,3}

¹Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, ²Department of Microbiology and Immunology and ³Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada

Address correspondence to: Nathalie Labrecque

Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center,

5415 boul. de l'Assomption

Montréal, Qc, Canada, H1T 2M4

Phone: 1-514-252-3552

Fax: 1-514-252-3569

Summary

The generation of long-lived memory T cells is critical for successful vaccination but the factors controlling their differentiation are still poorly defined. We tested the hypothesis that the level of TCR engagement contributed to memory CD8⁺ T cell generation. By manipulating TCR expression level on mouse naïve OVA-specific CD8⁺ T cells, we showed that expansion of Ag-specific CD8⁺ T cells is minimally affected by change in TCR expression level since naïve CD8⁺ T cells expressing as little as a 1000 TCRs (30-fold less) show only a 2.5-fold reduction in the number of effectors generated. Furthermore, TCR expression level did not influence the acquisition of effector functions or the generation of memory T cells. Our data indicate that during an *in vivo* immune response, a threshold in the number of TCR engaged by naïve T cells is required for full T cell expansion but not for their differentiation into effector and memory T cells.

Keywords: CD8⁺ T cells, effector, memory T cell; TCR; transgenic mice

Introduction

T cell recognition of foreign antigen (Ag) induces the expansion of the few T cells (1 per 10^5 - 10^6) bearing an appropriate TCR and the acquisition of effector functions. These effector T cells (Te) then eliminate the pathogen by secretion of cytokines or by direct cytotoxicity. Following this initial clonal expansion, most Te cells die and only a few differentiate into memory T cells (Tm) able to respond quickly to a second invasion by the same pathogen. The success of the primary response critically depends on the number of Te cells generated, while vaccination is dependent on the generation and long-term maintenance of functional Ag-specific Tm cells.

Several studies have previously suggested that the strength of TCR signaling or the level of TCR engagement influences T cell activation and differentiation¹⁻⁷. In these studies, either TCR-ligand affinity or level of Ag presentation was manipulated to demonstrate that the T cell response is sensitive to the dose of Ag and the affinity of the TCR for its ligand¹⁻⁷. However, most of these experiments were performed *in vitro* using T cell hybridomas, T cell clones or T cell lines. These cells have a pre-activated status and might not properly reflect the *in vivo* response of naïve T cells. Other *in vitro* studies have shown that the T cell response is sensitive to the number of TCR expressed by T cells¹ and that different levels of TCR engagement are required to induce specific T cell responses⁶⁻⁹, where the hierarchy from weak to strong TCR signal promotes killing, cytokine production and proliferation for CD8⁺ T cells⁸. More recently, the role of TCR affinity and avidity has been re-evaluated for *in vivo* CD8⁺ T cell responses¹⁰⁻¹². Labrecque *et al* were the first to readdress this issue using a transgenic mouse model in which OT-1 TCR (specific for ovalbumin, OVA) expression level could be regulated by tetracycline (TET)¹⁰. They showed that following immunization with low Ag concentration, T cell proliferation and cytokine production decrease when the TCR density is reduced¹⁰. However, in this same model, TCR density does not affect T cell proliferation and cytokine production after immunization with higher concentration of Ag¹⁰. Unexpectedly, it was noted that the threshold for responsiveness is very low and estimated to 500-1000 TCRs¹⁰. The effect of TCR density on the generation of Tm cells was not evaluated in that study. Using a vaccinia virus engineered to express different amounts of a class I epitope, Wherry *et al* have shown that CD8⁺ T cell expansion is directly proportional to the amount of Ag expressed by the virus¹¹. Moreover, in this

setting, CD8⁺ Tm cell development is proportional to the number of CD8⁺ Te cells generated¹¹. More recently, Zehn *et al* have shown with altered peptide ligands that while the strength of TCR-ligand interaction affects the level of T cell expansion, Ags with very low affinity for the TCR are nevertheless able to induce the complete differentiation of naïve CD8⁺ T cells into Te and Tm cells¹². Together, these studies indicate that the strength of TCR signaling controls the magnitude of the expansion phase¹⁰⁻¹² and that strong TCR signaling is not necessary for the generation of Tm cells^{11, 12}. However, this does not exclude that a certain threshold of TCR engagement is required for the generation of Tm cells.

Another important parameter for the sensitivity of the T cell response is the continuous engagement of the TCR with self-ligands¹³⁻¹⁹. Indeed, abolition of TCR interaction with self peptide-MHC complexes leads to a severe reduction in T cell reactivity to foreign Ag¹³. Additionally, TCR-self ligand interactions contribute to T cell responses to foreign Ag¹⁴⁻¹⁹. Thus, it is highly plausible that reducing TCR density on naïve Ag-specific CD8⁺ T cells will affect *in vivo* T cell responses and the generation of Tm cells. We decided to evaluate the role of TCR density on the generation of CD8⁺ Tm cells using a mouse model in which TCR expression can be manipulated by TET.

RESULTS AND DISCUSSION

To study the influence of TCR expression levels on *in vivo* T cell responses, we used V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ transgenic mice in which OT-1 TCR expression level on CD8⁺ T cells can be controlled by TET¹⁰. Donor V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ female mice were treated with different doses of TET (0, 5 and 400 μ g/ml) to obtain T cells expressing various levels of TCR (Figure 1a). We estimated the number of TCR molecules expressed by OVA-specific V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ T cells treated with TET by measuring their TCR V α 2 staining intensity and comparing it to that of CD8⁺ T cells from a C57BL/6 mouse, which are estimated to express 30 000 TCRs. As shown in Figure 1b, OVA-specific CD8⁺ T cells from untreated V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice express two-fold less TCR than C57BL/6 CD8⁺ T cells. After TET treatment, TCR expression was decreased from 5-fold (TET 5 μ g/ml) to 14-fold (TET 400 μ g/ml) when compared to untreated T cells from V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice (Figure 1b). We noted slight variations in TCR expression levels upon TET treatment correlating with the use of mice that are either heterozygous or homozygous for the different transgenes of the V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ model (data not shown). Our ability to regulate TCR expression levels on CD8⁺ T cells led us to evaluate the influence of TCR density during an *in vivo* T cell response in conditions where the amount of Ag presented by APCs was not changed. To do so, CD8⁺ V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ T cells (CD45.2⁺) expressing various TCR levels were transferred into congenic B6.SJL mice (CD45.1⁺) pre-treated for one week with the same dose of TET as the transferred T cells. Two days later, recipient mice were immunized with dendritic cells (DCs) pulsed with OVA as previously described²⁰. As shown in Figure 1c and d, CD8⁺ naïve T cells expressing 5-fold less TCRs generate similar numbers of Te cells at the peak of the response (d4) than cells from untreated mice. Further reducing TCR expression level to 1000 molecules led to a 2.5-fold reduction in the number of OVA-specific CD8⁺ Te cells. As expected, T cell expansion was not observed following immunization with DCs pulsed with an irrelevant peptide (Figure S1). These results suggest that a threshold of TCR engagement is required for full T cell expansion following immunization. We further evaluated if variations in TCR expression levels affect the differentiation of naïve T cells. As shown in Figure 1e, TCR density did not influence the phenotype of OVA-specific CD8⁺ Te cells. In addition, we did not observe a notable difference in the capacity of Te cells to degranulate, as measured by CD107a expression, and to produce granzyme B (Figure

1f). There was a modest increase in IFN- γ production when TCR density was low at priming (Figure 1g) while we did not see any difference in IL-2 production (Figure 1g). These results suggest that TCR density influences the magnitude of the T cell response without affecting CD8⁺ Te cell differentiation.

It has been previously shown that the total signal strength upon Ag encounter determines the capacity of primed T cells to respond to homeostatic cytokines, to survive to cytokine withdrawal and to accumulate *in vivo* in an Ag-free environment^{21, 22}. Therefore, we evaluated whether TCR density affected the expression of cytokine receptors, such as IL-2/15R β and IL-7R α , which control T cell survival and memory generation²³⁻²⁷. In our model, IL-2R β and IL-7R α expression by OVA-specific CD8⁺ Te cells were not affected by TCR density (Figure 2a). These results show that cytokine receptor expression is independent of TCR expression level and suggest that IL-2, IL-15 and IL-7 responses are not affected in T cells with low TCR density. As a consequence, the Te cells generated with different TCR densities should normally differentiate into Tm cells if cytokine signals are key regulators of Tm cell generation. As shown in Figure 2b and c, the number of Tm generated at d45 post-immunization was proportional to the number of CD8⁺ Te cells obtained at the peak of response. No Tm cells were generated following immunization with DCs loaded with an irrelevant peptide (Figure S1). Moreover, the phenotype of OVA-specific CD8⁺ Tm cells was similar irrespective of the amount of TCR expressed by naïve T cells at priming (Figure 2d) and there was no difference in the functionality of the CD8⁺ Tm cells that were generated (Figure 2e and Figure S2). These results show that TCR expression levels on naïve CD8⁺ T cells at priming affects the number of effectors generated and consequently the number of Tm cells generated.

In agreement with our results, a recent study using altered peptide ligands demonstrated that the duration and the magnitude of the expansion phase of Ag-specific CD8⁺ T cells is dependent on the affinity of the TCR for its ligand while further differentiation into Tm cells was not¹². In our study, we manipulated TCR expression level without changing the density of Ag presented by APCs and showed a selective reduction in the magnitude of CD8⁺ T cell response which resulted in the generation of fewer CD8⁺ Tm cells. Therefore, we have shown that the magnitude of the expansion phase is dependent on the number of TCRs engaged at priming and that the generation

of CD8⁺ Tm cells depends on the number of Te cells generated irrespective of TCR density. Our results might explain why patients with low TCR expression levels due to mutations in CD3 genes are not immunocompromised²⁸⁻³⁰. Furthermore, other studies have shown that altering the quality/duration of T-DC interactions, by knocking-out ICAM-1 expression³¹ or by varying epitope density (Leignadier *et al*, submitted), affects the generation of Tm cells without influencing CD8⁺ T cell expansion and acquisition of effector functions. This suggests that different parameters control CD8⁺ T cell expansion and memory generation, where TCR density or affinity is involved in the expansion while epitope density or duration of T-DC interactions controls memory generation. The reduction in T cell expansion with low TCR density could also be a direct consequence of a decrease in T cell sensitivity due to less interaction with self-ligands known to promote T cell responsiveness to foreign Ag¹⁴⁻¹⁹.

METHODS

Mice and TET treatment

Mice were bred under specific pathogen-free conditions. V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice expressing a TET-inducible TCR specific for the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide in the context of K^b (OT-1 TCR)¹⁰ were on a C α -deficient background. To modulate TCR expression, 5 or 400 μ g/ml of TET supplemented with 2% sucrose was administered in the drinking water. All experiments were approved by the Animal Care Committee.

In vivo T cell responses

V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice were treated for 10d with different doses of TET to modulate TCR expression levels. 10⁶ female OVA-specific CD8⁺ T cells (CD45.2⁺) were transferred into female B6.SJL (CD45.1⁺) recipient mice²⁰. Two days later, recipient mice were immunized i.v. with 5x 10⁵ male B6.SJL mature DCs loaded with 2 μ g/ml of OVA peptide²⁰. Recipient mice were treated for one week before and after the adoptive transfer. The presence of Te (d4) and Tm (d45) cells were evaluated in the same mouse by sequential removal of superficial lymph nodes (inguinal or brachial) followed by staining with anti-CD8 and anti-CD45.2 Abs as described previously²⁰. Effector functions were evaluated as previously described²⁰.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sylvie Lesage, Salix Boulet and Paméla Thébault for critical reading of the manuscript. This work was supported by a CIHR grant. N.L. is supported by a FRSQ Senior Scholarship and J.L. received a studentship from the Department of Microbiology and Immunology of the University of Montreal.

Reference

- 1 Blichfeldt E, Munthe LA, Rotnes JS, Bogen B. Dual T cell receptor T cells have a decreased sensitivity to physiological ligands due to reduced density of each T cell receptor. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 2876-84.
- 2 Reay PA, Matsui K, Haase K, Wulfing C, Chien YH, Davis MM. Determination of the relationship between T cell responsiveness and the number of MHC-peptide complexes using specific monoclonal antibodies. *J Immunol* 2000; **164**: 5626-34.
- 3 Holler PD, Kranz DM. Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. *Immunity* 2003; **18**: 255-64.
- 4 Schodin BA, Tsomides TJ, Kranz DM. Correlation between the number of T cell receptors required for T cell activation and TCR-ligand affinity. *Immunity* 1996; **5**: 137-46.
- 5 Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 1998; **8**: 89-95.
- 6 Itoh Y, Germain RN. Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997; **186**: 757-66.
- 7 Rabinowitz JD, Beeson C, Wulfing C, *et al.* Altered T cell receptor ligands trigger a subset of early T cell signals. *Immunity* 1996; **5**: 125-35.
- 8 Valitutti S, Muller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med* 1996; **183**: 1917-21.
- 9 Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996; **273**: 104-6.
- 10 Labrecque N, Whitfield LS, Obst R, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 2001; **15**: 71-82.

- 11 Wherry EJ, McElhaugh MJ, Eisenlohr LC. Generation of CD8(+) T cell memory in response to low, high, and excessive levels of epitope. *J Immunol* 2002; **168**: 4455-61.
- 12 Zehn D, Lee SY, Bevan MJ. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 2009; **458**: 211-14.
- 13 Stefanova I, Dorfman JR, Germain RN. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 2002; **420**: 429-34.
- 14 Wulfig C, Sumen C, Sjaastad MD, Wu LC, Dustin ML, Davis MM. Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat Immunol* 2002; **3**: 42-7.
- 15 Yachi PP, Ampudia J, Gascoigne NR, Zal T. Nonstimulatory peptides contribute to antigen-induced CD8-T cell receptor interaction at the immunological synapse. *Nat Immunol* 2005; **6**: 785-92.
- 16 Krogsgaard M, Li QJ, Sumen C, Huppa JB, Huse M, Davis MM. Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature* 2005; **434**: 238-43.
- 17 Davis MM, Krogsgaard M, Huse M, Huppa J, Lillemeier BF, Li QJ. T cells as a self-referential, sensory organ. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 681-95.
- 18 Ebert PJ, Jiang S, Xie J, Li QJ, Davis MM. An endogenous positively selecting peptide enhances mature T cell responses and becomes an autoantigen in the absence of microRNA miR-181a. *Nat Immunol* 2009; **10**: 1162-9.
- 19 Lo WL, Felix NJ, Walters JJ, Rohrs H, Gross ML, Allen PM. An endogenous peptide positively selects and augments the activation and survival of peripheral CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2009; **10**: 1155-61.
- 20 Lacombe MH, Hardy MP, Rooney J, Labrecque N. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8+ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* 2005; **175**: 4400-7.
- 21 Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol*. 2003; **4**: 355-60.

- 22 Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 982-7.
- 23 Becker TC, Wherry EJ, Boone D, *et al.* Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 2002; **195**: 1541-8.
- 24 Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, *et al.* Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 2002; **195**: 1515-22.
- 25 Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 1191-8.
- 26 Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 2000; **1**: 426-32.
- 27 Schluns KS, Williams K, Ma A, Zheng XX, Lefrancois L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 2002; **168**: 4827-31.
- 28 Arnaiz-Villena A, Timon M, Corell A, Perez-Aciego P, Martin-Villa JM, Regueiro JR. Brief report: primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3-gamma subunit of the T-lymphocyte receptor. *N Engl J Med* 1992; **327**: 529-33.
- 29 Allende LM, Garcia-Perez MA, Moreno A, Ruiz-Contreras J, Arnaiz-Villena A. Fourteen years' follow-up of an autoimmune patient lacking the CD3 gamma subunit of the T-lymphocyte receptor. *Blood* 2000; **96**: 4007-8.
- 30 Le Deist F, Thoenes G, Corado J, Lisowska-Groszpiette B, Fischer A. Immunodeficiency with low expression of the T cell receptor/CD3 complex. Effect on T lymphocyte activation. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 1641-7.
- 31 Scholer A, Hugues S, Boissonnas A, Fetler L, Amigorena S. Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity* 2008; **28**: 258-70.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Influence of TCR density on CD8⁺ Te cell generation. **(a)** The overlay represents TCR V α 2 chain expression by V β 5LTAOC α ^{-/-} CD8⁺ T cells after 10d of TET administration. **(b)** Quantification of the number of TCRs expressed by CD8⁺ T cells after TET treatment. The mean number of TCRs expressed at the surface of CD8⁺ T cells is indicated on the histogram. **(c)** Number of Te cells recovered from one lymph node at d4 post immunization relative to the number of TCRs expressed by Ag-specific CD8⁺ T cells. **(d)** Significant reduction in the number of Te cells generated at low TCR density. NS, not significant; *, p < 0.05. **(e)** The phenotype of Te cells is not affected by TCR density. The histograms show CD44 (top) and Ly6C (bottom) expression at d4 post-immunization by Ag-specific CD8⁺ Te cells (CD45.2⁺). **(f-g)** Acquisition of effector functions is not affected by TCR density. **(f)** The overlays show expression of CD107a (top) and granzyme B (bottom) by Ag-specific Te cells (CD8⁺CD45.2⁺) and recipient T cells (CD8⁺CD45.2⁻). **(g)** The overlays show expression of IFN- γ (top) and IL-2 (bottom) by Ag-specific Te cells (CD8⁺CD45.2⁺) and recipient T cells (CD8⁺CD45.2⁻).

Figure 2 CD8⁺ Tm cell development is not affected by TCR density **(a)** Expression of cytokine receptors on effectors at the peak of response. The overlays show IL-2R β (top) and IL-7R α (bottom) expression for recipient CD8⁺ T cells (CD45.2⁻) and for Ag-specific CD8⁺ T cells (CD45.2⁺) expressing different TCR levels. **(b)** Number of Ag-specific CD8⁺ Tm cells recovered from one lymph node relative to TCR numbers expressed by naive cells. **(c)** Significant reduction in the number of Tm cells generated when TCR density is low. NS, not significant; *, p < 0.05. **(d)** Phenotype of Ag-specific CD8⁺ Tm cells. The histograms show CD44 (top) and Ly6C (bottom) expression by Ag-specific CD8⁺ Tm cells (CD45.2⁺) at d45 post-immunization. **(e)** The functionality of CD8⁺ Tm cells is not affected by TCR density. The overlays show production of IFN- γ (top) and IL-2 (bottom) by Ag-specific Tm cells (CD8⁺CD45.2⁺) and recipient T cells (CD8⁺CD45.2⁻) after a short *in vitro* stimulation.

Figure 1

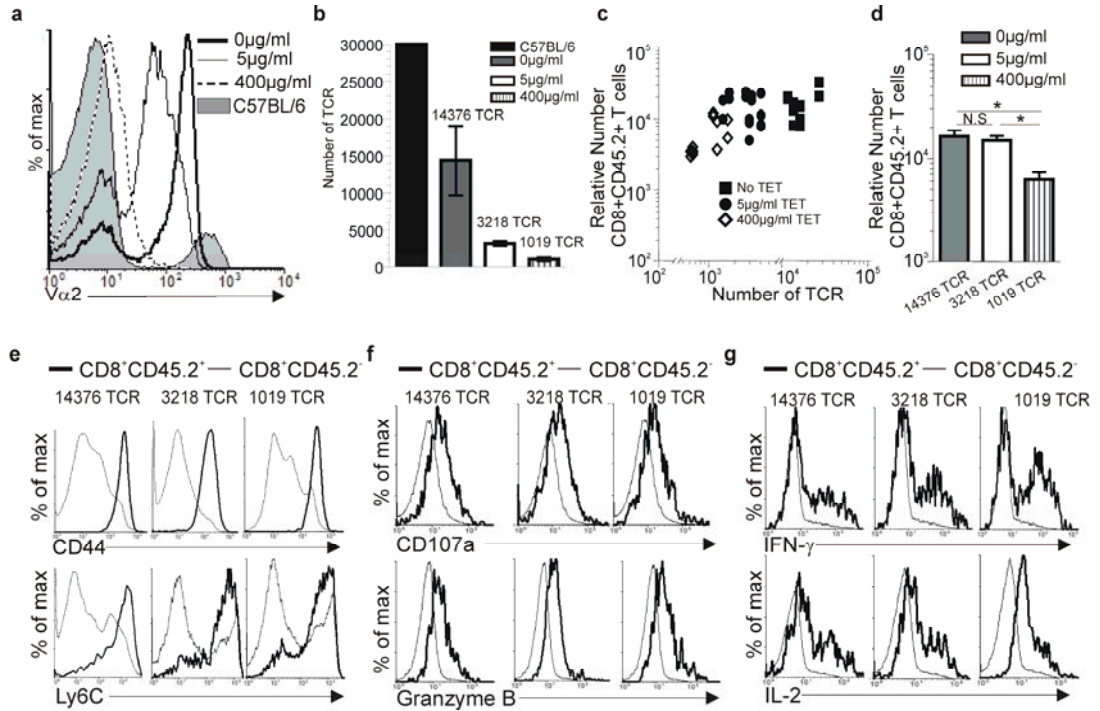
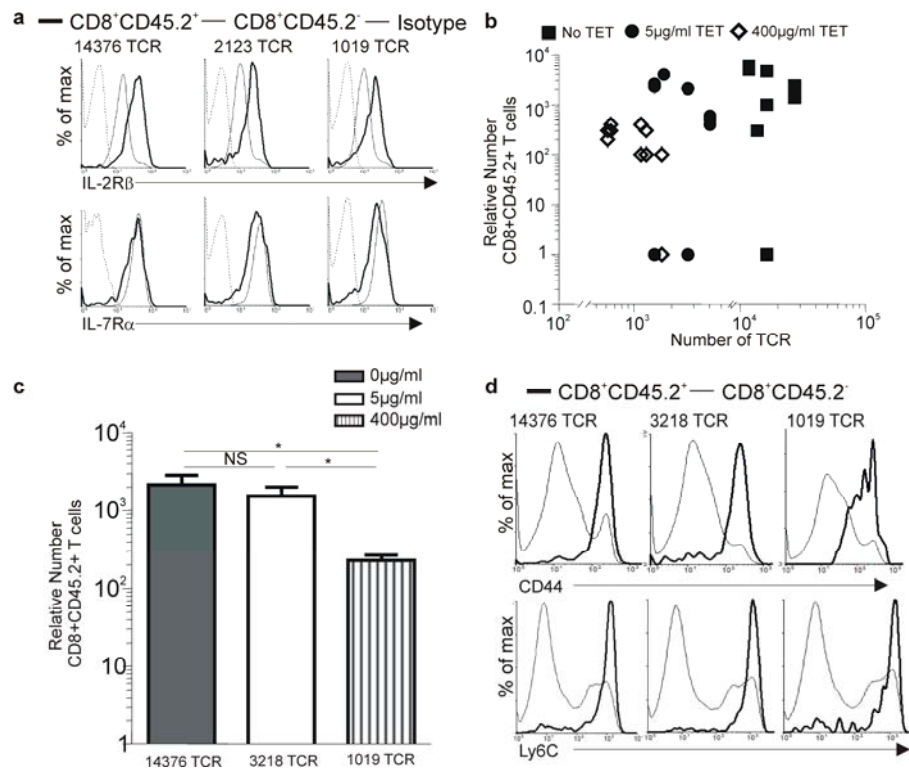


Figure 2



Figures Supplémentaires

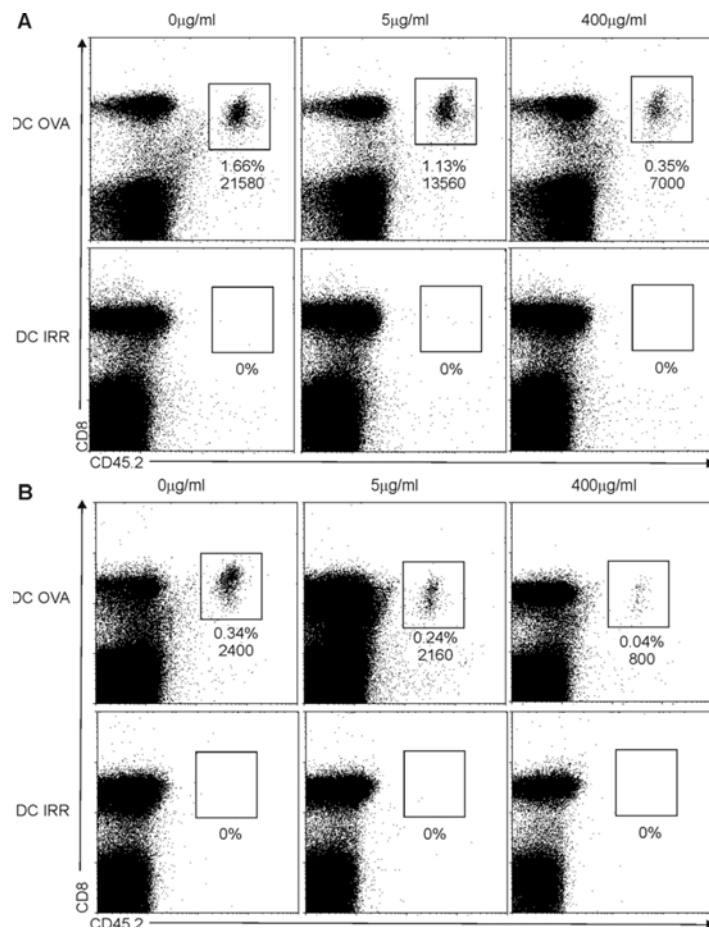


Figure S1 Generation of CD8⁺ Te and Tm cells following immunization with DCs loaded with the OVA peptide. DCs loaded with the OVA peptide (DC OVA) or with an irrelevant peptide (DC IRR) were used to immunize mice that have been adoptively transferred with Vb5LTAOCa^{-/-} T cells treated with different doses of TET (0, 5 or 400 mg/ml). The percentage and number of Ag-specific (CD8⁺CD45.2⁺) effector (**A**) and memory (**B**) T cells recovered from one lymph node are indicated in each dot plot.

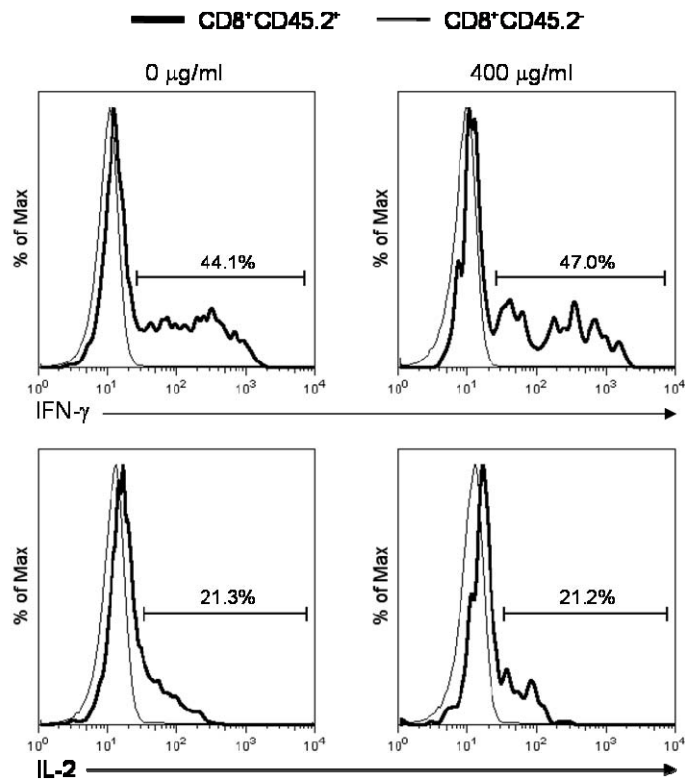


Figure S2 The functionality of CD8⁺ Tm cells is not affected by TCR density. 45 days post-immunization, splenocytes were restimulated *in vitro* for 6 hours with the OVA peptide (2 mg/ml) followed by intracellular staining. The overlays show production of IFN-g (top) and IL-2 (bottom) by Ag-specific Tm cells (CD8⁺CD45.2⁺) and recipient T cells (CD8⁺CD45.2⁻). The percentage of cytokine producing cells is indicated on the histograms.

LES RESULTATS DE L'ARTICLE N°2

Epitope density controls CD8⁺ memory T cell differentiation¹

Julie Leignadier and Nathalie Labrecque

Article en soumission dans le journal PlosOne, en attente d'une réponse

Contribution

Le modèle d'étude et toutes les expériences ont été réalisés par moi-même. De plus, j'ai étroitement participé à la rédaction du papier avec ma directrice de recherche le Dr Nathalie Labrecque.

Epitope density controls CD8⁺ memory T cell differentiation¹

Julie Leignadier^{*†} and Nathalie Labrecque^{*†‡2}

^{*}Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, [†]Department of Microbiology and Immunology and [‡]Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Running title: Ag density controls memory T cell development

Corresponding author: Nathalie Labrecque
Phone: 1-514-252-3552
Fax: 1-514-252-3569

Soumis au journal PlosOne.

Abstract

Background: The generation of long-lived memory T cells is critical for successful vaccination but the factors controlling their differentiation are still poorly defined. We tested the hypothesis that the strength of T cell receptor (TCR) signaling contributed to memory CD8⁺ T cell generation.

Methodology/Principal Findings: We manipulating the density of antigenic epitope presented by dendritic cells to mouse naïve CD8⁺ T cells, without varying TCR affinity. Our results show that a two-fold decrease in antigen dose selectively affects memory CD8⁺ T cell generation without influencing T cell expansion and acquisition of effector functions. Moreover, we show that low antigen dose alters the quality of the interaction between T cells and dendritic cells and finely tunes the expression level of the transcription factors Eomes and Bcl6. Furthermore, we demonstrate that priming with higher epitope density is necessary to downregulate the expression of Neuron-derived orphan nuclear receptor 1 (Nor-1). As a result, this prevents the conversion of Bcl-2 into a pro-apoptotic molecule and allows CD8⁺ memory precursor survival during the contraction phase.

Conclusions: Our results show that the amount of antigen encountered by naïve CD8⁺ T cells following immunization with dendritic cells does not influence the generation of functional effector CD8⁺ T cells but rather affects CD8⁺ T_m cell differentiation. Our data support a model where antigenic epitope density sensed by CD8⁺ T cells at priming controls memory generation by modulating Bcl6, Eomes and Nor-1 expression.

Introduction

During an immune response, antigen (Ag)-specific naive T cells undergo massive proliferation and differentiate into effectors that eliminate the pathogen. After Ag clearance, 90-95% of effector T cells die while a few differentiate into long-lived memory T (Tm) cells. The efficient protection provided by Tm cells is due to both the increased number of Ag-specific T cells as well as their enhanced sensitivity upon Ag re-exposure [1]. Therefore, Tm cell development is critical for the control of recurrent infections and for the success of vaccination. A better understanding of the molecular events leading to Tm cell generation is crucial to improve vaccination. However, there is limited information regarding the signals that dictate Tm cell generation and we still do not know if the strength of T cell receptor (TCR) signaling and the affinity/avidity of the TCR contribute to the development of CD8⁺ Tm cells.

While strong experimental evidences exist for a role of the strength of TCR engagement for CD4⁺ Tm cell generation [2,3,4] such evidences are scarce or against this concept in the development of CD8⁺ Tm cells [5,6]. A recent study has evaluated the role of TCR affinity for the generation of effector and memory CD8⁺ T cells [6]. Using altered peptide ligands, they have shown that Ags with very low affinity for the TCR are able to induce the complete differentiation of naïve CD8⁺ T cells into effector and memory cells. However, the strength of TCR-ligand interaction affected the level of T cell expansion [6]. To evaluate the contribution of the strength of TCR signaling in the generation of effector and memory CD8⁺ T cells, rather than modifying the nature of Ag, we decided to manipulate the level of Ag presentation by dendritic cells (DCs) to naïve CD8⁺ T cells while maintaining constant the affinity of the TCR for its ligand. Unexpectedly, we observed that lowering the avidity of the TCR-MHC-peptide interactions by decreasing Ag dose by only two-fold strongly affected the generation of CD8⁺ Tm cells without impacting effector generation. Moreover, we showed that lower density of MHC-peptide complexes at the surface of DCs alters the quality of T-DC interaction. Consequently, the induction of the molecular program required for CD8⁺ Tm cell development is altered as shown by a fine tuning in expression level of the transcription factors Eomes and Bcl6. Furthermore, our results showed that higher level of TCR engagement at priming is necessary to promote the survival of memory

precursor CD8⁺ T cells during the contraction phase of the response. Indeed, we identified Neuron-derived orphan nuclear receptor 1 (Nor-1) as a possible new pathway controlling Ag-specific CD8⁺ T cell survival during contraction. Altogether, our data supports a model where the avidity of the TCR for its ligand controls CD8⁺ Tm cell generation.

Results

Epitope density influences CD8⁺ T cell fate.

To study the role of TCR signaling strength for CD8⁺ Tm cell development, we chose to only vary the dose of Ag while keeping TCR affinity and inflammation constant. To eliminate any influence of TCR affinity, we adoptively transferred ovalbumin (OVA)-specific CD8⁺ T cells bearing a monoclonal TCR specific for the K^b-SIINFEKL complex. To maintain constant and low levels of inflammation, we immunized these mice with DCs while we manipulated Ag dose by loading the DCs with different densities of major histocompatibility (MHC)-peptide complexes. Furthermore, DC immunization favors the early generation of Ag-specific CD8⁺ T cells with a memory precursor phenotype [7,8,9]. Although these cells have a memory precursor phenotype at the peak of the response, they also acquire effector functions and go through a normal contraction phase [7,9]. This suggests that they must undergo further maturation to become long-lived CD8⁺ Tm cells and that only a fraction of the memory precursors has acquired the proper genetic program to become long-lived Tm cells. Therefore, this system allows us to evaluate if the strength of TCR signaling at priming impinges on the optimal differentiation of memory CD8⁺ precursors into long-lived Tm cells.

To generate DCs loaded with different densities of MHC-peptide complexes, bone marrow derived mature DCs were pulsed overnight (DC O/N) or 3h (DC 3h) with the SIINFEKL peptide. DC O/N express two-fold more K^b-SIINFEKL complexes than DC 3h (Figure 1A). Importantly, the two types of DCs express similar level of MHC class I and II molecules, as well as CD86 and produce similar amount of interleukin (IL)-12 (Figure S1). These DCs were used to immunize recipient mice (CD45.1⁺) which have been adoptively transferred with OT-I or Vβ5LTAOCα^{-/-} T cells (CD45.2⁺) expressing a TCR specific for K^b-SIINFEKL [10,11]. We always transfer female T cells into female mice followed by immunization with male DCs to provide the T cell help necessary to generate functional CD8⁺ Tm cells [1]. Four days after immunization, a superficial lymph node (LN) was removed by surgery to evaluate the number of Ag-specific CD8⁺ T cells generated. As shown in Figure 1B and Figure S2, the amount of peptide-MHC complexes expressed by DCs did not influence the expansion phase of OVA-specific T cells. Moreover, similar number of effectors was generated in the

spleen (Figure 1C) and tertiary sites (Figure S3A). In contrast, the level of Ag presentation to naïve CD8⁺ T cells impacted Tm cell differentiation (Figure 1B). Immunization with DC 3h generated ten times fewer CD8⁺ Tm cells in the LNs (Figure 1B and Figure S2) and four times less in tertiary sites (Figure S3B). Furthermore, OVA-specific CD8⁺ Tm cells were not generated in all mice that were immunized with DC 3h (6/16) while they were almost always generated in mice immunized with DC O/N (16/19; Figure 1D). With both Ag doses, Tm cells had a central memory phenotype (Figure S4A). In addition immunization with DCs loaded with an irrelevant peptide did not induce OVA-specific CD8⁺ T cell response (Figure S2). These results show that a stronger TCR signal is necessary for the efficient development of CD8⁺ Tm cells but not for the expansion of Ag-specific CD8⁺ T cells.

TCR engagement level does not alter CD8⁺ T cell response kinetic.

The size of the Tm cell pool generated after Ag encounter is usually directly proportional to the extent of T cell expansion [12]. Thus, it is possible that immunization with high Ag dose prolongs T cell expansion which will generate more Ag-specific T cells leading to the generation of more CD8⁺ Tm cells. However, we observed a similar kinetic of expansion where the peak of the response is at day 4 for both types of immunization (Figure 2A). Moreover, the contraction phase is initiated at the same time in the two OVA-specific populations but is more pronounced with DC 3h (Figure 2A). Very importantly, similar results were obtained with a low frequency (10⁴) of naïve T cell precursors (Figure 2B and Figure S5) indicating that the use of a high frequency of naïve precursors did not limit the expansion of T cells after immunization with DCs presenting a higher density of epitope. These results suggest that epitope density on DCs or TCR-ligand avidity does not regulate Ag specific CD8⁺ T cell proliferation after priming but influences their survival during contraction.

Phenotype and functions are not influenced by the amount of Ag encountered by naïve CD8⁺ T cells.

The inefficient CD8⁺ Tm cell development after immunization with DCs presenting low Ag density could result from an altered phenotype of Ag-specific T cells at the peak of the response. However, we did not observed any differences in the expression of cell surface, activation and migratory markers, as well as cytokine

receptors (Figure S4). Furthermore, effector functions were not affected by epitope density (Figure S6). These results suggest that the 10-fold reduction in CD8⁺ Tm cell generation with low level of Ag presentation is not due to the improper differentiation of naive CD8⁺ T cells into effectors.

Epitope density dictates the quality of T-DC interaction.

The variation in the level of Ag presented to naive T cells could influence the time of interaction between naive T cells and DCs, a key parameter for the induction of T cell response [13,14,15]. Furthermore, it was shown that a reduction in the interaction time between DCs and naïve CD8⁺ T cells due to ICAM-1 deficiency resulted in poor CD8⁺ Tm cell generation [15]. Therefore, we have measured by time-lapse microscopy the duration of contact between naïve CD8⁺ T cells and DC O/N or DC 3h. The interaction time between naïve OVA-specific CD8⁺ T cells and DCs tends to be lower with DC 3h (Figure 3A). Importantly, the percentage of naïve CD8⁺ T cells interacting for more than 640 seconds is higher with DCs loaded O/N with the antigenic peptide (Figure 3B). Long-lasting T-DC interaction leads to an intimate contact (engulfment) between T cells and DCs and is a key event controlling T cell activation [13], we evaluated the impact of the Ag dose on the frequency of T-DC interaction leading to engulfment. The frequency of T cell engulfment by DCs was proportional to the level of Ag presented by DCs to naïve CD8⁺ T cells (50% for DC O/N versus 30% for DC 3h; Figure 3C). Thus, we conclude that a higher density of Ag presented by DCs promotes a long-lasting T-DC interaction at priming which results in efficient generation of long-lived CD8⁺ Tm cells. Therefore, we propose that engulfment of T cells by DCs is essential to generate an optimal TCR signal that will promote CD8⁺ Tm cell generation.

The amount of Ag encountered by naïve T cells activates a specific genetic program controlling CD8⁺ Tm cell generation.

Our model put us in a unique position to decipher the genetic program required for CD8⁺ Tm cell development since manipulating epitope density specifically affects CD8⁺ Tm cell generation. Furthermore, our model also offers the advantage that inflammation level remains constant even when we increase Ag dose. Therefore, we evaluated the expression level of key transcription factors involved in CD8⁺ T cell response. The transcription factor T-bet is necessary for the generation of CD8⁺ Tm cells

[16] and its expression level dictate the fate of effector CD8⁺ T cells [8]. Indeed, high T-bet level is associated with the generation of short-lived effectors while low level of T-bet is present in CD8⁺ memory precursors [8]. Therefore, it was possible that a certain level of TCR engagement was necessary to up-regulate T-bet expression. However, at the peak of the response, T-bet expression was similar in OVA-specific CD8⁺ T cells generated with low and high Ag doses (Figure 4A and B).

In contrast, high level of Eomes expression correlates with CD8⁺ Tm cell development but direct evidence for a role of Eomes is still lacking [17]. At the peak of the response, we observed a two-fold increase in Eomes expression by effectors generated following immunization with DC O/N when compared to DC 3h (Figure 4B). This suggests that the strength of TCR signaling directly regulate Eomes expression.

The transcriptional repressor Bcl6 regulates B and T cell memory generation [18,19,20,21] but unlike T-bet and Eomes, Bcl6 is not necessary for effector generation [20,21]. Accordingly, we observed a 1.3-1.6-fold increase in Bcl6 expression in primed Ag-specific CD8⁺ T cells that efficiently become Tm cells when compared to those that do not (Figure 4B). This suggests that a threshold of Bcl6 expression is required for efficient generation of CD8⁺ Tm cells and that the level of TCR engagement controls Bcl6 expression level.

Therefore, we conclude that epitope density at priming influences the genetic signature of Ag-specific T cells which then impinges on their further differentiation into CD8⁺ Tm cells.

Similar expression of pro- and anti-apoptotic molecules in CD8⁺ effectors generated with low and high density of Ag.

One possible explanation for inefficient Tm cell generation after immunization with DCs presenting Ag at low density could be an increase death rate of Ag-specific effectors. Apoptosis can be induced in effector CD8⁺ T cells by different molecules such as Spi2A, Fas ligand (FasL) and Bim while survival can be promoted by the anti-apoptotic molecules Bcl-2 and Bcl-x_L. Bcl-2 expression in OVA-specific T cells was not dependent on the amount of TCR engaged with MHC-peptide complexes (Figure S7). Moreover, there was no significant difference in the relative expression of Spi2A, FasL, Bim and Bcl-X_L in OVA-specific T cells generated after immunization with DC 3h or

DC O/N (Figure S7). These results show that the severe reduction in CD8⁺ Tm cell generation in our model is not a consequence of inappropriate expression of these pro- and anti-apoptotic molecules.

Nor-1/Bcl2, a novel pathway controlling effector CD8⁺ T cell fate.

Recently, Bevan's group reported that low avidity effector CD4⁺ T cells unable to differentiate into CD4⁺ Tm cells have up-regulated Bim and Nor-1 expression [4]. Nor-1 is a member of the nuclear receptor family of intracellular transcription factor encoded by the *Nr4a3* gene [22]. In the thymus, Nor-1 is associated with apoptosis and negative selection [23]. Furthermore, Nor-1 translocates to the mitochondria after TCR-mediated stimulation in thymocytes [24] where its binding to Bcl-2 exposes the Bcl-2 BH3 domain. This converts Bcl-2 into a pro-apoptotic molecule (thereafter named Bcl-2-BH3) [24]. Then, Bcl-2-BH3 contributes to cytochrome c release leading to apoptosis. The possible role of Nor-1 in T cell apoptosis led us to evaluate its expression level in primed Ag-specific CD8⁺ T cells that are able or not to generate Tm cells. The relative expression of the *Nr4A3* gene was two-fold less in OVA-specific CD8⁺ T cells generated after immunization with DC O/N compared to DC 3h (Figure 5A). Since Nor-1 activates apoptosis via binding to Bcl-2 and exposition of the BH3 domain of Bcl-2, we evaluated if the higher level of Nor-1 expression promoted the conversion of Bcl-2 into a pro-apoptotic molecule. Using a mAb that recognizes specifically the Bcl-2-BH3 pro-apoptotic form of Bcl-2 [24], we showed that the expression of Bcl-2-BH3 was increased in effectors obtained after immunization with DCs presenting low versus high level of Ag at d4 and d7 post-immunization (Figure 5B-D).

These results show that the level of TCR engagement regulates the expression of Nor-1 which can via its association with Bcl-2 promote Ag-specific CD8⁺ T cell death. Furthermore, this is the first suggestion that Nor-1 regulates effector CD8⁺ T cell fate.

Discussion

Our results show that the amount of Ag encountered by naïve CD8⁺ T cells following DC immunization does not influence the generation of functional effector CD8⁺ T cells but rather affects CD8⁺ Tm cell differentiation. In the past, few groups have studied the impact of Ag dose on CD8⁺ Tm cell development. These studies evaluated CD8⁺ T cell response to infection and reported that variation in Ag level selectively affects the number of effectors generated without influencing memory differentiation [5,25]. The fact that we did not see any effect of Ag dose on the expansion of Ag-specific CD8⁺ T cells could be because we varied by only two-fold the amount of MHC-peptide complexes presented to naïve CD8⁺ T cells. Additionally, the level of inflammation may also account for this difference, where DC immunization induces very low level of inflammation relative to the inflammation induced upon infection. Furthermore, in our experiment, we studied the response of monoclonal, rather than polyclonal, T cells bearing the same TCR and therefore allowing us to evaluate the impact of Ag dose on CD8⁺ T cell response while maintaining TCR affinity constant. In a polyclonal repertoire, an increase in Ag concentration may induce a stronger CD8⁺ T cell response by recruiting T cells with lower affinity for Ag, thereby yielding a different interpretation of the results. In our model, epitope density selectively affected CD8⁺ Tm cell generation. Possible explanations for this difference are increased inflammation and more sustained antigenic presentation during infection. Yet, it is possible that the signals required for CD8⁺ Tm cell generation are different when the level of inflammation is high. Furthermore, this is an agreement with the study of Joshi et al. [8] who have shown that the level of inflammation dictates the fate of effectors into short-lived cells or memory precursors. Indeed, effector CD8⁺ T cells obtained with our immunization protocol have a memory precursor phenotype (CD62L^{hi}, IL-7R^{hi} and KLRG-1^{lo}) and that they have also very good effector functions such as killing and cytokine production. Moreover, even though immunization with DCs expressing low or high level of the Ag leads both to the generation of CD8⁺ T cells with a memory precursor phenotype, it is intriguing that the efficiency of CD8⁺ Tm cell generation is different between the two immunized groups. Therefore, a different threshold of TCR engagement/signaling is required for the generation of short-lived effectors and long-lived CD8⁺ Tm cells.

More recently, Zehn et al. have shown using altered peptide ligands that very low affinity ligands are able to induce the full differentiation program of naïve CD8⁺ T cells leading to the generation of effector and memory T cells [6]. However, reduction of TCR ligand affinity impacted clonal burst-size [6]. Therefore, these experiments suggest that the strength of TCR signaling only influences the expansion phase of the T cell response without affecting CD8⁺ Tm cell development. Our results contrast with these data since we showed that a two-fold reduction in the amount of Ag presented to naïve CD8⁺ T cells, which also decreased TCR signal strength and TCR avidity, had a strong impact on CD8⁺ Tm cell differentiation. We would like to propose that naïve CD8⁺ T cells respond differently to a change in avidity resulting from a modification of TCR affinity for its ligand versus a change in avidity that occurs due to a variation of epitope density. Therefore, we would like to suggest that decreasing affinity will blunt T cell expansion while reducing epitope density will decrease CD8⁺ Tm cell generation. Furthermore, it was shown by the group of Palmer that different TCR signals are required for the generation of effector versus memory CD8⁺ T cells [26] which is consistent with our results where a change in avidity, without a modification of affinity, only affected CD8⁺ Tm cell development. Thus, it is possible that a change in the avidity of the interaction will lead to a more optimal TCR signal allowing for the generation of CD8⁺ Tm cells. In support of that is our demonstration that reduction of the number of MHC-peptide complexes presented by DCs to naïve CD8⁺ T cells decreases both the duration of T-DC contact and the number of productive interactions as measured by the rate of T cell engulfment by DCs. Also, the level of the co-receptor CD8 engaged could also explain how a modification of avidity by manipulating Ag density affects memory generation while a change in avidity by varying affinity impinges on expansion. It is plausible that a change of TCR affinity will not influence the extent of CD8 engagement with MHC class I molecules while a variation of epitope density will.

The fact that our experimental system selectively affects the development of CD8⁺ Tm cells without influencing the number and function of effectors generated has allowed us to identify key molecular events required for CD8⁺ Tm cell generation. We have concentrated our effort on transcription factors known to control T cell differentiation such as T-bet, Eomes and Bcl6. Our results showed that the level of TCR engagement at priming selectively influences the expression of Eomes and Bcl6. This

suggests that proper regulation of the expression of these two transcription factors is critical to induce CD8⁺ Tm cell differentiation. Although the variation of Eomes expression is only two-fold, we believe that this is enough to impact on CD8⁺ Tm cell differentiation since it was shown that the loss of one functional allele of Eomes is sufficient to reduce the size of the CD8⁺ Tm cell pool [16]. Moreover, small variations in the expression of a transcription factor will probably have a strong impact by affecting the transcription of multiple target genes. Furthermore, our results showed that Eomes expression is not only controlled by inflammation level [17] and that the strength of TCR signaling also influences its expression. As reported by Joshi et al. the level of TCR engagement by naïve CD8⁺ T cells did not influence the expression level of T-bet [8]. Furthermore, effectors unable to further differentiate into CD8⁺ Tm cells express slightly lower level of Bcl6 than the one that will generate memory. Since Bcl6 is essential for Tm cell development [19,20], our results suggests that the strength of TCR signaling will influence Bcl6 expression and that the lack of memory generation with low dose of Ag could result from insufficient induction of Bcl6 expression. Since Bcl6 is not the mostly affected gene, our results suggest that induction of Bcl6 alone is not sufficient to promote CD8⁺ Tm cell differentiation without the cooperation of other transcription factors such as Eomes. In summary, the dose of Ag critically affects the generation of CD8⁺ Tm cells by modulating the expression of Eomes and Bcl6 at the peak of the response. Although the number of CD8⁺ Tm cells was reduced more than ten-fold, the impact on transcription factor expression was less important suggesting that small variation in their expression is dramatic for the generation of CD8⁺ Tm cells. Such strong effects have also been reported in other biological systems where mice express only one functional allele of Eomes [16] and Bcl6 [27].

One effect of the strength of TCR signaling on CD8⁺ Tm cell development is to control Nor-1 expression level to allow for a better survival of Ag-specific T cells during contraction. Reducing the density of Ag presented to naïve CD8⁺ T cells led to a higher level of Nor-1 expression. Furthermore, our results suggest that Nor-1 translocates to the mitochondria to associate with Bcl-2 and converts it to a pro-apoptotic molecule by exposing its BH3 domain in a way similar to what occurs during negative selection of thymocytes [24]. Indeed, we have observed a direct correlation with Nor-1 expression level and the percentage of effectors staining positive with the anti-Bcl-2-BH3 Ab.

These results suggest that down-regulation of Nor-1 expression in effectors or memory precursors is essential to promote survival during differentiation into CD8⁺ Tm cells. Furthermore, our results indicate that caution should be taken when interpreting Bcl-2 expression level in activated T cells since Bcl-2 can also exist in an apoptotic form when Nor-1 is present. We would also like to propose that Nor-1 will play a similar role during CD4⁺ Tm differentiation. The group of Bevan has shown that Nor-1 and Bim are highly overexpressed in effectors in which memory differentiation is blunted (4), and we would like to suggest that Nor-1 will inhibit CD4⁺ Tm cell differentiation by inducing apoptosis of Ag-specific CD4⁺ T cells. Interestingly, we did not observed any change in Bim expression in our model. Our results suggest that the strength of TCR signaling does not influence survival of CD8⁺ effectors or memory precursors by regulating Bim expression but rather by controlling Nor-1 expression level.

In summary, our data support a model where the epitope density sensed by the CD8⁺ T cell controls memory generation. Therefore, one important impact of our work relates to anti-tumor vaccination which relies on the use of DCs to immunize patients against tumor Ags. The dose of Ag presented by the DCs should be carefully analyzed to ensure proper differentiation of CD8⁺ Tm cells. Furthermore, analysis of the efficacy of the vaccination strategy should not only be performed at the effector stage of the response since the presence of effectors CD8⁺ T cells does not guarantee the proper generation of CD8⁺ Tm cells.

Materials and methods

Mice

C57BL/6, B6.SJL, OT-1 and $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$ mice were bred and maintained under specific pathogen-free condition. OT-1 were on a RAG-deficient background while $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$ were bred to $C\alpha$ -deficient mice. OT-1 and $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$ express the same TCR specific for the OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINKEKL) peptide in the context of K^b [10,11]. Mouse experiments were approved by the Animal Care Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and mice were treated according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Antibodies (Abs) and cytometry.

Anti-CD8, -KLRG1, -Ly6C, -CD122 and rat anti-mouse IgG1 Abs were purchased from BD Bioscience. Anti-perforin, -granzyme B, -CD127 Abs were from eBioscience. Anti-IL-2, -TNF α , -CD45.2, -4-1BB, -CD43, -CD5, -CD44, -CD62L and -CCR7 Abs were purchased from Biolegend Laboratories. Anti-IFN γ , -Sca-1, and -CD25 Abs were from Caltag Laboratories. Anti -Bcl-2-BH3 Ab was purchased from Abgent and anti-T-bet Ab from Santa Cruz Biotechnology. Fluorescently labeled streptavidins were purchased from BD Bioscience. Staining and analysis were done as described previously [9]. For Bcl-2 BH3 staining, cells were stained using the cytofix/cytoperm kit (BD Bioscience) [24].

Preparation of peptide-pulsed DCs

DCs were generated as described previously [9]. To induce DC maturation, 1 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich) was added on day 6. The cells were either pulsed with OVA peptide (SIINFEKL; 2 μ g/ml) at day 6 overnight or for 3h at day 7. The level of peptide-MHC complex was evaluated before immunization using the 25.D1.16 Ab specific for the K^b-OVA complex [28]. As a control, the irrelevant peptide SIYRYYGL was used.

Adoptive transfer, immunization and analysis of T cell response

10^6 (unless otherwise stated) LN CD8⁺ T cells from female $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$ or OT-I (CD45.2⁺) mice were injected i.v. into female B6.SJL (CD45.1⁺) hosts. 2 days later, mice were immunized i.v. with 5×10^5 male B6.SJL mature peptide-pulsed DCs.

At different days post- immunization, brachial or inguinal LNs were removed surgically and sequentially to follow response in the same mouse. Effector functions and response in tertiary sites were analyzed as described previously [9].

Quantitative analysis of gene expression

Total RNA was isolated from sorted cells and reverse transcribed into cDNA. Real-time PCRs were performed using SYBR Green (Invitrogen) on an Applied Biosystems 7500 real Time PCR system. The primer sequences used are listed in Table SI. The ΔC_T value for each sample was determined by calculating the difference between the C_T value of the target and the C_T value of the endogenous reference gene (HPRT). Then, the $\Delta\Delta C_T$ value for each sample was determined by subtracting the mean of ΔC_T value of the sample obtained after an immunization with DC 3h from the ΔC_T value of the sample obtained with DC O/N. The normalized level of target gene expression was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Time-lapse microscopy

Poly L Lysine-treated coverslips were treated 1h with fibronectin type III (Sigma-Aldrich). 2×10^5 DCs were then added and incubated in CO_2 independent medium (Invitrogen) at $37^\circ C$ into an imaging chamber. 2×10^5 OT-1 T cells were added and sequential differential interference contrast images were recorded every 10s over 1h beginning one min after the addition of T cells on a Zeiss Z.1 inverted fluorescence microscope with CCD camera using the Northclipse application from Empix Imaging.

Statistical analysis

Statistics were done using Student's *t* or Mann-Whitney tests.

Acknowledgements

We thank members of the laboratory for helpful discussions; N. Henley for cell sorting; M.-P. Hardy and J. Rooney for technical support; J. Yewdell for the anti-K^b-OVA Ab and M. Chagnon for statistical analysis. We thank C. Charbonneau, R. Beaubien and L. Levin for help with time-lapse microscopy. We acknowledge the critical review of the manuscript by C. Perreault, S. Lesage and M. Guimond.

Authors contributions

Conceived and designed the experiments: JL and NL. Performed the experiments: JL. Analyzed the data: JL and NL. Wrote the paper: JL and NL.

Funding

This work was supported by a grant (MOP-77545) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to N.L. N.L. was supported by a CIHR New Investigator award and is currently a Senior Scholar of the FRSQ. J. L. received a studentship from the Department of Microbiology and Immunology of the University of Montreal. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing financial interests.

References

1. Williams MA, Bevan MJ (2007) Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25: 171-192.
2. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J (2003) T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4: 355-360.
3. Lozza L, Rivino L, Guarda G, Jarrossay D, Rinaldi A, et al. (2008) The strength of T cell stimulation determines IL-7 responsiveness, secondary expansion, and lineage commitment of primed human CD4+IL-7Rhi T cells. *Eur J Immunol* 38: 30-39.
4. Williams MA, Ravkov EV, Bevan MJ (2008) Rapid culling of the CD4+ T cell repertoire in the transition from effector to memory. *Immunity* 28: 533-545.
5. Wherry EJ, McElhaugh MJ, Eisenlohr LC (2002) Generation of CD8(+) T cell memory in response to low, high, and excessive levels of epitope. *J Immunol* 168: 4455-4461.
6. Zehn D, Lee SY, Bevan MJ (2009) Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 458: 211-214.
7. Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS, Harty JT (2005) Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med* 11: 748-756.
8. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, et al. (2007) Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8(+) T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* 27: 281-295.
9. Lacombe MH, Hardy MP, Rooney J, Labrecque N (2005) IL-7 receptor expression levels do not identify CD8+ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* 175: 4400-4407.
10. Labrecque N, Whitfield LS, Obst R, Waltzinger C, Benoist C, et al. (2001) How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15: 71-82.
11. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, et al. (1994) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17-27.

12. Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty PC (1994) Virus-specific CD8⁺ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* 369: 652-654.
13. Benvenuti F, Lagaudriere-Gesbert C, Grandjean I, Jancic C, Hivroz C, et al. (2004) Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol* 172: 292-301.
14. Henrickson SE, Mempel TR, Mazo IB, Liu B, Artyomov MN, et al. (2008) T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nat Immunol* 9: 282-291.
15. Scholer A, Hugues S, Boissonnas A, Fetler L, Amigorena S (2008) Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8⁺ T cell memory. *Immunity* 28: 258-270.
16. Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, et al. (2005) Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6: 1236-1244.
17. Takemoto N, Intlekofer AM, Northrup JT, Wherry EJ, Reiner SL (2006) Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8⁺ T cell differentiation. *J Immunol* 177: 7515-7519.
18. Fukuda T, Yoshida T, Okada S, Hatano M, Miki T, et al. (1997) Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med* 186: 439-448.
19. Ichii H, Sakamoto A, Arima M, Hatano M, Kuroda Y, et al. (2007) Bcl6 is essential for the generation of long-term memory CD4⁺ T cells. *Int Immunol* 19: 427-433.
20. Ichii H, Sakamoto A, Hatano M, Okada S, Toyama H, et al. (2002) Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 3: 558-563.
21. Ichii H, Sakamoto A, Kuroda Y, Tokuhisa T (2004) Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 173: 883-891.

22. Hedvat CV, Irving SG (1995) The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor. *Mol Endocrinol* 9: 1692-1700.
23. Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto A (1997) Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *Embo J* 16: 1865-1875.
24. Thompson J, Winoto A (2008) During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain. *J Exp Med* 205: 1029-1036.
25. La Gruta NL, Kedzierska K, Pang K, Webby R, Davenport M, et al. (2006) A virus-specific CD8+ T cell immunodominance hierarchy determined by antigen dose and precursor frequencies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 994-999.
26. Teixeira E, Daniels MA, Hamilton SE, Schrum AG, Bragado R, et al. (2009) Different T cell receptor signals determine CD8+ memory versus effector development. *Science* 323: 502-505.
27. Tunyaplin C, Shaffer AL, Angelin-Duclos CD, Yu X, Staudt LM, et al. (2004) Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* 173: 1158-1165.
28. Norbury CC, Princiotta MF, Bacik I, Brutkiewicz RR, Wood P, et al. (2001) Multiple antigen-specific processing pathways for activating naive CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* 166: 4355-4362.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Epitope density influences CD8⁺ Tm generation. A. The duration of peptide loading on DCs affects MHC-peptide expression. Representative histogram of K^b-SIINFEKL expression by DCs loaded 3h (DC 3h) or O/N (DC O/N) with SIINFEKL (left); dashed line, DCs pulsed with an irrelevant peptide (DC IRR). Mean fluorescence intensity (MFI) of K^b-SIINFEKL expression for DC O/N versus DC 3h (right). Results are from 13 independent experiments. B. The number of effector (day 4) and memory (day 45) OVA-specific T cells recovered from LNs after immunization with DC O/N or DC 3h is shown. Number of Ag-specific T cells was normalized to one million cells to correct for LN size variation. Each dot represents a mouse. Mice with no Tm cells were not included. C. The number of OVA-specific effectors recovered from the spleen (day 4) after immunization with DC O/N or DC 3h is shown. Each dot represents a mouse. D. The percentage of mice with Tm cells is shown.

Figure 2. Epitope density does not prolong CD8⁺ T cell expansion. A. The number of CD8⁺CD45.2⁺ T cells was quantified over time after immunization with DC O/N and DC 3h. LNs were sequentially removed to follow T cell response. The number of CD8⁺CD45.2⁺ T cells was normalized to one million cells to correct for LN size variation. * p<0,05. Results are pooled from 2 independent experiments with 3 mice per group. B. Generation of CD8⁺ Tm cells is also affected by epitope density when naïve T cell precursor frequency is low. 10⁴ OT-I T cells were adoptively transferred. The number of Ag-specific T cells recovered over time from the LNs is shown. Results from one representative experiment out of two are shown with 3 mice per group.

Figure 3. Epitope density dictates the duration and the quality of T-DC interaction. A. The duration of contact between naïve CD8⁺ T cells and DC O/N or DC 3h was measured *in vitro* using time-lapse microscopy. B. The percentage of naïve CD8⁺ T cells interacting for more than 640 seconds with DCs is shown for DC 3h or DC O/N. C. The proportion of T-DC interaction that leads to engulfment of naïve CD8⁺ T cells by DCs is shown for DC O/N or DC 3h.

Figure 4. The amount of Ag encountered by naïve CD8⁺ T cells influences transcription factor expression. A. No effect of Ag dose on T-bet expression. The left panel shows intracellular staining for T-bet in effectors at day 4 post-immunization with

DC O/N or DC 3h. The recipient endogenous population was used as a control. The right panel shows compilation of T-bet MFI. B. TCR engagement level finely tunes expression of key transcription factors. At d4 post-immunization, CD8⁺CD45.2⁺ T cells were sorted from spleen and LNs to perform qPCR analysis. The relative expression of mRNA in effector CD8⁺ T cells obtained after immunization with DC O/N related to those generated with DC 3h is shown (normalized to HPRT). 3 independent experiments with 3 mice per group.

Figure 5. Selective downregulation of Nor-1 expression in effector CD8⁺ T cells generated with high Ag dose. A. Expression of Nor-1 in effector CD8⁺ T cells. Effectors were sorted from spleen and LNs at d4 post-immunization to perform qPCR. The relative expression of Nor-1 after immunization with DC O/N related to those generated with DC 3h is shown (normalized to HPRT). 3 independent experiments with 3 mice per group. B. Epitope density influences the exposure of the BH3 domain of Bcl-2 in CD8⁺ effector T cells. The overlays show staining gated on OVA-specific effector (CD8⁺CD45.2⁺) T cells obtained at day 4 post-immunization with DC O/N or DC 3h. The controls were isotype and staining of the endogenous population (CD8⁺CD45.2⁻). C and D. The histogram represents the percentage (C) and the MFI (D) of Bcl-2-BH3 expression by Ag-specific T cells at d4 or d7 post-immunization with DC O/N or DC 3h. 3 independent experiments with 2-3 mice per group.

Figure 1

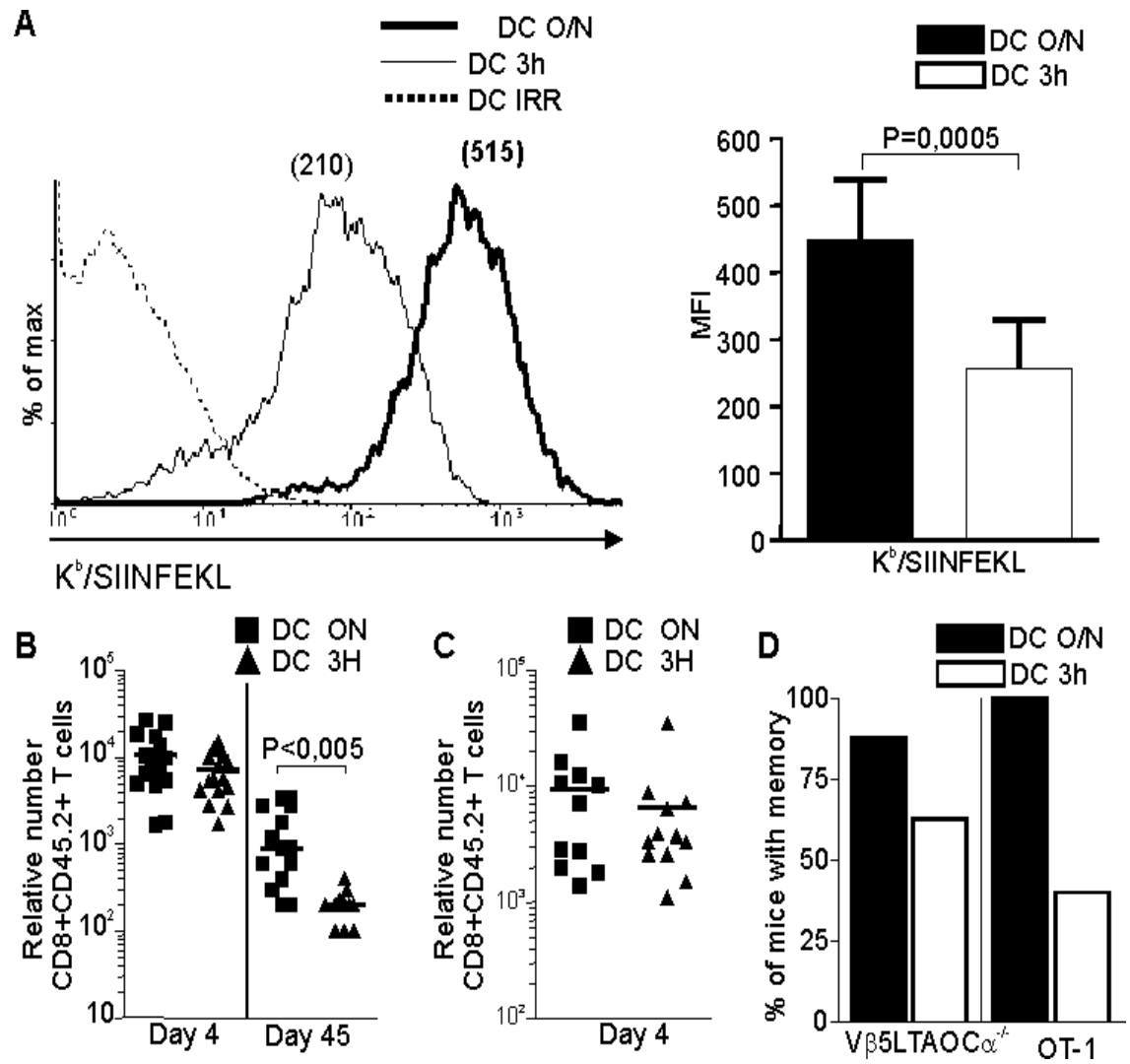


Figure 2

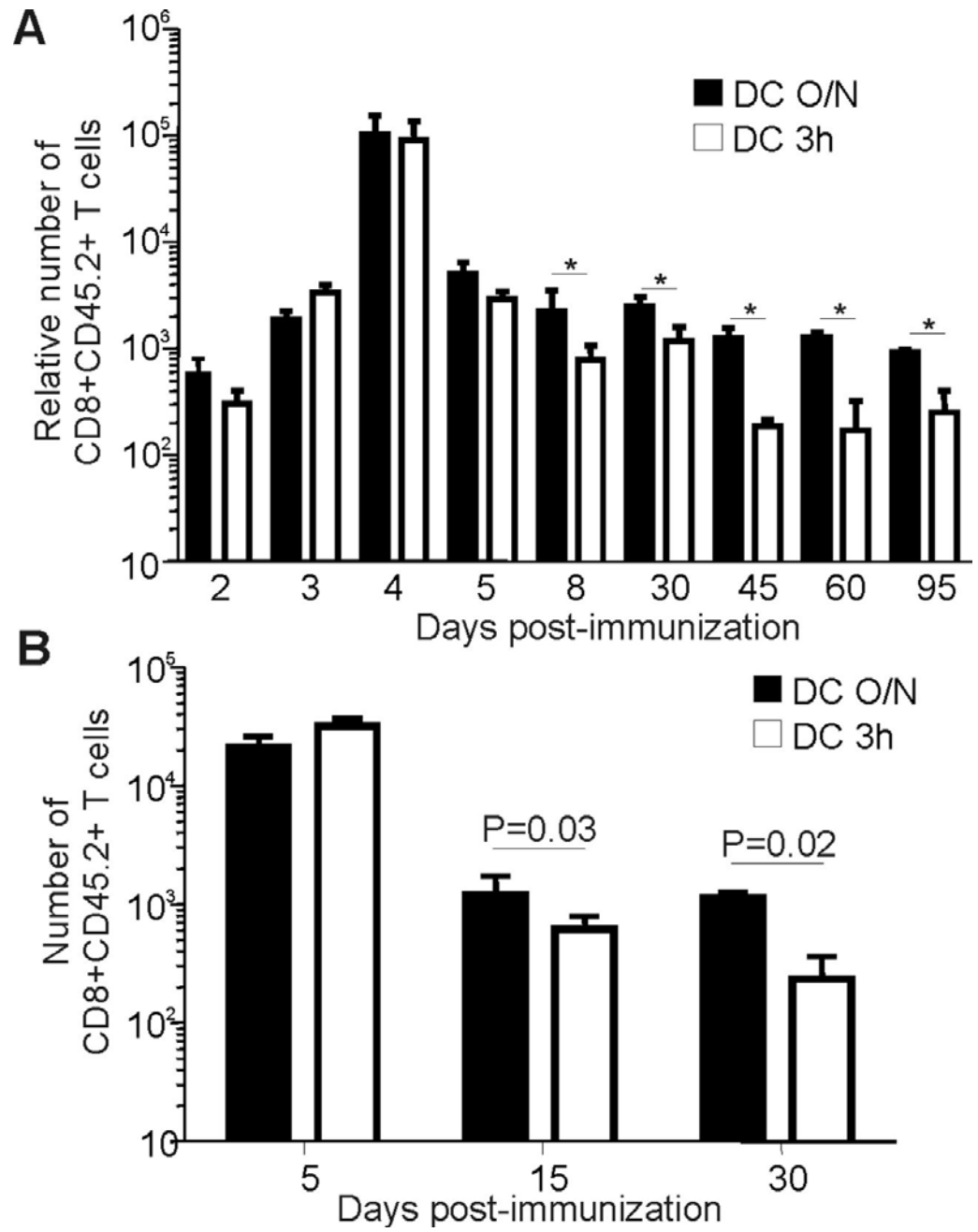


Figure 3

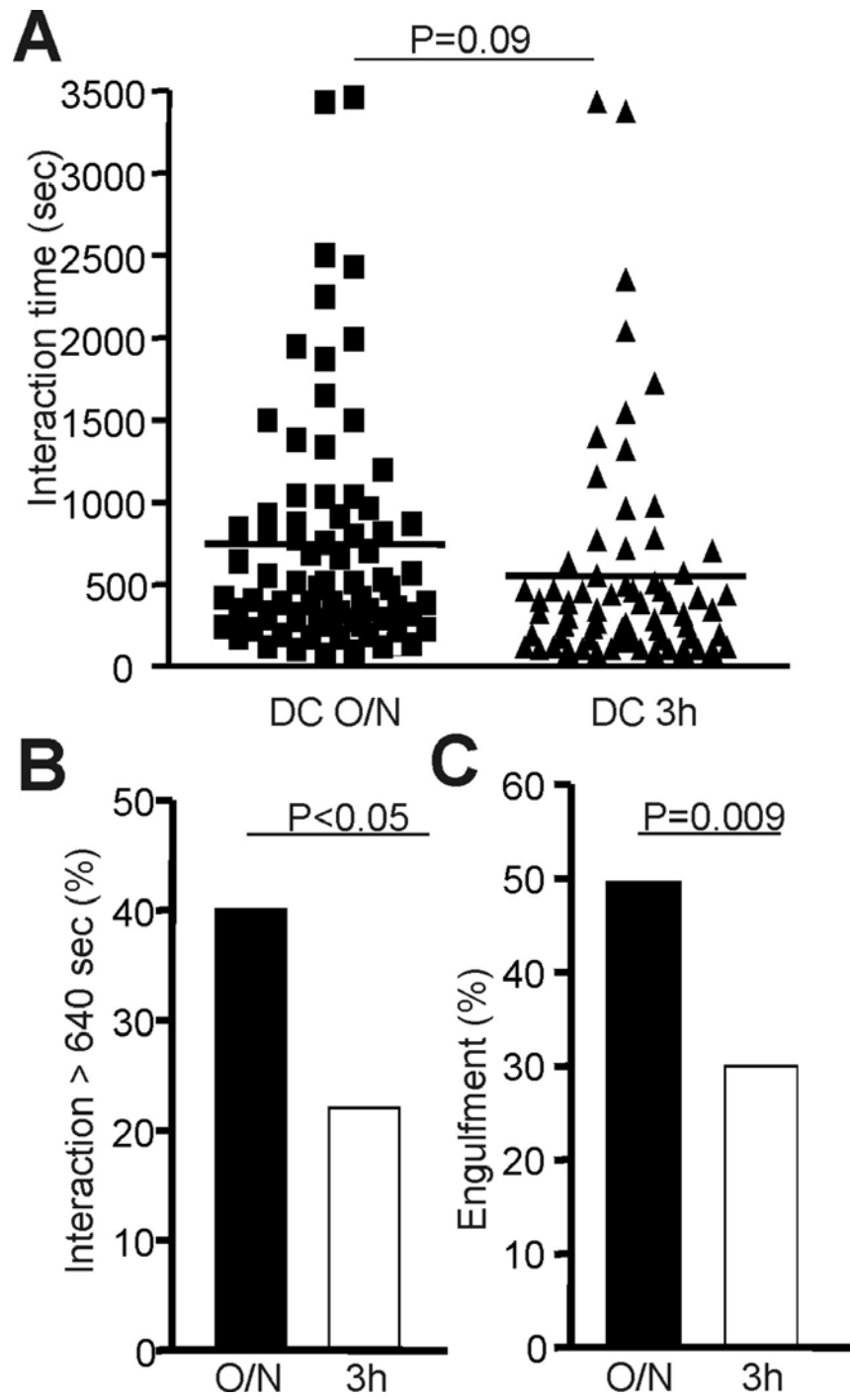


Figure 4

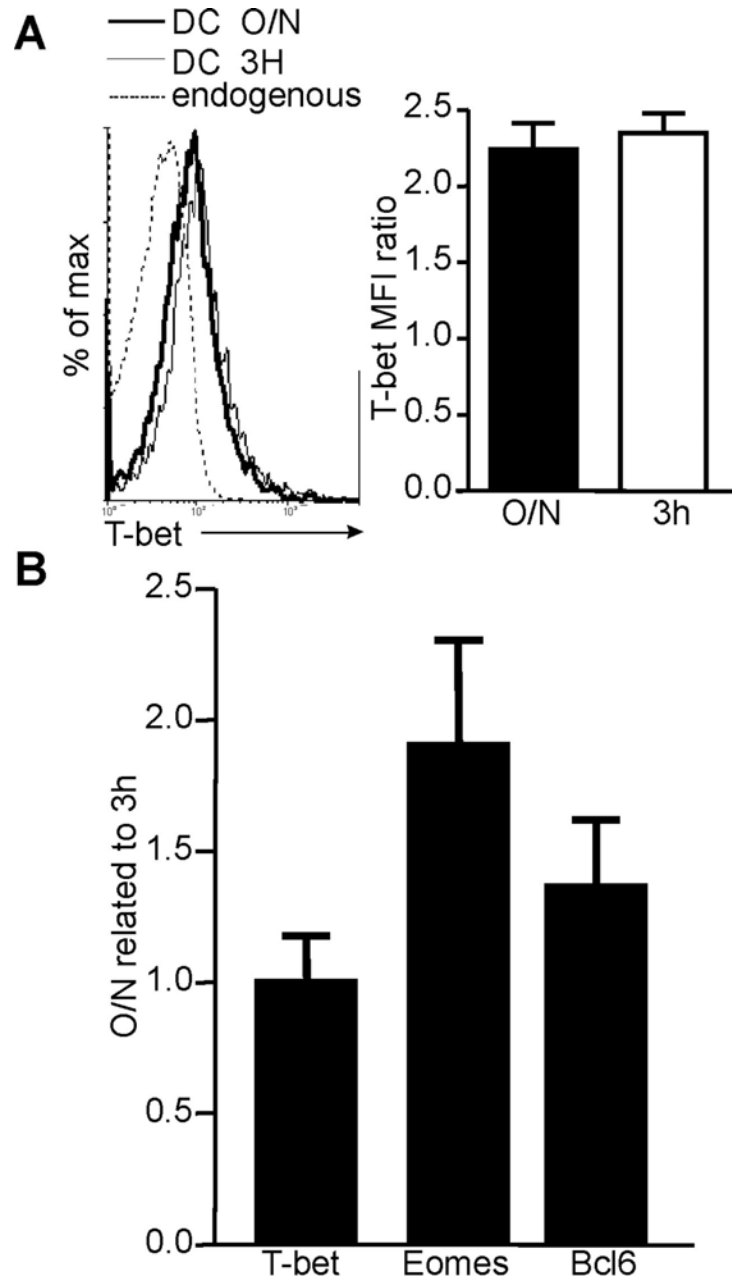
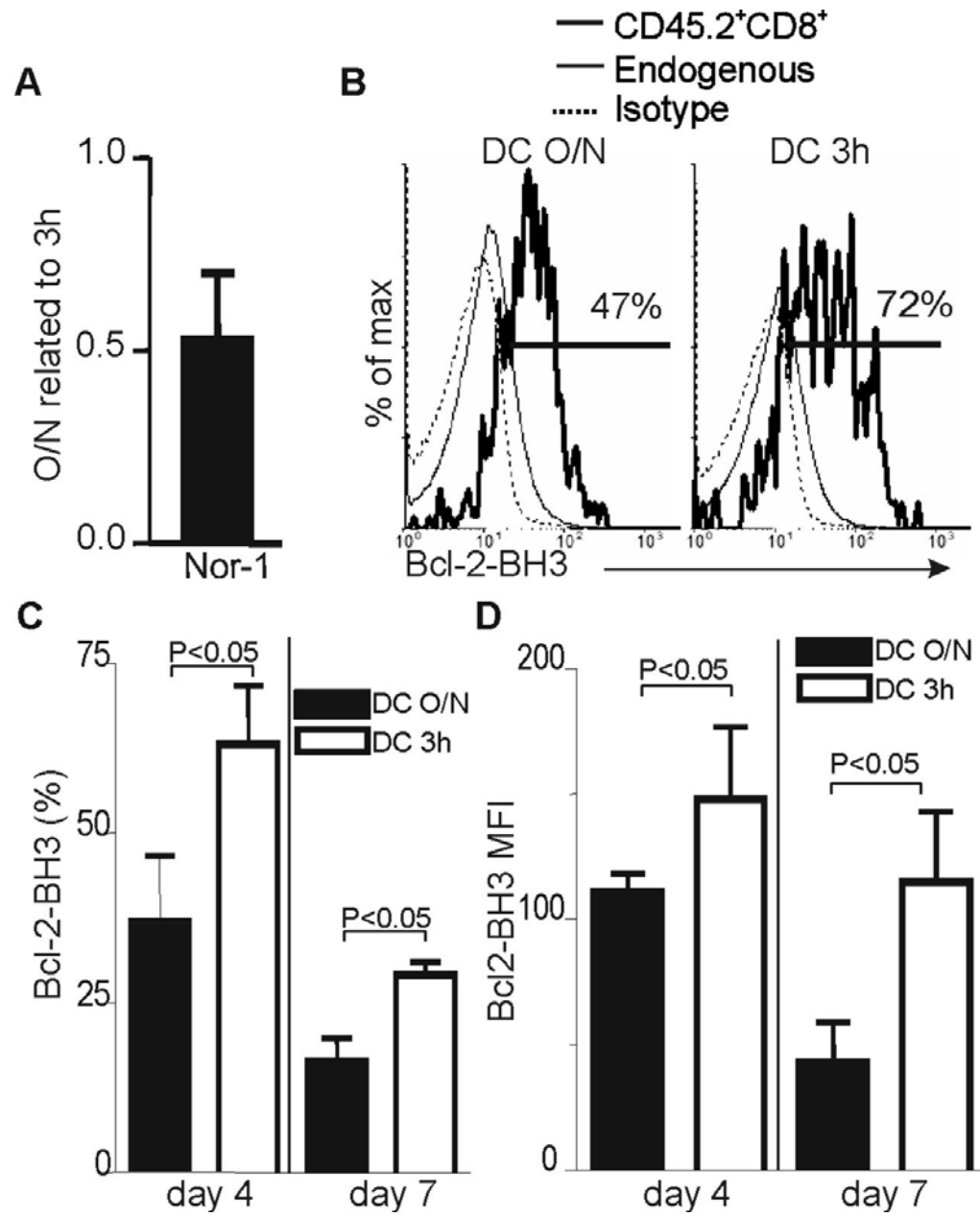


Figure 5



Figures supplémentaires

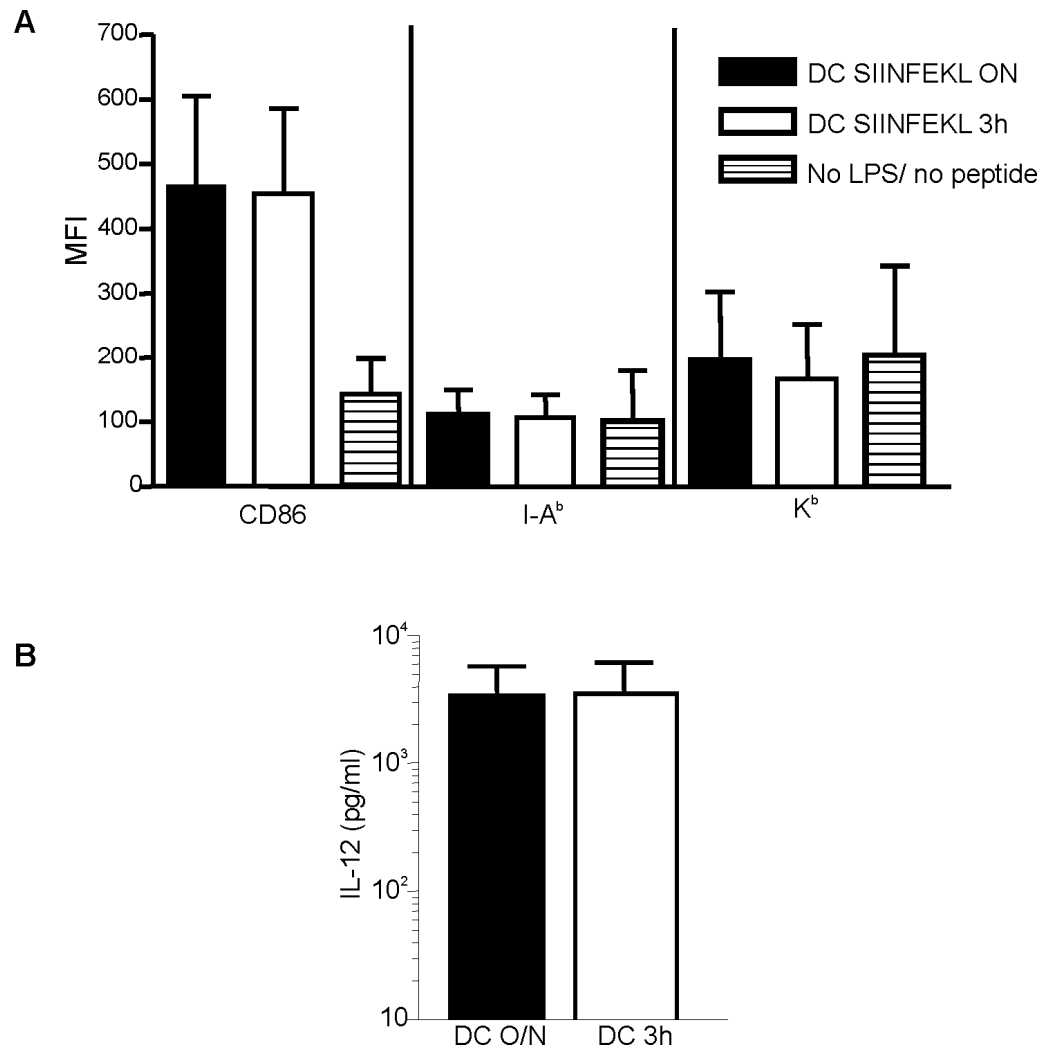


Figure S1. Phenotype of DCs loaded O/N or 3h with the SIINFEKL peptide. (A) The bar chart shows the expression of CD86, MHC class I (Kb) and II (I-Ab) on LPS matured DCs loaded O/N (black bar) or 3h (white bar) with SIINFEKL or on the surface immature DCs that were not loaded with antigen (dashed bar). (B) The bar chart shows the amount of IL-12 produced by LPS matured DCs loaded O/N (black bar) or 3h (white bar) with SIINFEKL.

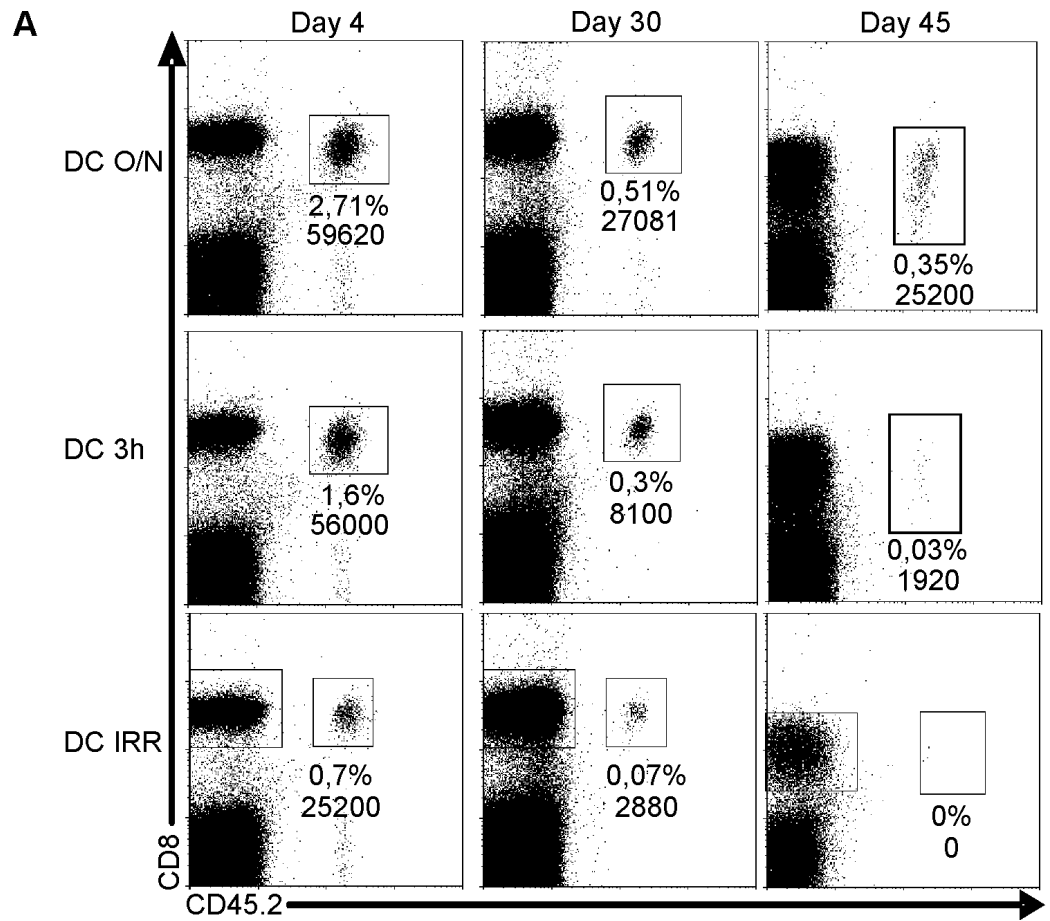


Figure S2. Generation of effector and memory CD8⁺ T cells after immunization with DCs expressing different amount of MHC-peptide complexes. DCs loaded O/N or for 3h with the SIINFEKL peptide were used to immunize mice that have been adoptively transferred with OVA-specific naïve CD8⁺ T cells. T cell response was evaluated in the same mouse by surgical removal of LNs. As a negative control, mice were immunized with DCs loaded with an irrelevant peptide (DC IRR). The percentage and number of OVA-specific CD8⁺ T cells (CD45.2⁺) in one LN are indicated in each dot plot. One representative experiment out of 10 is shown.

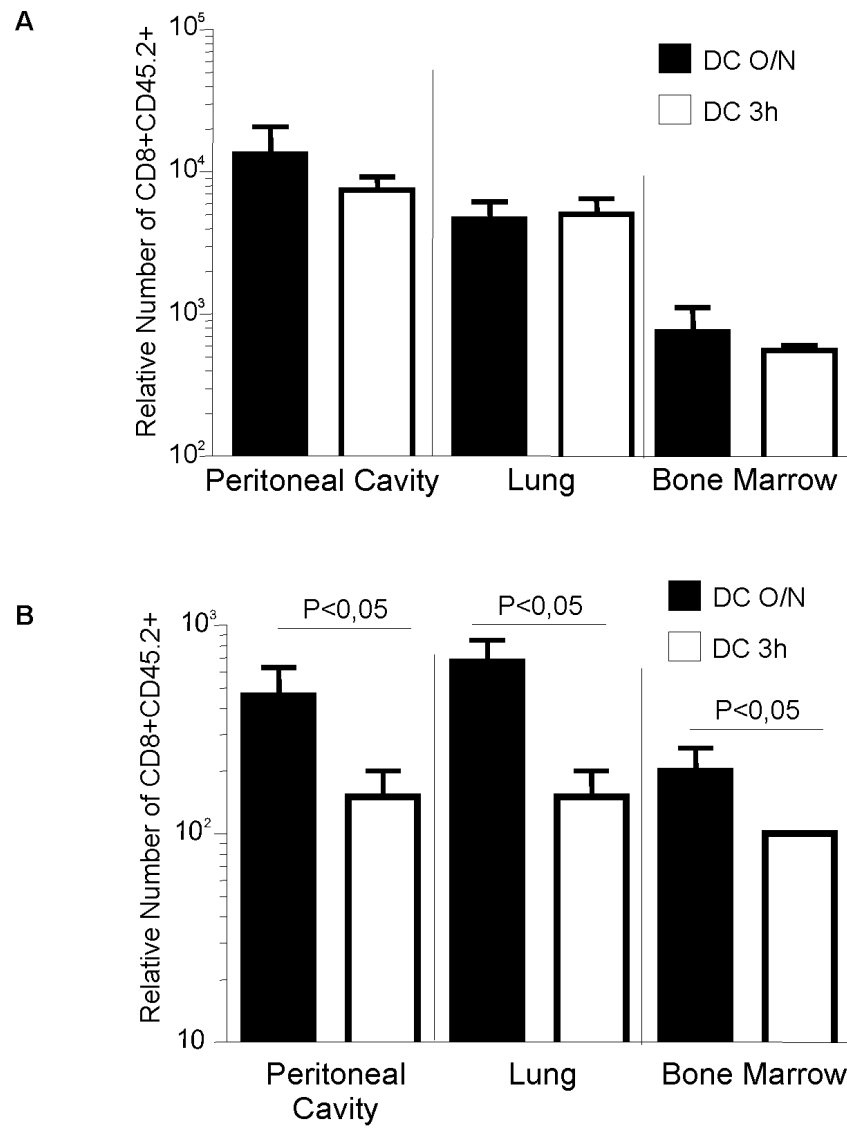


Figure S3. Number of OVA-specific CD8⁺ T cells in tertiary sites. The bar charts show the number of OVA-specific T cells (CD8⁺CD45.2⁺) recovered in the different sites at d4 (A) or d75 (B) post-immunization with DCs loaded O/N (black bar) or 3h (white bar) with the SIINFEKL peptide.

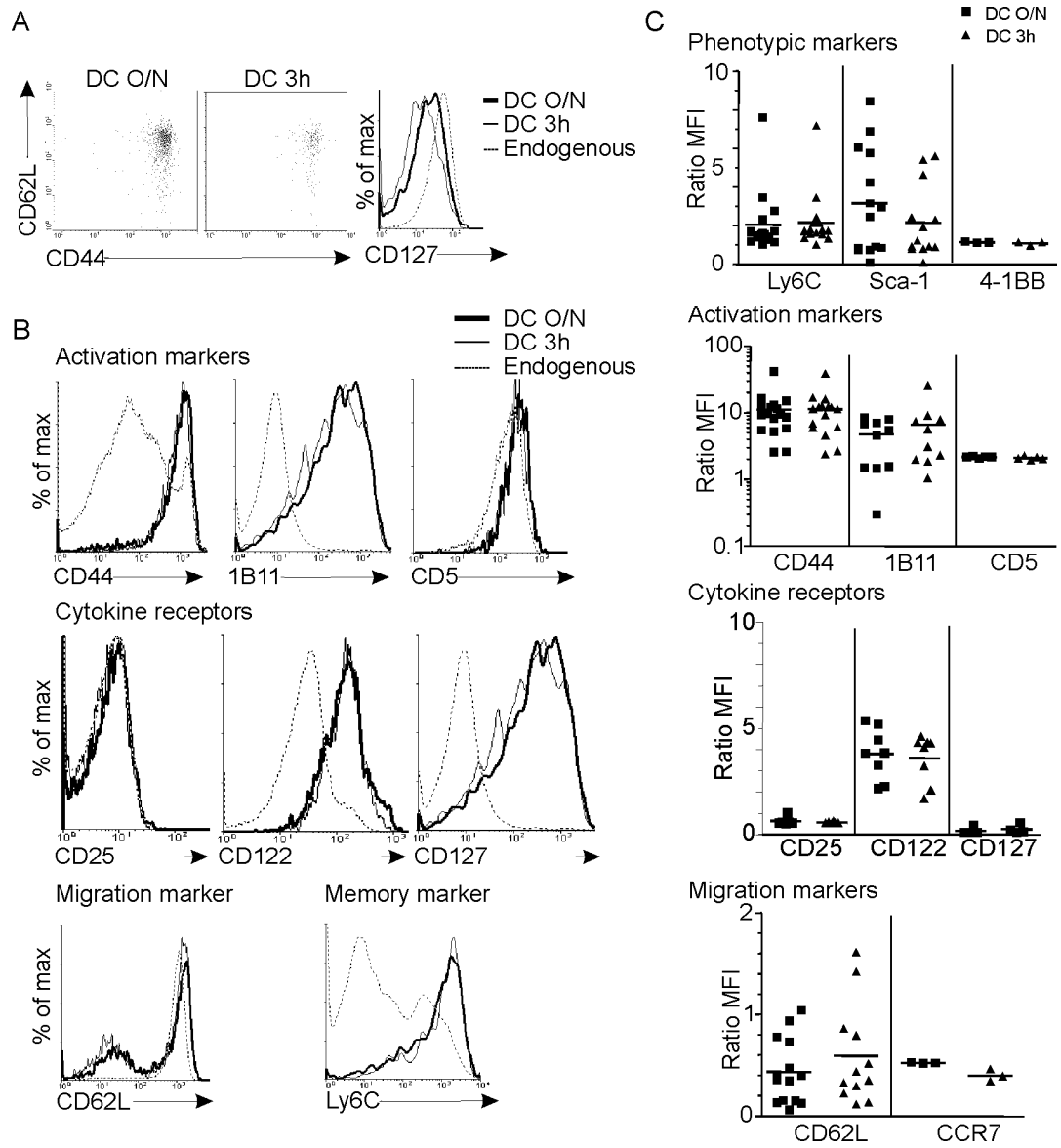


Figure S4. . Phenotype of memory and effector CD8⁺ T cells generated with different Ag doses. (A) Acquisition of a central memory phenotype by Ag-specific CD8⁺ T cells. Dot plots show CD62L/CD44 expression by OVA-specific CD8⁺ Tm cells 45d post-immunization with DCs expressing low (DCs 3h) or high (DCs O/N) level of Ag while the overlay shows CD127 expression. (B-C) Similar phenotype of effectors. (B) The overlays show expression of activation markers, cytokine receptors, migration marker and memory marker by OVA-specific CD8 T cells 4d post-immunization with DCs loaded with low (DCs 3h) or high (DCs O/N) level of Ag. Representative of 6 independent experiments with 2-3 mice per group. (C) To normalize between experiments, the data are presented as a ratio of MFI of the CD8⁺CD45.2⁺ T cells

(SIINFEKL-specific effectors) over the MFI of $CD8^+CD45.2^-$ T cells (endogenous population). Each dot represents a mouse

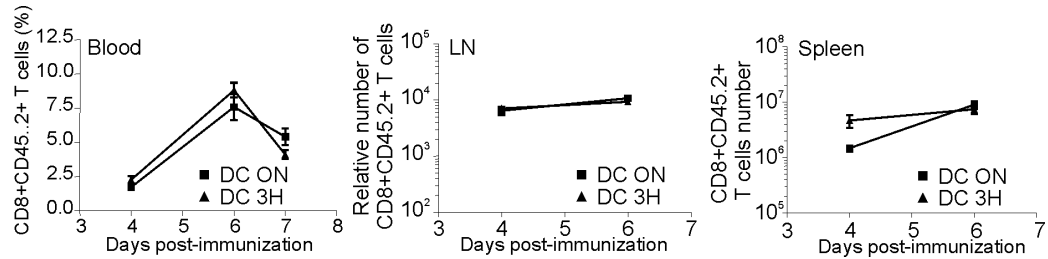


Figure S5. Epitope density does not affect the clonal burst size of OVA-specific $CD8^+$ T cells when a low frequency of naïve T cell precursors is adoptively transferred. 10^4 $CD8^+$ ($CD45.2^+$) T cells from OT-1 mice were transferred into B6.SJL hosts ($CD45.1^+$). Two days later, mice were immunized with 5×10^5 mature DCs loaded overnight (DC O/N) or 3 hours (DC 3h) with the SIINFEKL peptide. On days 4, 6 and 7 after immunization, responsive $CD8^+$ T cells were detected in blood, lymph node (LN) and spleen by staining with anti- $CD45.2$ and anti- $CD8$ Abs.

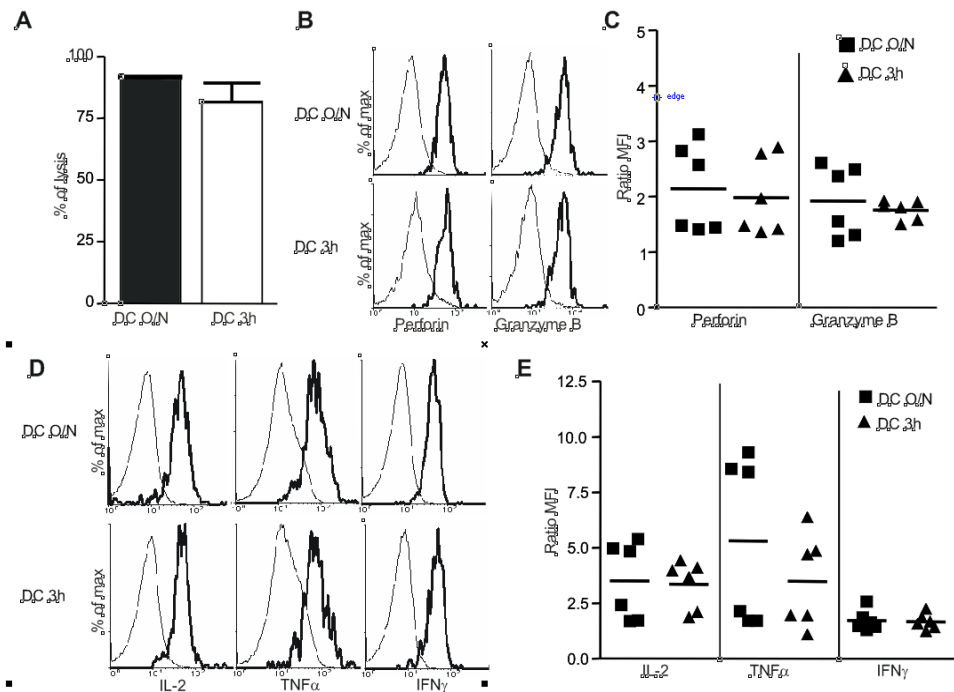


Figure S6. Effector functions are not affected by the amount of Ag seen at priming. (A) The percentage of specific lysis is shown for effectors obtained after immunization with DC pulsed with SIINFEKL O/N (DC O/N) or 3h (DC 3h). CFSE-labeled splenocytes pulsed or not with SIINFEKL were injected at d4 post-

immunization. After 4 h, the presence of target cells was analyzed in the spleen. (B) The overlays show perforin (left) and granzyme B (right) staining for OVA-specific CD8⁺ T cells (CD8⁺CD45.2⁺, thick line) and recipient naïve T cells (CD8⁺CD45.2⁻, thin line) at d4 post-immunization. (C) The graph shows the MFI of perforin and granzyme B stainings at the peak of response. Each dot represents one mouse. (D) The histograms show IL-2 (left), TNF α (middle) and IFN γ (right) production by OVA-specific CD8⁺ T cells (CD8⁺CD45.2⁺, thick line) and recipient T cells (CD8⁺CD45.2⁻, thin line) at d4 post-immunization. (E) Quantification of the amount of IL-2, TNF α and IFN γ produced by the two groups of effectors. The MFI of cytokine production by effector CD8⁺ T cells was normalized to the MFI of the recipient CD8⁺ T cells. Results from panel A to E are from 2 independent experiments with 3 mice per group.

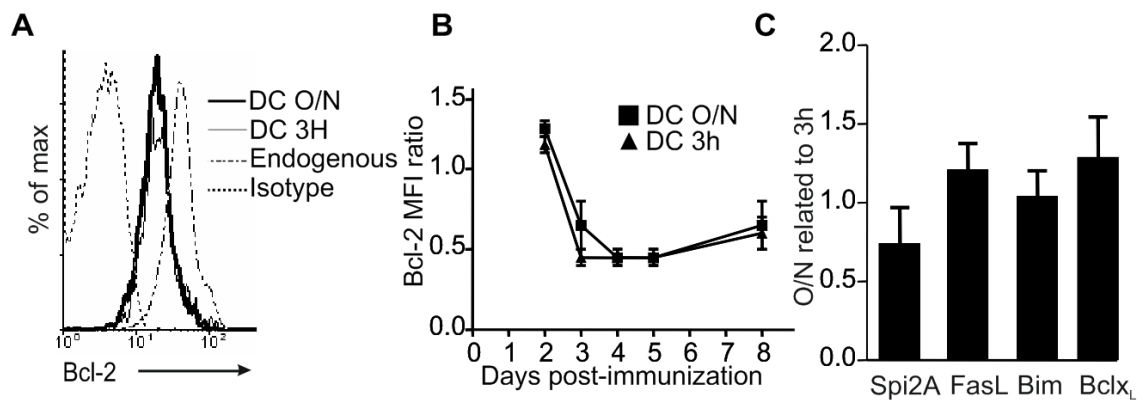


Figure S7. The level of antigenic presentation to naïve CD8⁺ T cells does not affect effector T cell survival. (A) Similar expression of Bcl-2 in effectors. The overlay represents Bcl-2 expression at the peak of response (d4) in CD8⁺CD45.2⁺ T cells obtained after immunization with DCs loaded O/N (DC O/N) or 3h (DC 3h). Dashed line, endogenous population (CD8⁺CD45.2⁻); dotted line, isotype control. (B) Kinetic of Bcl-2 expression. Bcl-2 expression is shown over time for effector CD8⁺ T cells generated after immunization with DCs loaded O/N (DC O/N) or 3h (DC 3h) with the OVA peptide. The MFI of Bcl-2 expression by effector CD8⁺ T cells was normalized to the MFI of the recipient CD8⁺ T cells. 2 independent experiments with 3 mice per group. (C) Expression of pro- and anti-apoptic molecules by effector CD8⁺ T cells. Effectors were sorted from spleen and LNs at d4 post-immunization to perform qPCR. The relative expression of the different genes after immunization with DC O/N related to those generated with DC 3h is shown (normalized to HPRT). 3 independent experiments with 3 mice per group.

Table S1

Gene	Forward	Reverse	Reference
Eomes	GTTTTTCGTGGAAGTGGTTCTG	GGAGCCAGTGTTAGGAGATTC	1
Spi2A	AACCAGACCCTGAGGAAGTG	AACTTGGGCAGGCCGAG	1
Bcl6	CCGGCTCAATAATCTCGTGAA	GGTGCATGTAGAGTGGTGAGTGA	2
T-bet	CCTGCAGTGCTTCTAACACACAC	CTCCGCTTCATAACTGTGTTC	3
Bim	CGGATCGGAGACGAGTTCA	TTCAGCCTCGCGGTAATCA	4
Nor-1	GATCACAGAGCGACATGGGTTA	GAGCCTGTCCCTTCCTCTGG	4
FasL	TGAATTACCCATGTCCCCAG	AAACTGACCCTGGAGGAGCC	5
Bcl-x _L	GAGCTGGTGGTCGACTTTC	CTCCCTCTCTGCTTCAGTTTC	1
HPRT	CTCCTCAGACCGCTTTTTGC	TAACCTGGTTCATCATCGCTAATC	3

1 Bachmann, M.F., R.R. Beerli, P. Agnellini, P. Wolint, K. Schwarz, and A. Oxenius. 2006. Long-lived memory CD8⁺ T cells are programmed by prolonged antigen exposure and low levels of cellular activation. *Eur. J. Immunol.* 36:842-854.

2 Yoshida, K., A. Sakamoto, K. Yamashita, E. Arguni, S. Horigome, M. Arima, M. Hatano, N. Seki, T. Ichikawa, and T. Tokuhisa. 2006. Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 36:3146-3156.

3 Intlekofer, A.M., N. Takemoto, E.J. Wherry, S.A. Longworth, J.T. Northrup, V.R. Palanivel, A.C. Mullen, C.R. Gasink, S.M. Kaech, J.D. Miller, L. Gapin, K. Ryan, A.P. Russ, T. Lindsten, J.S. Orange, A.W. Goldrath, R. Ahmed, and S.L. Reiner. 2005. Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and Eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6:1236-1244.

4 Williams, M.A., E.V. Ravkov, and M.J. Bevan. 2008. Rapid culling of the CD4⁺ T cell repertoire in the transition from effector to memory. *Immunity* 28:533-545.

5 Pinkoski, M.J., N.M. Droin, T. Lin, L. Genestier, T.A. Ferguson, and D.R. Green. 2002. Nonlymphoid Fas ligand in peptide-induced peripheral lymphocyte deletion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:16174-16179.

LES RESULTATS DE L'ARTICLE N°3

Memory T lymphocyte survival does not require T cell receptor expression

Julie Leignadier*, Marie-Pierre Hardy*, Marilynne Cloutier, Julie Rooney and Nathalie Labrecque

*co-première auteure

Papier publié dans le journal Proceedings of National Academy of Sciences (décembre 2008, volume 105, n°51)

Contribution

Ce projet est la suite d'une étude commencée par M.P.H. durant sa maîtrise, c'est pour ceci que nous sommes toutes les deux copremière auteure. Cependant, la majorité des expériences représentées dans le papier ont été réalisées par moi. Seul pour la figure n°1 du papier, où ma participation a été d'augmenter le nombre de n. Au niveau des figures supplémentaires : la figure S1 a été réalisée par M.P.H et moi-même, la figure S2 a été faire par J.R., la figure S3 a été réalisée par moi-même, et la figure S4 a été réalisée par M. Cloutier. Ma directrice de recherche Dr. Nathalie Labrecque a écrit le papier, j'ai participé à la rédaction du matériel et méthode et à la correction de l'article.

Classification: major: Biological Sciences

minor: Immunology

Memory T lymphocyte survival does not require T cell receptor expression

**Julie Leignadier*†, Marie-Pierre Hardy*†, Marilyne Cloutier*, Julie Rooney* and
Nathalie Labrecque*†‡**

*Maisonneuve-Rosemont Hospital research Center, 5415 boul. De l'Assomption,
Montreal, Canada H1T 2M4, †Department of Microbiology and Immunology; and
‡Department of Medicine, University of Montreal

Corresponding author: Nathalie Labrecque

Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center,
5415 boul. de l'Assomption,
Montreal, Qc, Canada HIT 2M4
Phone:1-514-252-3552
Fax:1-514-252-3569

Abbreviations: memory T cells, T_m cells; tetracycline, tet; ovalbumin, OVA;
lymph node, LN, mesenteric LN, MLN; bone marrow, BM.

ABSTRACT

The factors controlling memory T cell longevity are still poorly defined and their identification are pivotal to design vaccine conferring long-term protection against infection. Memory T cells have the ability to survive in absence of TCR-MHC interaction. This does not exclude a possible role for TCR-intrinsic ligand-independent constitutive signaling in memory T cell homeostasis. Using a unique TCR tetracycline-inducible expression system, we show that the ablation of TCR expression, which abrogates any possible signaling via the TCR, did not influence the survival and self-renewal of antigen-specific memory CD8⁺ T cells even when they have to compete with endogenous T cells for survival factors. Moreover, memory CD8⁺ T cell functionality was not altered even upon a prolong maintenance in absence of TCR-MHC interactions. Furthermore, our results show that a subset of CD4⁺ memory T cells can survive in absence of TCR expression in non-lymphopenic hosts.

INTRODUCTION

Memory T cells (T_m) are crucial for the long-term maintenance of protective immunity against reinfection. The factors controlling T_m cell longevity are still poorly defined and their identification are pivotal to design vaccine conferring long-term protection against infection. Like naive T cells, the survival of T_m cells is regulated by cytokines. IL-7 regulates the survival of both CD4⁺ and CD8⁺ naive and memory T cells while IL-15 controls the homeostasis of naive CD8⁺ T cells, CD4⁺ T_m cells and CD8⁺ T_m cells (1-4). Therefore, naive and memory T cells have to compete for the same cytokines for their maintenance in the T cell pool. This suggests that other homeostatic signal(s) may contribute to the independent and non-competitive maintenance of naive and memory T cells.

It is generally believed that TCR-MHC interactions are not needed for the survival of T_m cells (5-7). However, there are numerous reports showing antigen-dependency (8-11) or TCR-MHC interactions (12, 13) requirement for the maintenance of T_m cells. For example, the survival of HY TCR transgenic T_m cells depends on MHC class I expression (12, 13) although a non-restricting allele was sufficient (12). Moreover, CD4⁺ T_m cells maintained in absence of TCR-MHC class II interactions have impaired functionality (14, 15). However, the studies reporting MHC-independent survival of T_m cells were done in situation where T_m cells did not have to compete for survival factors with endogenous T cells (5-7). Therefore, these observations suggest the possibility that TCR-MHC interaction may contribute to T_m cell survival and functionality in a normal environment. Alternatively, we propose that intrinsic constitutive signals from the TCR might allow for MHC-independent survival of T_m cells. Accordingly, abrogation of TCR signaling by turning off the tyrosine kinases *lck* and *fyn* caused a significant drop in the number of CD4⁺CD44^{hi} T_m cells (16). Due to possible competition for cytokines between naive and T_m lymphocytes, it is plausible that T_m cells use constitutive TCR signaling to receive survival signal allowing them to be maintained in a different homeostatic niche than naive T cells.

To evaluate if constitutive TCR signaling contributes to the survival of functional T_m cells, we used a transgenic tetracycline(tet)-inducible expression system in which we can abrogate TCR expression on T cells (17). Our results show that the ablation of TCR expression, which abrogates any possible TCR signaling, did not influence the survival

and self-renewal of antigen-specific CD8⁺ Tm cells even when they have to compete with endogenous T cells. Moreover, CD8⁺ Tm cell functionality was not altered upon a prolonged maintenance in absence of TCR-MHC interactions. Furthermore, our results show that a subset of CD4⁺ Tm cells can survive without TCR expression even if they have to compete with TCR-positive endogenous CD4⁺ Tm lymphocytes.

RESULTS

Antigen-specific CD8⁺ Tm cells survive in the absence of TCR expression

The ability of Tm cells to survive in absence of TCR-MHC interactions (5-7) does not exclude a role for intrinsic constitutive TCR signaling (independent of MHC) in Tm cell homeostasis. To determine if TCR expression is necessary for CD8⁺ Tm cell survival, we used a transgenic mouse model, Vβ5LTAOCα^{-/-}, that expresses the ovalbumin(OVA)-specific OT-1 TCR whose expression is tet-dependent (17). In this model, the TCRVβ5 chain is expressed constitutively while the expression of the TCRVα2 chain is tet-inducible. Tet administration to Vβ5LTAOCα^{-/-} mice blocks TCR expression by inhibiting the tTA dependent transcription of the TCRVα2 transgene (17). We have previously extensively characterized this model and have shown complete ablation of TCR expression following tet treatment (17). To generate CD8⁺ Tm cells expressing a tet-inducible TCR, we adoptively transferred 10⁶ Vβ5LTAOCα^{-/-} (CD45.2⁺) T cells into congenic B6.SJL (CD45.1⁺) mice. 48 hours later, recipients were immunized with 5 X 10⁵ bone marrow (225) derived mature DCs pulsed with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide. We transferred female T cells into female hosts and immunized with male DCs to provide T cell help necessary to generate functional and long-lived CD8⁺ Tm cells (18). Long-lived CD8⁺ central Tm cells with the ability to make recall response were generated [Supporting information, Fig. S1] and were present in similar numbers in the different superficial lymph nodes (LNs) (Fig. S2). Before stopping TCR expression, we removed by surgery a LN to evaluate the number of Tm cells 40 days after immunization. As shown in Fig. 1A, Vβ5LTAOCα^{-/-} Tm cells (CD8⁺CD45.2⁺Ly6C^{hi}) were detected in the inguinal LN. Mice were then administered tet (400 μg/ml) to completely stop TCR expression (17) in OVA-specific CD8⁺ Tm cells (Fig. S3 and S4). Superficial LNs were removed surgically at different days after treatment to follow the survival of Vβ5LTAOCα^{-/-} Tm cells (CD45.2⁺Ly6C^{hi}). OVA-specific CD8⁺ Tm cells were still present in similar numbers after 35 and 65 days of tet treatment (Fig. 1A, 75 and 105 days post-immunization). Similar results were obtained 190 days post-immunization in the mesenteric LNs and spleen (Fig. 1B). Since the maintenance of functional CD4⁺ Tm cells requires TCR-MHC interactions (14, 15), we evaluated if CD8⁺ Tm cells maintained in the peripheral pool without TCR were functional. Due to

their lack of TCR expression, cells were stimulated *in vitro* for 4h with PMA and ionomycin to measure IFN- γ production. CD8⁺ Tm cells denuded of TCR were comparable to their TCR positive counterpart for IFN- γ production (Fig. 1C). Altogether, these results suggest that CD8⁺ Tm cell survival and the maintenance of their functionality do not require TCR expression.

To confirm the lack of TCR dependency for CD8⁺ Tm cell maintenance, we generated OVA-specific CD8⁺ Tm cells *in vitro* (19) and transferred them in naive mice. At the end of the culture, the cells had acquired a central memory phenotype (Fig. S4). 3 X 10⁶ *in vitro* generated OVA-specific CD8⁺ Tm cells (CD45.2⁺) were adoptively transferred into B6.SJL recipients (CD45.1⁺). Seven days after transfer, half of the mice were tet-treated while the other half was kept untreated. Tet treatment abrogated TCR expression (Fig. 2A and Fig. S3) but did not affect the maintenance of the OVA-specific CD8⁺ Tm cells in the LNs (Fig. 2B) and spleen (Fig. 2C). Moreover, self-renewal of the transferred V β 5LTAOC α ^{-/-} CD8⁺ Tm cells was similar in cells expressing or not the TCR as measured by BrdU incorporation (Fig. 2D). These results show that CD8⁺ Tm cells survive and self-renew in the absence of TCR expression, which indicates that TCR signals are not necessary for the long-term maintenance of antigen-specific CD8⁺ Tm cells. Furthermore, these results show that CD8⁺ Tm cells denuded of TCR can be maintained even when they have to compete for survival factors with endogenous T cells.

A subset of CD4⁺ Tm cells lacking TCR expression can survive in lymphoreplete hosts

The unimpaired survival of CD8⁺ Tm cells following TCR ablation does not exclude a role for TCR expression in the maintenance of CD4⁺ Tm cells. Moreover, abrogation of TCR signaling by turning off the tyrosine kinases *lck* and *fyn* was shown to cause a significant drop in the number of CD4⁺CD44^{hi} Tm cells (16). This suggests that intrinsic constitutive signals from the TCR might contribute to the MHC-independent survival of CD4⁺ Tm cells. To evaluate the role of TCR expression for the maintenance of CD4⁺ Tm cells, we used our tet-inducible TCR expression system in the absence of the transgenic TCR β chain (LTAO mice) (17). In these mice, the tet-regulatable TCR V α 2 positive cells are selected into the CD4 lineage (17). Furthermore,

LTAO mice possess a polyclonal repertoire of T cells (Fig. S5) and their encounter with antigens from the environment lead to the development of a pool of CD4⁺ Tm cells with a CD44^{hi}CD62L^{lo}CD45RB^{lo} phenotype (20, 21). At first, we treated LTAO mice on a TCR C α -deficient background (LTAOC α ^{-/-}) with tet to abrogate TCR expression (Fig. S6). Tet-treatment lead to the rapid loss of both naive and memory CD4⁺ T cells (data not shown). However, this loss of all T cells is accompanied with an important decrease in total LN cellularity with a loss of the non-T cell population (data not shown) suggesting that T cells regulate secondary lymphoid organ homeostasis (manuscript in preparation). The perturbation of secondary lymphoid organ homeostasis that occurs in the LTAOC α ^{-/-} model could lead to the disappearance of a cell type secreting or expressing a factor controlling CD4⁺ Tm cell survival. Therefore, to definitively address the role of TCR expression for the maintenance of CD4⁺ Tm cells, we used LTAO mice on a TCR α -sufficient background (LTAOC α ^{+/-}). In these mice, only 10 to 20% of CD4⁺ T cells express the tet-regulatable TCRV α 2 chain (17). Therefore, T cells expressing endogenous TCR α chain would not be affected by tet and they should allow for normal homeostasis of secondary lymphoid organs. LTAO mice were treated with tet to follow the survival of CD4⁺ Tm cells lacking TCR expression (CD4⁺CD3⁻CD44^{hi}). LN cellularity was not affected by tet administration indicating normal secondary lymphoid organ homeostasis (Fig. 3A). From previous work, we have shown that TCR negative cells can be distinguished from TCR positive cells after 7 days of tet treatment (17), thus this time point was used to evaluate the initial percentage of CD4⁺CD44^{hi} Tm cells expressing a tet-inducible TCR (Fig. 3B). About half of the CD4⁺ Tm cells stripped of their TCRs (Fig.S6) decay rapidly over tet treatment (Fig. 3B) while the other half remains detectable for over 100 days (Fig. 3B). Furthermore, tet treatment did not affect the survival of TCR positive CD4⁺ Tm cells (Fig. 3C). These results suggest that a subset of CD4⁺ Tm cells need TCR expression to survive in the T cell pool while some CD4⁺ Tm cells can be maintained in absence of TCR expression even when they have to compete with TCR-positive CD4⁺ Tm cells.

TCR expression is not needed for IL-7 responsiveness and Bim down-regulation

The defective survival of a subset of CD4⁺ Tm cells in absence of TCR expression could result from their unresponsiveness to the survival factor IL-7. Therefore, we evaluated the expression level of the IL-7 receptor α chain (CD127) on T

cells lacking TCR expression for 14 days (Fig. 4). CD127 expression was identical on CD4⁺ Tm cells expressing or not the TCR (Fig. 4). Because Bcl-2 is regulated by IL-7 signals (22, 23), we evaluated its expression in CD4⁺ LTAOC $\alpha^{+/-}$ T cells expressing or not the TCR after 14 days of tet treatment. There was no difference in Bcl-2 expression in T cells expressing or not the TCR (Fig. 4). Another pathway controlled by IL-7 is glucose uptake and regulation of cell surface expression of the glucose transporter, Glut1 (24, 25). As shown in Fig. 4, cell surface expression of Glut1 was similar in CD4⁺ LTAOC $\alpha^{+/-}$ T cells expressing or not expressing the TCR. Moreover, T cells lacking TCR expression did not up-regulate the expression of the proapoptotic molecule Bim (Fig. 4). Similar results were obtained for CD127, Bcl-2, Glut-1 and Bim expression after a longer tet treatment of 56 days (not shown). These results suggest that TCR signals do not control IL-7 responsiveness and Bim expression in CD4⁺ Tm cells.

Preferential loss of rapidly dividing CD4⁺ Tm cells in absence of TCR expression after transfer into lymphopenic hosts

The pool of CD4⁺CD44^{hi} Tm cells in WT mice contains two subsets of Tm cells (2, 26). One subset requires interaction with self-MHC class II molecules for its maintenance and undergoes rapid homeostatic division when transfer into lymphopenic hosts, which also depends on MHC class II expression (2, 26). The other subset of CD4⁺ Tm cells is maintained independently of MHC class II interaction and divides slowly when transfer into lymphopenic recipients (2, 26). Therefore, we tested if the subset of CD4⁺ Tm cells lost following TCR ablation (Fig. 3B) depends on interaction with MHC class II molecules for its survival and homeostatic proliferation. If this is the case, we expect a selective loss of rapidly dividing CD4⁺ Tm cells after their transfer into lymphopenic recipients in absence of TCR expression. To test that, we sorted CFSE-labeled CD4⁺CD44^{hi} Tm cells lacking (+TET) or not (No TET) TCR expression from LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice (treated or not with tet for 7 days) and adoptively transferred these cells into lymphopenic hosts that were respectively treated or not with tet. As shown in Fig. 5, a selective loss of rapidly dividing CD4⁺CD44^{hi} Tm cells occurs in the spleen when T cells lack TCR expression (+TET). This suggests that the loss of CD4⁺ Tm cells that we have seen after TET treatment of LTAOC $\alpha^{+/-}$ mice (Fig. 3B) is due to the disappearance of the subset of CD4⁺ Tm cells that is dependent on MHC class II expression. Furthermore, the subset of CD4⁺ Tm cells that survives in absence of TCR

expression in LTAOC $\alpha^{+/-}$ mice most likely represents the pool of antigen-specific CD4⁺ T_m cells with slow homeostatic proliferation potential.

DISCUSSION

Using a tet-inducible expression system of the TCR in mice, we showed that TCR expression is not required for the survival and self-renewal of CD8⁺ Tm cells. These observations are in agreement with the lack of requirement for TCR-MHC interactions for the survival of CD8⁺ Tm cells (7). Furthermore, our data show that TCR-less CD8⁺ Tm cells are efficiently maintained in the T cell pool even if they had to compete for survival factors with naïve and memory T cells that are present in non-lymphopenic mice. Therefore, the proper survival of antigen-specific CD8⁺ Tm cells in absence of MHC interactions that was reported by others (7) is not due to the lymphopenic state of the mice used in these experiments. Our results clearly show that CD8⁺ Tm cells neither use TCR-MHC interactions nor ligand independent TCR signaling for their maintenance in the Tm cell pool. Our results are in contrast with Polic *et al.* (27), who have reported a decay of CD8⁺CD44^{hi} Tm cells after TCR ablation. This difference is probably due to the fact that they did not follow the survival of antigen-specific CD8⁺ Tm cells generated following immunization but rather followed the survival of CD8⁺CD44^{hi} T cells which contains naturally occurring Tm cells and activated T cells. Another explanation for the loss of CD8⁺CD44^{hi} memory-like T cells observed by Polic *et al.* (27) is the concomitant loss of the other T cell subsets leading to a lymphopenic environment that might be associated with the loss of a cell type producing a survival factor for CD8⁺CD44^{hi} Tm cells. Our observation that T cell loss, and therefore lymphopenia, leads to a concomitant decrease in the non-T cell compartment supports this possibility. Moreover, unlike CD4⁺ Tm cells which need TCR-MHC interactions to maintain functionality (14, 15), antigen-specific CD8⁺ Tm cells are still competent to produce IFN- γ even after a prolonged maintenance in absence of TCR expression. Therefore, TCR signaling does not contribute to the maintenance of a functional pool of CD8⁺ Tm cells suggesting that cytokine signals alone are sufficient.

A different picture emerges for the survival of CD4⁺ Tm cells. A subset of CD4⁺ Tm cells requires TCR expression for their maintenance in the T cell pool while the other subset of CD4⁺ Tm cells could survive in absence of TCR expression. The subset of CD4⁺ Tm cells that can survive in the T cell pool without TCR expression are probably *bona fide* antigen-specific CD4⁺ Tm cells. Therefore, constitutive TCR signaling does not contribute to the homeostasis of both antigen-specific CD4⁺ and

CD8⁺ Tm cells. On the other hand, we believe that the subset of CD4⁺ Tm cells that needs TCR expression to be maintained in the T cell pool includes CD4⁺ T cells with a memory-like phenotype that develop spontaneously in mice in response to self-MHC class II molecules (4, 28, 29). Moreover, it was shown that the spontaneously arising CD4⁺ memory-like T cell subset needs TCR-MHC interaction to undergo rapid homeostatic proliferation in lymphopenic host (2). This is in agreement with our observation that some CD4⁺ memory phenotype T cells need TCR expression to rapidly divide in lymphopenic hosts suggesting that these cells are lost in our model due to a lack of interaction with MHC class II molecules rather than a lack of constitutive TCR signaling. We believe that the ablation of TCR expression, and probably of MHC interaction, is the direct event that leads to the loss of this subset of CD4⁺ Tm cells since they express normally CD127 in absence of TCR expression. Furthermore, the abrogation of TCR expression did not influence expression of Bcl-2 and Glut1 which are downstream targets of IL-7 receptor signaling. Moreover, it was shown that the survival of human central CD4⁺ Tm cells was dependent on the down regulation of the proapoptotic molecule Bim via TCR and cytokine signaling (30) but we did not observe any up-regulation of Bim expression following TCR ablation. This suggests that the loss of TCR signals in presence of homeostatic cytokine is not sufficient to induce Bim expression in CD4⁺ Tm cells or that there is a differential regulation of Bim in mouse and human T cells.

It is unlikely that a very low residual expression of the TCR, undetectable by FACS, would contribute to the survival of Tm cells after tet treatment. This very low residual expression of the TCR would only be able to transmit a very low grade TCR signals. If this was the case, these Tm cells should not be able to compete with Tm cells expressing normal level of the TCR that receive stronger TCR signals.

Our results also highlight a very important issue when studying Tm cell homeostasis. In our initial experiments with LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice, we thought that all CD4⁺ Tm cells needed TCR expression to survive in the T cell pool. Further experiments clearly showed that the loss of all CD4⁺ Tm cells was due to the concomitant perturbation of secondary lymphoid organ homeostasis in these mice. This suggests that the disappearance of the other cellular subsets constituting secondary lymphoid organs

affects the availability of CD4⁺ Tm cell survival factor(s). For example, the small size of LNs might reduce the availability of IL-7 and IL-15.

In conclusion, antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ Tm cells do not use constitutive TCR signaling for their maintenance in the T cell pool. Future work is necessary to address how naive and memory T cells can be maintained in different niches although they compete for the same survival factors, IL-7 and IL-15.

MATERIALS AND METHODS

Mice. B6.SJL and C57BL/6 mice were bred under specific pathogen free conditions. V β 5LTAO mice expressing a tet-inducible TCR specific for the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide in the context of K^b (OT-1 TCR) (17) were bred to C α deficient mice (V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$). LTAO mice expressing an OT-1 TCR α chain inducible by tet were used on a C α -sufficient background (LTAOC $\alpha^{+/-}$) (17) Mouse experiments were approved by the animal care committee of the Maisonneuve-Rosemont Research Center. To stop TCR expression, tet 400 μ g/ml or 1 mg/ml (Sigma) was administered in the drinking water supplemented with 2% sucrose.

Abs and cell surface staining. The following Abs were used: anti-CD4 (L3/T4 or CT-CD4), anti-CD62L (MEL-14), anti-V α 2 (B20.1), anti-IFN- γ (clone XMG1.2), anti-CD8 α (53-6.7), anti-CD45RB (C363.16A), anti-CD3 (145-2C11), anti-CD44 (IM7), anti-Ly6C (AL-21), anti-CD45.2 (104), and anti-CD127 (A7R34). Abs and streptavidins were from Caltag, Cedarlane Laboratories, BD Biosciences or eBioscience. To detect Glut1 expression we use a polyclonal Ab directed against the extracellular portion (Santa Cruz Biotechnology Inc). Stainings were performed as described previously (31).

Generation of BM derived DCs. DCs were obtained by culturing BM cells during 7 days with GM-CSF and IL-4 as described previously (31). To induce DC maturation, LPS (1 μ g/ml, Sigma) was added on day 6. On day 7, cells were pulsed for 4 hours with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (2 μ g/ml).

Adoptive transfer and immunization. 10⁶ LN cells from female V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ (CD45.2⁺) mouse were injected i.v. in female B6.SJL (CD45.1⁺) hosts. Recipients were immunized 2 days later by i.v. injection of 5 X 10⁵ male C57BL/6 mature DCs pulsed or not with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (2 μ g/ml) (31). At different time after immunization, brachial or inguinal LNs were removed surgically (17) and sequentially to follow T cell response in the same mouse.

In vitro CD8⁺ Tm cell generation and adoptive transfer. CD8⁺ Tm cells were generated as described (19). Briefly, splenocytes from V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice were stimulated for 16 hours with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (10 μ g/ml) in complete RPMI. Cells

were washed to remove peptides and cultured for another 24 hours. Non-adherent cells were transferred to a new flask and cultured for 24 hours. Viable cells were recovered using Ficoll and cultured with human rIL-15 (20 ng/ml, R&D Systems) for 6 days. The medium containing IL-15 was changed every two days. 3×10^6 *in vitro* generated Tm cells were transferred into B6.SJL (CD45.1⁺) hosts. The number of OVA-specific CD8⁺ Tm cells (CD45.2⁺) was evaluated in the same mouse by sequential surgical removal of brachial or inguinal LNs. One week before sacrifice, mice were injected i.p. with 0.8 mg/ml of BrdU and treated for a week with 1mg/mL BrdU in the drinking water. BrdU staining was performed as previously described (17).

IFN- γ production. Splenocytes were stimulated with PMA and ionomycin for 4 hours. Brefeldin A (Sigma) was added for the last 2h. Cells were fixed and stained as described (31)

Bcl-2 and Bim expression. Bcl-2 staining was performed after saponin permeabilization as described previously (32). Intracellular detection of Bim was done using a monoclonal anti-Bim Ab (14A8; Alexis Biochemicals) after fixation in 2% formaldehyde followed by methanol (90%) permeabilization.

Homeostatic proliferation of CD4⁺ Tm cells in lymphopenic hosts. CD4⁺CD44^{hi}CD25⁻NK1.1⁻ memory-phenotype T cells from LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice were sorted and labeled with CFSE as described (2). 2×10^5 CD4⁺ Tm cells (CD45.2⁺) were injected i.v. into sublethally irradiated (600 rads) congenic B6.SJL mice (CD45.1⁺). Five days later, spleens were collected to measure homeostatic proliferation and T cell recovery.

Statistical Analysis. Statistics were done using a Student's t test.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank N. Henley for FACS technical assistance; L. Sabbagh and T. Watts for sharing the protocol for *in vitro* Tm cell generation and Bim staining. We acknowledge the critical review of the manuscript by C. Perreault, S. Lesage, S. Fournier and E. B. Affar. This work was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to N.L. The FACS facility was supported by a multi-user maintenance grant of the CIHR. N.L. was supported by a New Investigator award of the

CIHR and is currently supported by a Senior Scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec. J. L. is the recipient of a studentship from the Department of Microbiology and Immunology of the University of Montreal.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.L. and M.P.H. contributed equally to this work; J.L., M.P.H. and N.L. designed research; J.L., M.P.H., M.C. and J.R. performed research; J.L., M.P.H. and N.L. analyzed data; N.L. wrote the paper.

1. Ma, A., Koka, R., & Burkett, P. (2006) *Annual review of immunology* **24**, 657-679.
2. Purton, J. F., Tan, J. T., Rubinstein, M. P., Kim, D. M., Sprent, J., & Surh, C. D. (2007) *The Journal of experimental medicine* **204**, 951-961.
3. Sprent, J., Cho, J. H., Boyman, O., & Surh, C. D. (2008) *Immunol Cell Biol* **86**, 312-319.
4. Surh, C. D., Boyman, O., Purton, J. F., & Sprent, J. (2006) *Immunological reviews* **211**, 154-163.
5. Garcia, S., DiSanto, J., & Stockinger, B. (1999) *Immunity* **11**, 163-171.
6. Swain, S. L., Hu, H., & Huston, G. (1999) *Science (New York, N.Y)* **286**, 1381-1383.
7. Murali-Krishna, K., Lau, L. L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., & Ahmed, R. (1999) *Science (New York, N.Y)* **286**, 1377-1381.
8. Gray, D. & Matzinger, P. (1991) *The Journal of experimental medicine* **174**, 969-974.
9. Andersen, P., Andersen, A. B., Sorensen, A. L., & Nagai, S. (1995) *J Immunol* **154**, 3359-3372.
10. Ochsenbein, A. F., Karrer, U., Klenerman, P., Althage, A., Ciurea, A., Shen, H., Miller, J. F., Whitton, J. L., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 9293-9298.
11. Oehen, S., Waldner, H., Kundig, T. M., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1992) *The Journal of experimental medicine* **176**, 1273-1281.
12. Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Perarnau, B., Freitas, A. A., & Rocha, B. (1997) *Science (New York, N.Y)* **276**, 2057-2062.
13. Markiewicz, M. A., Girao, C., Opferman, J. T., Sun, J., Hu, Q., Agulnik, A. A., Bishop, C. E., Thompson, C. B., & Ashton-Rickardt, P. G. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3065-3070.
14. Kassiotis, G., Garcia, S., Simpson, E., & Stockinger, B. (2002) *Nature immunology* **3**, 244-250.

15. De Riva, A., Bourgeois, C., Kassiotis, G., & Stockinger, B. (2007) *J Immunol* **178**, 5488-5495.
16. Seddon, B., Tomlinson, P., & Zamoyska, R. (2003) *Nature immunology* **4**, 680-686.
17. Labrecque, N., Whitfield, L. S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C., & Mathis, D. (2001) *Immunity* **15**, 71-82.
18. Williams, M. A. & Bevan, M. J. (2007) *Annual review of immunology* **25**, 171-192.
19. Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M. A., Hieshima, K., Springer, T. A., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J., *et al.* (2001) *The Journal of clinical investigation* **108**, 871-878.
20. Dutton, R. W., Bradley, L. M., & Swain, S. L. (1998) *Annual review of immunology* **16**, 201-223.
21. Blander, J. M., Sant'Angelo, D. B., Metz, D., Kim, S. W., Flavell, R. A., Bottomly, K., & Janeway, C. A., Jr. (2003) *J Immunol* **170**, 2940-2948.
22. Rathmell, J. C., Farkash, E. A., Gao, W., & Thompson, C. B. (2001) *J Immunol* **167**, 6869-6876.
23. Kondrack, R. M., Harbertson, J., Tan, J. T., McBreen, M. E., Surh, C. D., & Bradley, L. M. (2003) *The Journal of experimental medicine* **198**, 1797-1806.
24. Wofford, J. A., Wieman, H. L., Jacobs, S. R., Zhao, Y., & Rathmell, J. C. (2007) *Blood* **111**, 2101-2111.
25. Barata, J. T., Silva, A., Brandao, J. G., Nadler, L. M., Cardoso, A. A., & Boussiotis, V. A. (2004) *The Journal of experimental medicine* **200**, 659-669.
26. Robertson, J. M., MacLeod, M., Marsden, V. S., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2006) *Immunological reviews* **211**, 49-57.
27. Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A., & Rajewsky, K. (2001) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 8744-8749.
28. Dobber, R., Hertogh-Huijbregts, A., Rozing, J., Bottomly, K., & Nagelkerken, L. (1992) *Developmental immunology* **2**, 141-150.
29. Vos, Q., Jones, L. A., & Kruisbeek, A. M. (1992) *J Immunol* **149**, 1204-1210.
30. Riou, C., Yassine-Diab, B., Van grevenynghe, J., Somogyi, R., Greller, L. D., Gagnon, D., Gimmig, S., Wilkinson, P., Shi, Y., Cameron, M. J., *et al.* (2007) *The Journal of experimental medicine* **204**, 79-91.
31. Lacombe, M. H., Hardy, M. P., Rooney, J., & Labrecque, N. (2005) *J Immunol* **175**, 4400-4407.
32. Ostiguy, V., Allard, E. L., Marquis, M., Leignadier, J., & Labrecque, N. (2007) *Journal of leukocyte biology* **82**, 645-656.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. TCR expression is not required for the survival of OVA specific CD8⁺ Tm cells. (A) Survival of OVA-specific CD8⁺ Tm cells. 40 days after immunization, a LN was collected surgically to evaluate the number of OVA-specific CD8⁺ Tm cells (left panels). The same mouse was then treated or not with tet (400 µg/ml) to stop TCR expression and the survival of Tm cells was evaluated over time by removal of superficial LNs by surgery. Percentages and numbers of OVA-specific Tm cells (CD8⁺CD45.2⁺) present in one LN are indicated. Upper panels, survival of Vβ5LTAOCα^{-/-} CD8⁺ Tm cells in absence of tet treatment and lower panels, maintenance of Tm cells in the absence of TCR expression (tet-treated). The histogram in the lower right corner of dot plots shows Ly6C expression by OVA-specific CD8⁺ Tm cells. (B and C) Long-term maintenance of functional OVA-specific CD8⁺ Tm cells in absence of TCR expression. (B) Percentages and numbers of OVA specific CD8⁺ Tm cells (CD8⁺CD45.2⁺) in mesenteric LNs (MLN) and spleen 190 days after immunization are shown. (C) Splenocytes (190 days after immunization) were stimulated for 4h *in vitro* with PMA and ionomycin followed by intracellular IFN-γ staining. Histograms show IFN-γ production by OVA-specific Tm cells (CD8⁺CD45.2⁺) and endogenous T cells (CD8⁺CD45.2⁻) in absence (bottom) or presence (589) of TCR expression.

Fig. 2. TCR expression is not required for the survival and self-renewal of *in vitro* generated OVA-specific CD8⁺ Tm cells. (A) Ablation of TCR expression on OVA-specific CD8⁺ Tm cells. The dot plot shows the population of transferred OVA-specific Tm cells (CD8⁺CD45.2⁺). The histogram shows TCR expression, detected with an anti-TCRVα2 Ab, for antigen-specific CD8⁺ Tm cells (CD8⁺CD45.2⁺) and endogenous T cells (CD8⁺CD45.2⁻) treated with tet for 50 days. (B and C) Similar *in vivo* survival of OVA-specific CD8⁺ Tm cells lacking or not TCR expression. 3 X 10⁶ *in vitro* generated Vβ5LTAOCα^{-/-} Tm cells (CD8⁺CD45.2⁺) were adoptively transferred into B6.SJL recipients (CD45.1⁺). A LN was removed by surgery at day 5, 13, 47 and 75 to quantify the number of OVA-specific CD8⁺ Tm cells (B) expressing (no tet) or not the TCR (tet-treated from day 7 after transfer). At day 140, mice were sacrificed and the number of CD8⁺ Tm cells was evaluated in the MLN (A) and spleen (C). The relative number of OVA-specific CD8⁺ Tm cells is shown in A and was calculated as the number of CD8⁺CD45.2⁺ cells in 10⁶ cells to correct for variation in LN size. For the spleen, the

total number of OVA-specific CD8⁺ Tm cells is shown for the different mice. (D) Self-renewal of OVA-specific CD8⁺ Tm cells is not affected by TCR ablation. Mice were BrdU treated for a week before sacrifice (day 140 post-transfer). The percentage of BrdU positive OVA-specific Tm cells (CD8⁺CD45.2⁺) is shown for mice treated or not with tet.

Fig. 3. TCR expression *per se* is responsible for the loss of a subset of CD4⁺ Tm cells. (A) No reduction of LN cellularity in LTAOCα^{+/-} mice treated with tet. LNs were sequentially removed by surgery to follow cellularity over time of tet-treatment (400 μg/ml). (B and C) Survival of a subset of CD4⁺ Tm cells denuded of TCR when secondary lymphoid organ homeostasis is not impaired. The survival of CD3 negative (B) and CD3 positive (C) CD4⁺ Tm cells (CD44^{hi}) was followed in tet-treated LTAOCα^{+/-} mice. LNs were removed by surgery and the percentage of CD3 negative and positive CD4⁺ Tm cells was followed over time in the same mouse. Day 7 represents the number of CD4⁺ Tm cells expressing a tet-regulatable TCR in LTAOCα^{+/-} mice.

Fig. 4. CD4⁺ Tm cells denuded of TCR molecules express normal level of CD127, Bcl-2, Glut1 and Bim. The overlays show expression of the different molecules by CD4⁺CD44^{hi} Tm cells lacking or not TCR expression. The stainings were done on LTAOCα^{+/-} T cells after 14 days of tet treatment.

Fig. 5. Preferential loss of rapidly dividing CD4⁺ Tm cells lacking TCR expression after transfer into lymphopenic hosts. (A) CFSE profile of LTAOCα^{+/-} CD4⁺ Tm cells 5 days after adoptive transfer into irradiated B6.SJL congenic recipients treated or not with tet. The proliferation of CD4⁺CD44^{hi} Tm cells expressing (left) or not (590) the TCR is shown. (B) Recovery of TCR-positive (NO TET) and TCR-negative (+TET) CD4⁺ Tm cells in the spleen 5 days after adoptive transfer in recipients that were respectively untreated or treated with tet. The results were obtained from a pool of three mice in two independent experiments.

Figure 1

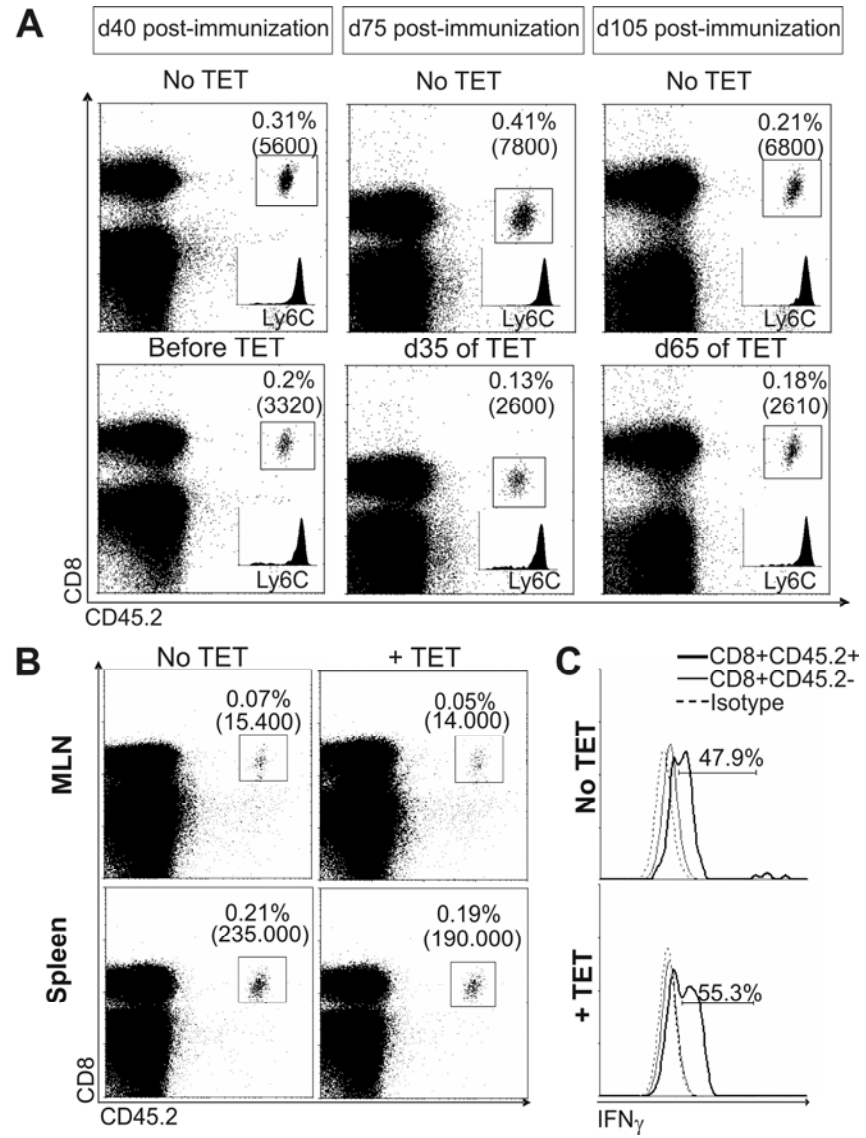


Figure 2

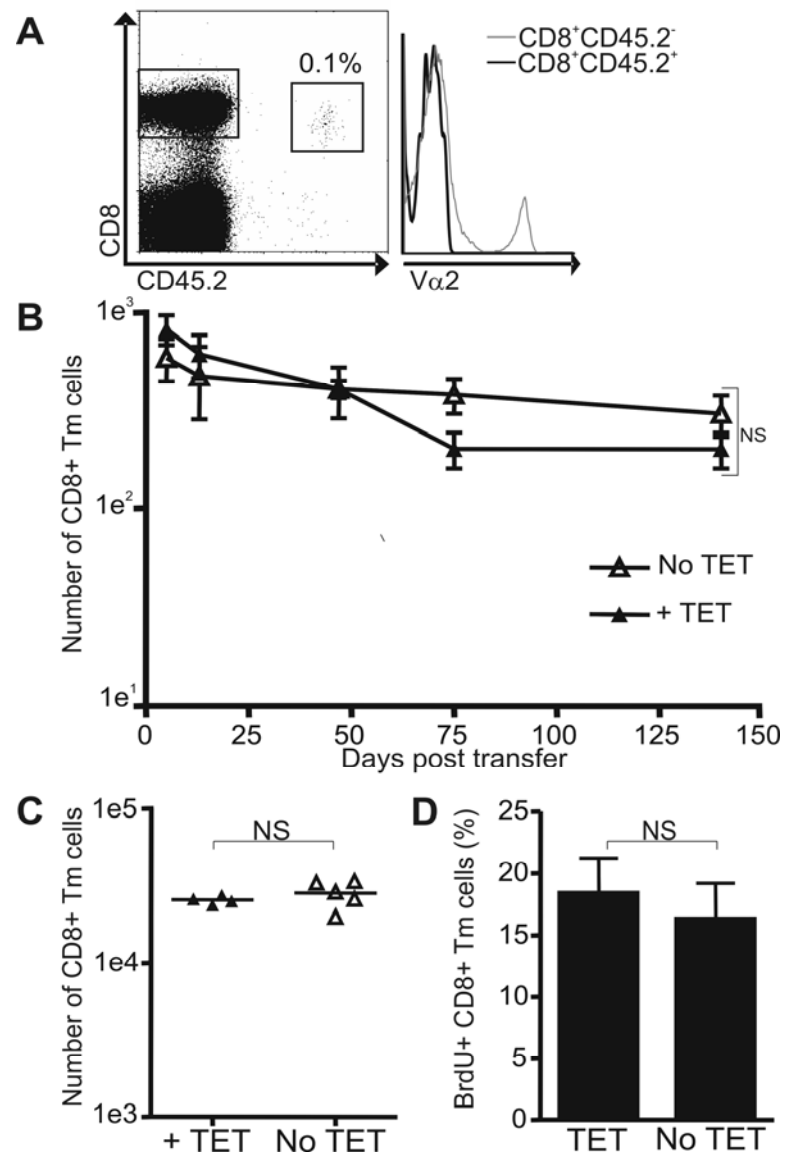


Figure 3

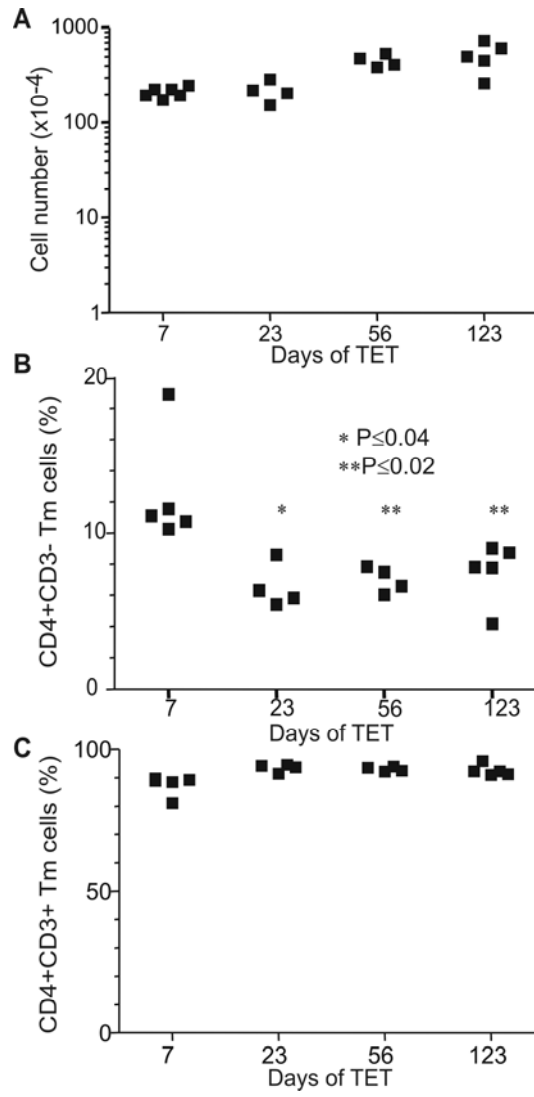


Figure 4

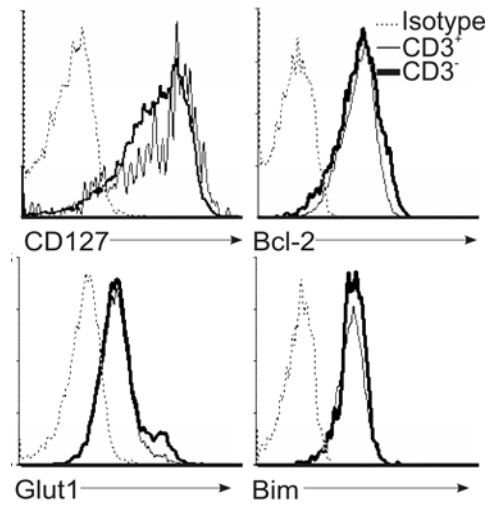
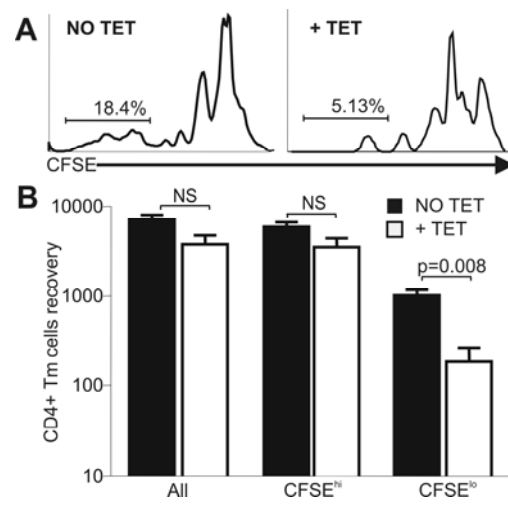


Figure 5



Figures supplémentaires

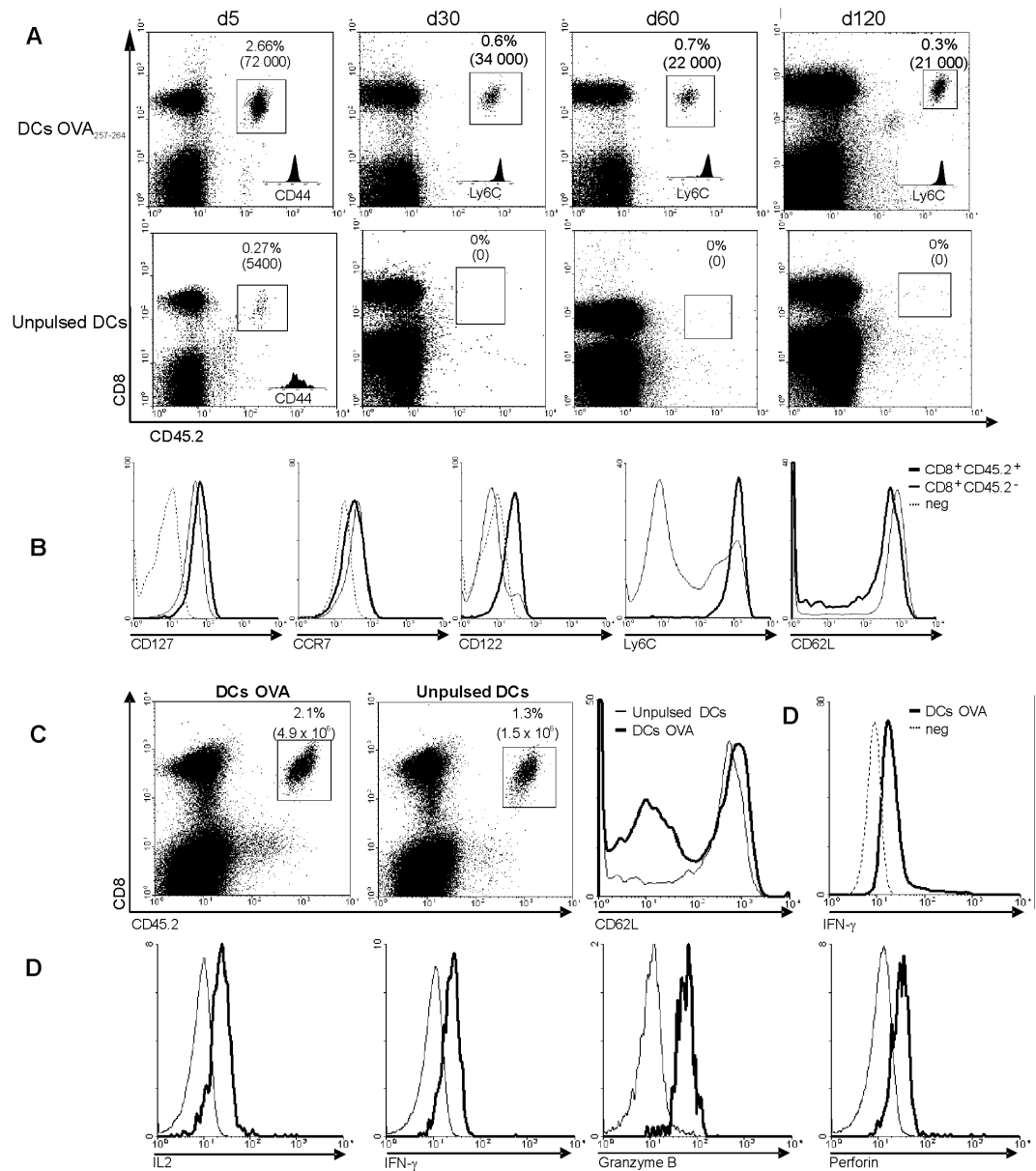


Fig. S1. Generation of functional and long-lived CD8⁺ Vβ5LTAOCα^{-/-} Tm cells after immunization with peptide-pulsed DCs. (A) Tm-cell development occurs only when mice are immunized with OVA₂₅₇₋₂₆₄-pulsed DCs. A total of 10⁶ CD8⁺ (CD45.2⁺) cells from Vβ5LTAOCα^{-/-} mice were transferred into B6.SJL hosts (CD45.1⁺). Two days after transfer, mice were immunized with 5 x 10⁵ mature DCs loaded with 2 μg/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide-pulsed (DCs OVA) or unpulsed DCs. Five, 30, 60, and 120 days after immunization, a LN was collected surgically to follow the response of CD8⁺ T cells over time in the same mouse by staining with anti-CD45.2 and

anti-CD8 Abs. Percentages and total number of OVA-specific CD8⁺ T cells in one LN are indicated in each histogram. The histogram in the lower right corner of each dot plot shows the expression of CD44 by effector T cells (d5) and the expression of Ly6C by Tm cells (d30, d60, and d120). The profile of CD44 and Ly6C was obtained after gating on CD8⁺CD45.2⁺ cells. (B) Phenotype of OVA-specific CD8⁺ Tm cells. V β 5LTAOC α ^{-/-} CD8⁺ Tm cells generated as described in A were stained with anti-CD127 (IL-7R α), anti-CD122 (IL-2R β), anti-CD62L, and anti-Ly6C Abs or with CCL19-Fc fusion protein to detect CCR7 expression. (C) Recall response of V β 5LTAOC α ^{-/-} CD8⁺ Tm cells. CD8⁺ Tm cells were restimulated in vivo by i.v. injection of 5x10⁵ DCs-OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide-pulsed or unpulsed DCs. Three days later, splenocytes were stained with anti-CD45.2, anti-CD8, and anti-CD62L Abs to measure the expansion and activation of OVA-specific T cells. (D) Functionality of V β 5LTAOC α ^{-/-} CD8⁺ Tm cells. IFN- α production by V β 5LTAOC α ^{-/-} CD8⁺ Tm cells was assessed by restimulating splenocytes in vitro for 6 h with 1 μ g/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide, followed by staining with anti-IFN- α , anti-CD8, and anti-CD45.2 Abs. (E) Acquisition of effector functions by V β 5LTAOC α ^{-/-} CD8⁺ Tm cells after rechallenge in vivo. Intracellular IL-2, IFN- α , granzyme, and perforin were detected after 6 h of in vitro stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate plus ionomycin.

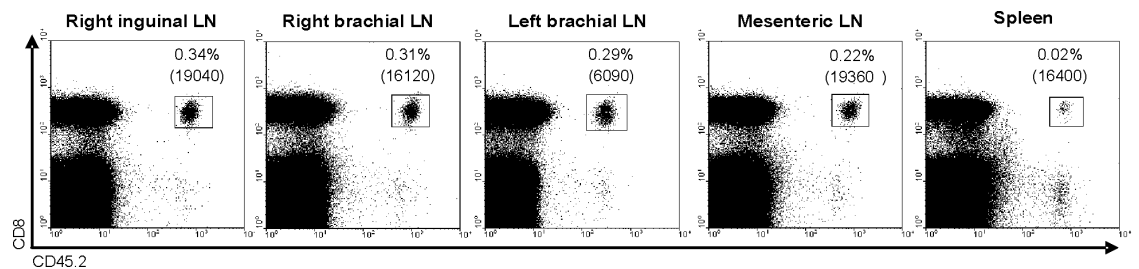


Fig. S2. Tm lymphocytes are present in equivalent numbers in the different LNs. The presence of Tm lymphocytes (CD8⁺CD45.2⁺) in the different LNs of one mouse was evaluated 30 days after immunization with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide-pulsed DCs (from a B6.SJL male mouse). Percentages of responsive CD8⁺ T cells to OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide in one lymphoid organ are indicated. The numbers in parenthesis correspond to the total number of V β 5LTAOC α ^{-/-} CD8⁺ T cells in one LN or spleen.

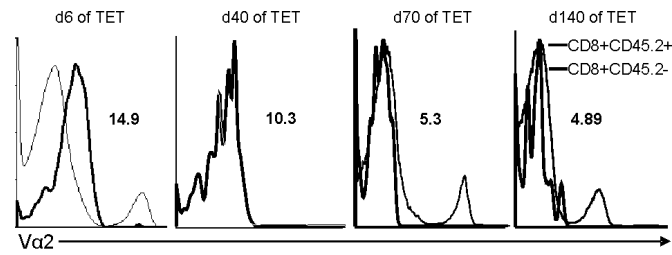


Fig. S3. Complete and sustained ablation of TCR expression following tet treatment of $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$ $CD8^{+}$ Tm cells. $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$ $CD8^{+}$ Tm cells ($CD45.2^{+}$) were adoptively transferred into congenic B6.SJL mice ($CD45.2^{-}$), followed by tet administration. LN cells were stained with anti-CD8, anti-CD45.2, and anti-TCRV $\alpha 2$ Abs. The histogram overlays show TCRV $\alpha 2$ expression by $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$ Tm cells ($CD8^{+}CD45.2^{+}$, thick line) and by endogenous B6.SJL $CD8^{+}$ T cells ($CD8^{+}CD45.2^{-}$, thin line) after different days of tet (TET) treatment. A representative histogram is shown for each day of tet treatment.

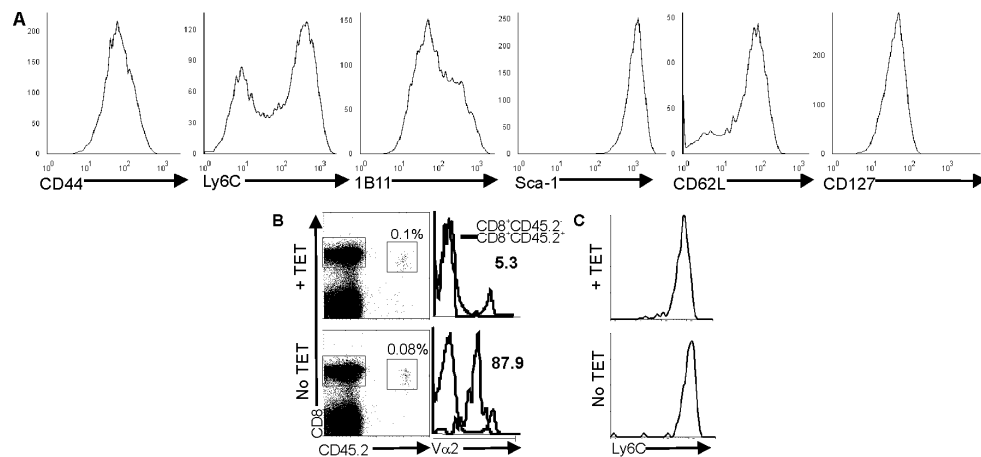


Fig. S4. Phenotype of the in vitro-generated OVA-specific $CD8^{+}$ Tm lymphocytes before and after adoptive transfer. (A) In vitro-generated OVA-specific Tm cells have a central memory phenotype ($CD44^{hi}$, $Ly6C^{hi}$, $1B11^{low}$, $Sca-1^{hi}$, $CD62L^{hi}$, and $CD127^{hi}$). At the end of the culture, cells were stained with anti-CD44, anti-Ly6C, 1B11, anti-Sca-1, anti-CD62L, and anti-CD127 Abs. (B) Representative FACS profile of $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$ $CD8^{+}$ Tm cells after adoptive transfer in naïve B6.SJL hosts. The left dot plots show the population of transferred OVA-specific Tm cells ($CD8^{+}CD45.2^{+}$), the middle histograms show TCR expression gated on $CD8^{+}CD45.2^{+}$ cells as detected with an anti-TCR V $\alpha 2$ Ab, and the right histograms confirm the memory phenotype ($Ly6C^{hi}$) of the transferred T cells. The top panels show the profiles for recipients that were treated with tet (TET; 1 mg/ml in the drinking water), whereas

the bottom panels show the profiles for untreated mice. The mean fluorescence intensity of V α 2 expression is indicated on each histogram.

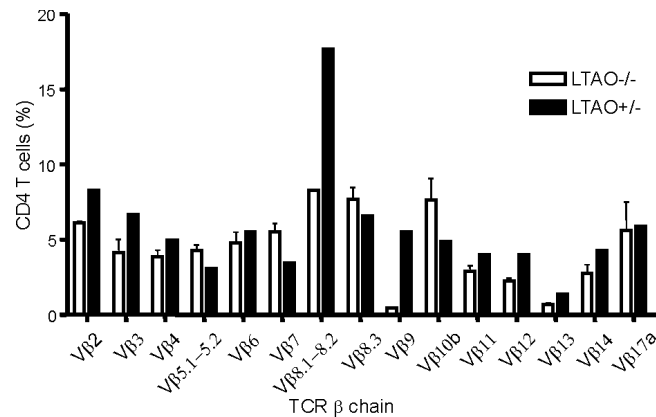


Fig. S5. Expression of a polyclonal repertoire of TCR by CD4⁺ LTAO T cells. CD4⁺ T cells from LTAOC α ^{-/-} mice (LTAO^{-/-}) and from LTAOC α ^{+/-} mice (LTAO^{+/-}) were stained with a panel of anti-TCR V β antibodies. The percentage of V β ⁺ cells within the CD4⁺ fraction is shown.

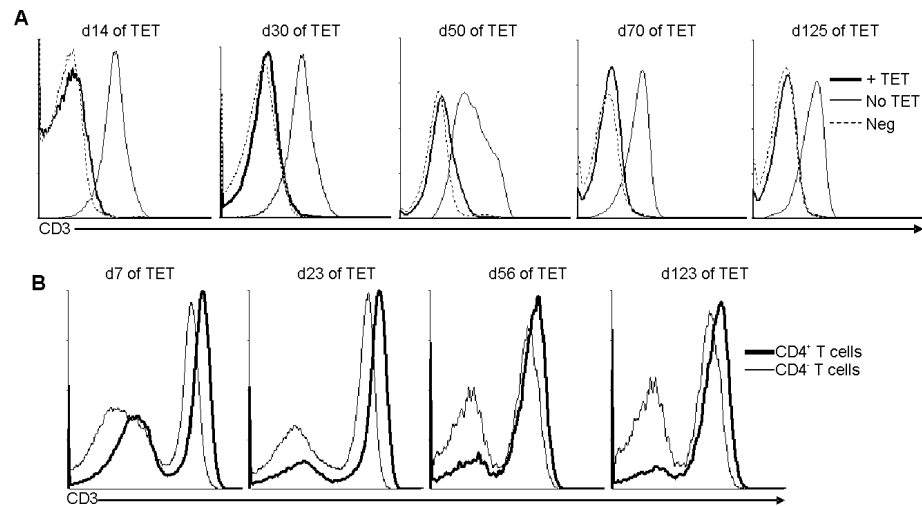


Fig. S6. Complete and sustained ablation of TCR expression on LTAO CD4⁺ T cells by tet (TET) administration. (A) Abrogation of TCR expression by LTAOC α ^{-/-} CD4⁺ T cells. LN cells from untreated LTAOC α ^{-/-} mice and tet-treated LTAOC α ^{-/-} mice were stained with anti-CD4 and anti-CD3 Abs. The histograms show CD3 expression by untreated LTAOC α ^{-/-} (No TET) and tet-treated LTAOC α ^{-/-} (+TET) CD4⁺ T cells. The staining of B cells from the same mouse and same sample is shown as a negative control for CD3 expression level. CD3 expression is shown after different days of tet treatment. A representative histogram is shown for each day of tet treatment. (B) Ablation of TCR expression by a subset of LTAOC α ^{+/-} CD4⁺ T cells after tet

treatment. The overlays show CD3 expression by CD4⁺ T cells (thick line) and by CD4⁻ cells (thin line) from the same mouse and same staining. Note that the non-CD4 population is a mixture of B cells (CD3⁻) and CD8⁺ T cells (CD3⁺). Importantly, after tet treatment, the CD4⁺CD3⁻ T cells express a comparable level of CD3 as B cells, indicating a complete shutdown of TCR expression.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Durant mon doctorat, je me suis principalement intéressée à l'implication de la force du signal RCT dans le développement de la réponse des LT CD8⁺ et dans le maintien des LTm CD8⁺ au cours du temps. Tel que décrit dans l'introduction de cette thèse, il n'est pas encore connu comment les LTe sont-ils sélectionnés pour devenir ou non des LTm. Grâce à nos modèles d'études, nous apportons une vision du signal RCT dans le choix de différenciation des LT (article n°1 et n°2 de cette thèse) et dans le maintien des LTm (article n°3 de cette thèse).

Dans la première partie de cette discussion, je vais émettre différentes hypothèses à partir des résultats obtenus dans les articles n°1 et 2 de cette thèse afin pour comprendre comment la signalisation du RCT est impliquée dans le développement des LTm. Pour se faire, les articles n°1 et n°2 de cette thèse seront étudiés pour la plupart des hypothèses en même temps.

Dans une seconde partie de cette discussion, je vais mettre en perspective les résultats obtenus dans l'article n°3 de cette thèse qui traite du maintien des LTm. La question qui reste toujours en suspend sur la survie des LTm est de savoir comment les LTn et les LTm peuvent partager les mêmes cytokines pour survivre?

I. La force et la qualité du signal RCT

Dans l'article n°2 « *Epitope density controls CD8+ T cell differentiation* » nous avons mis en évidence l'importance de déclencher un signal optimal du RCT, avec une avidité optimale lors de la reconnaissance de l'antigène pour favoriser la formation de la mémoire immunologique. Cependant, comme décrit dans l'article n°1 « *Lowering RCT expression on naive CD8+ T cells affect T cell expansion but not memory generation* » le nombre de molécules de RCT exprimées à la surface des LTn est important pour la phase d'expansion des LTe (**Figure 1** de l'article n°1) ce qui suggère que la force du signal RCT influence la phase d'expansion. De plus, des travaux effectués en 2009 *in vivo* essayent de comprendre l'importance du signal RCT pour la génération des LTm en utilisant : (i) des peptides altérés affectant à la fois l'affinité et l'avidité du RCT pour son ligand (408) ou (ii) des LT dont la chaîne β du RCT est affectée résultant à la

perturbation de la signalisation RCT (345). Ces études mettent en évidence respectivement l'importance de l'affinité du RCT sur l'amplitude et la durée de la phase d'expansion (408) et la présence d'une voie de signalisation du RCT impliqué dans la génération des LTm (345). Dans le laboratoire, nous avons étudié l'influence de l'avidité du RCT sur la formation des LTm sans affecter l'affinité et la signalisation du RCT. Dans un premier temps, nous avons démontré dans l'article n°1 de cette thèse, que la quantité de RCT exprimé influence l'amplitude de la réponse des LT CD8⁺ sans affecter l'acquisition des fonctions effectrices et la génération des LTm CD8⁺. Dans un second temps, nous avons montré, dans l'article n°2 de cette thèse, qu'une différence de 2 fois du niveau de la quantité de complexes CMH/peptide exprimés à la surface des CPAs entraîne une différence de 10 fois au niveau du nombre de LTm généré et ceci sans affecter la phase d'expansion, le phénotype et les fonctions effectrices. Ce résultat met en évidence la présence d'un signal spécifique du RCT pour le développement des LTm qui aboutit à l'établissement d'une signature génique spécifique. L'avantage de ce modèle d'étude c'est que nous avons pu comparer des LTe qui ont ou pas la capacité de générer des LTm et donc définir des différences génétiques entre les deux populations des LTe. En effet, nous avons montré que les LTe qui sont capables de former un nombre élevé de LTm différent des LTe qui en génèrent moins par leur profil génétique. Ainsi, ces résultats montrent que la densité d'antigène reconnu par le RCT influence la force du signal RCT qui se traduit entre autres par une variation de l'expression génique au pic de la réponse et par le nombre de LTm généré. Dans la suite de cette discussion, je vais soulever des hypothèses permettant d'expliquer la corrélation entre le signal RCT et la réponse des LT CD8⁺ en tenant compte des résultats dans les articles de cette thèse et de la littérature.

A. Les différents seuils du signal RCT

Ainsi, dans l'article n°1 nous avons montré qu'une diminution de l'avidité du RCT affecte la phase d'expansion, mais pas l'acquisition des fonctions effectrices. Dans l'article n°2 nous montrons qu'une augmentation de l'avidité du RCT n'affecte ni la phase d'expansion ni l'acquisition des fonctions effectrices, mais favorise le développement des LTm. Ainsi dans un cas l'avidité du RCT est affecté suite à une diminution du nombre de RCT exprimé (article n°1 de cette thèse), et dans l'autre cas, l'avidité est affectée en diminuant le nombre d'épitope à la surface de la CPA (article

n°2 de cette thèse). En associant les résultats présentés dans les articles n°1 et n°2 nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe différents seuils d'activation du RCT requis pour l'acquisition des fonctions effectrices, pour la phase d'expansion optimale et pour le développement optimal de la phase mémoire.

Selon les articles n°1 et n°2 de cette thèse, quelque soit la quantité de RCT engagé ou le nombre d'épitope présenté, les fonctions effectrices des LT CD8⁺ sont optimales (**Figure 22A**).

Par contre, d'après l'article n°1, pour assurer une phase d'expansion optimale, il est nécessaire d'un minimum de RCT engagé en même temps sinon le signal RCT n'est pas optimal (**Figure 22B**).

D'après les résultats de l'article n°2 de cette thèse, la phase du développement des LTm serait dépendante de la quantité d'antigène rencontré par chaque RCT. Donc, nous pouvons supposer qu'un RCT peut s'engager avec plusieurs complexes CMH/peptide et que chaque rencontre entraîne une activation du RCT. Ainsi, la sommation des signaux entraîne la mise en place d'une force optimale du signal RCT favorisant le développement des LTm CD8⁺ (**Figure 22 C**).

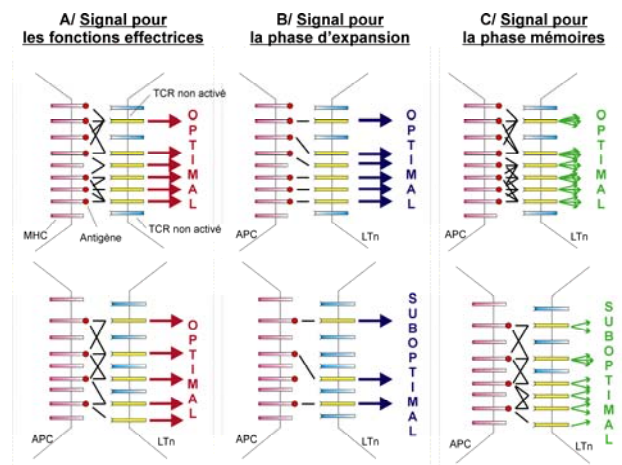


Figure 22: Schématisation des différents seuils du signal RCT.

Les flèches rouges, bleues et vertes représentent respectivement le signal RCT nécessaire pour l'acquisition des fonctions effectrices (A), pour la mise en place d'une phase d'expansion optimale (B), et le signal émit par chaque RCT suite à une rencontre avec un complexe MHC/peptide nécessaire au développement optimal de LTm (C). En haut, le nombre de RCT et le nombre d'épitope sont optimaux. En bas, le nombre de RCT (B) et d'épitope (C) sont suboptimaux. En A, le nombre de RCT et d'épitope ne sont pas des paramètres limitant pour l'acquisition des fonctions effectrices. En B, le nombre de RCT engagé en même temps est un paramètre limitant pour le développement d'une phase d'expansion optimale. En C, le nombre d'épitope reconnu par chaque RCT est un paramètre important pour le développement optimal de LTm CD8⁺.

Cette hypothèse pourrait être vérifiée en activant des LT exprimant un faible niveau de RCT avec DCs présentant un niveau faible de complexe CMH/peptide. Dans ce cas-ci, si l'hypothèse est vraie la formation des LTm devrait être affectée, et inversement si les LT exprimant peu de RCT sont activés avec des DCs très fortement chargés avec l'antigène (**Figure 23**). Dans les deux conditions, les fonctions effectrices ne seraient pas affectées (**Figure 22A**).

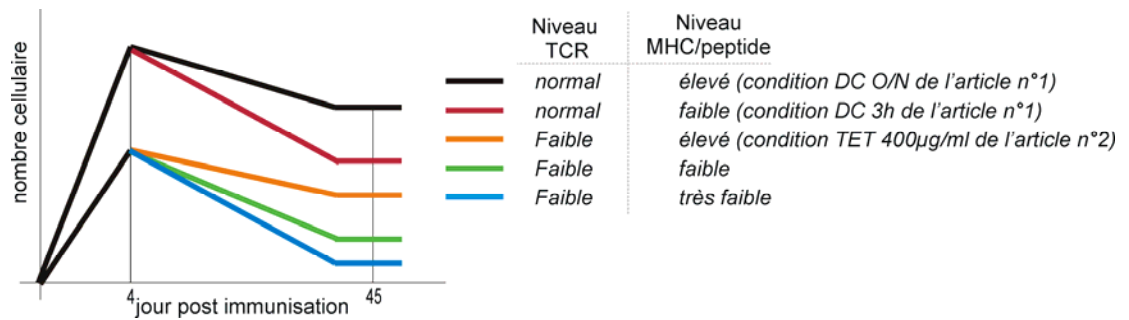


Figure 23: Représentation des résultats hypothétiques attendus.

Représentation des résultats attendus suite à un transfert adoptif de LT CD8⁺ exprimant un niveau ou faible de RCT dans une souris receveuse. Par la suite, la souris receveuse sera immunisée avec des DCs exprimant différents niveaux de complexes CMH/peptide antigéniques (élevés/ faible ou très élevé) spécifiques de la population de LT transférés.

Cependant, dans la condition où le RCT est faiblement exprimé à la surface des LTn (TET 400µg/ml, article n°1 de cette thèse) et dans la situation où les LTn sont stimulés avec des DCs présentant peu d'épitope antigéniques (DC 3H, article n°2 de cette thèse), les LTe obtenus suite à une immunisation ont la capacité de générer des LTm en faible quantité. Ceci signifie qu'un certain pourcentage de LT stimulés dans ces conditions suboptimales (DC 3h ou TET 400µg/ml) a reçu un signal RCT assez suffisant pour pouvoir se différencier en LTm. De plus, d'après les résultats de l'article n°1 et n°2 de cette thèse et ceux de Teixeira et coll. (345), nous pouvons suggérer que la voie de signalisation impliquée dans la génération des LTm est dépendante de l'avidité du RCT. En tenant compte de l'hypothèse des différents seuils du signal RCT, nous pouvons envisager un scénario pour expliquer le développement des LTm dans les conditions suboptimales (DC 3h et TET 400µg/ml) des articles n°1 et n°2.

Pour la condition de l'article n°1 où l'expression du RCT est diminuée (TET 400µg/ml) le scénario envisagé pourrait être le suivant : étant donné que la densité d'épitope est optimale, le faible nombre de RCT exprimé a une capacité optimale de rencontrer plusieurs complexes CMH/peptide. Les rencontres successives pour chacun

des RCT exprimés aboutiront à des activations successives du RCT donnant lieu au déclenchement de la voie de signalisation impliquée dans le développement des LTm (**Figure 24**).

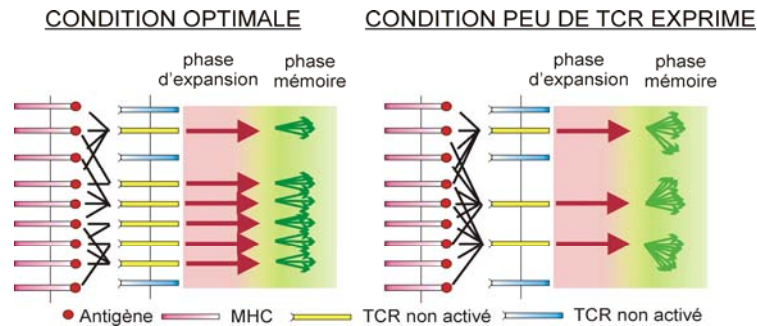


Figure 24: Scénario pour l'article n°1.

Les flèches rouges et vertes représentent respectivement la force du signal RCT nécessaire pour le développement d'une phase d'expansion optimale et le signal du RCT émis par chaque RCT suite à la rencontre d'un complexe CMH/peptide nécessaire pour le développement des LTm. À gauche, représentation de la condition optimale où le nombre de RCT exprimé et le nombre d'épitope présenté par la CPA sont optimaux. À droite, représentation de la condition où le nombre de RCT exprimé est suboptimal, mais où la quantité d'épitope présenté est optimale.

Pour la condition de l'article n°2 où la densité de l'épitope est diminuée (DC 3h), le scénario pourrait être le suivant : étant donné que la quantité d'expression de RCT est optimal et le nombre d'épitope présenté par les DCs suboptimal, le nombre de RCT qui ont la capacité de s'activer en même temps permet d'assurer une phase d'expansion optimale. De plus, la sommation de chaque signal du RCT déclenché suite à l'interaction avec un complexe CMH/peptide permettrait d'assurer l'activation de la voie de signalisation impliquée dans le développement des LTm (**Figure 25**).

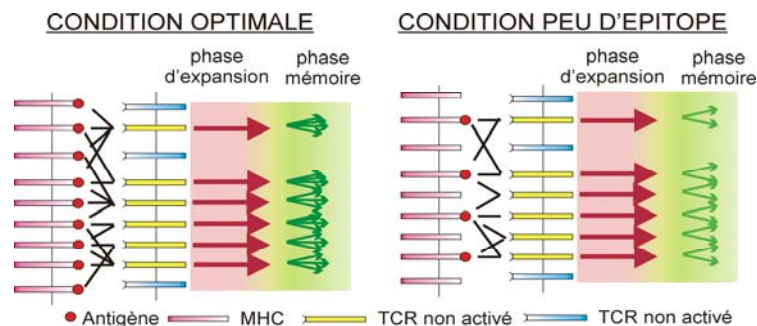


Figure 25: Scénario pour l'article n°2.

Les flèches rouges et vertes représentent respectivement la force du signal RCT nécessaire pour le développement d'une phase d'expansion optimale et le signal du RCT émis par chaque RCT suite à la rencontre d'un complexe CMH/peptide nécessaire pour le développement des LTm. À gauche, représentation de la condition optimale où le nombre de RCT exprimé et le nombre d'épitope présenté par la CPA sont optimaux. À droite, représentation de la condition où le nombre de RCT exprimé est optimal et où la quantité d'épitope présenté est suboptimal.

Ainsi, nous pouvons dire qu'il est nécessaire d'un minimum de RCT engagé en même temps pour assurer une phase d'expansion optimale et d'un minimum de complexe CMH/peptide pour assurer l'activation optimale de la voie de signalisation impliquée dans le développement des LTm.

Cependant, nous pouvons aussi envisager que dans les conditions où le RCT est faiblement exprimé (TET 400µg/m), le nombre de LTm formé est affecté suite à un défaut de recrutement de précurseurs. Cette hypothèse est expliquée dans le paragraphe suivant.

B. Recrutement des précurseurs.

Dans l'article n°1 de cette thèse, nous avons mis en évidence l'existence d'un seuil de stimulation du RCT afin d'assurer une phase d'expansion optimale. En effet, nous avons montré que l'expression de plus de 1019 RCT exprimés à la surface des LTn est requise pour assurer une phase d'expansion équivalant à celle observée par les LT exprimant un niveau normal de RCT. De plus, nous observons que la quantité de LTm générée est proportionnelle aux nombres de LTe obtenus (**Figure 2 B et C** de l'article n°1). Ceci signifie que la quantité de RCT exprimé n'a aucune influence sur la formation des LTm et qu'il n'y a pas de défaut dans la signalisation du RCT pour générer le 5 à 10% théorique de LTm attendu.

De manière intéressante, nos résultats se rapprochent de ceux montrés dans l'étude de Zehn et coll. (408). En effet, dans cette étude les auteurs ont observé une diminution de l'amplitude et de la durée de la phase d'expansion suite à une infection avec un antigène de faible affinité (408). Ce défaut d'expansion n'affecte pas la formation de la phase-mémoire puisque le nombre de LTm généré corrèle avec le nombre de LTe obtenu, ce qui rejoint les résultats obtenus dans la **Figure 2B** de l'article n°1.

Les travaux de Zehn et coll. décrivent un problème de recrutement des LT par les CPAs exprimant un antigène de faible affinité (408), alors que dans notre cas, l'affinité et la quantité d'antigène sont optimales. Toutefois, nous pouvons suggérer dans l'étude de Zehn et coll., que la diminution de l'amplitude de la phase d'expansion lors d'une immunisation avec des antigènes de faible affinité (408) est peut-être associée à un

problème de recrutement du nombre de RCT au niveau de la SI entraînant une diminution de l'avidité du RCT et donc de la force du signal RCT.

Dans notre étude nous pouvons envisager que l'avidité et la force du signal RCT sont affectées lorsque la quantité de RCT exprimé est diminuée (TET 400µg/ml-article n°1 de cette thèse). Ceci donnant lieu à une diminution du nombre de RCT recruté au niveau de la SI, ce qui expliquerait la diminution de l'amplitude de la phase d'expansion.

De plus, du fait que dans la quantité de RCT exprimé par les LT suite à un traitement de 400µg/ml de tétracycline, varie entre 1665 et 617 RCT (moyenne de 1019 RCT – **Figure n°1** de l'article n°1) dans la condition où la phase d'expansion est affectée (TET 400µg/ml), nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il y a *un défaut de recrutement des LT qui expriment très peu de RCT à leur surface (inférieur à 1019 RCT)*. En effet, nous pouvons supposer que les cellules T qui expriment au-delà de 1019 RCT, ont la capacité de déclencher un signal RCT suffisant pour favoriser le développement des LTm CD8⁺, versus les LT qui expriment moins de 1019 RCT. Cette suggestion expliquerait la présence de LTm dans la condition où le nombre de RCT exprimé est faible (400µg/ml de TET). Pour vérifier cette hypothèse, suite à un traitement à la tétracycline à 400µg/ml, il faudrait trier les LT CD8⁺ qui expriment plus de 1019 RCT versus ceux qui expriment moins de 1019 RCT avant de les transferts dans une souris receveuse. Dans le cas où notre hypothèse est juste, le résultat attendu serait que seuls les LT exprimant au-delà de 1019 RCT à leur surface pourraient développer des LTm.

C. La reconnaissance du complexe CMH/peptide du soi.

Dans l'article n°1 de cette thèse, nous avons observé qu'une diminution du nombre de RCT exprimé affecte l'amplitude de la réponse des LT CD8⁺ à une immunisation avec des DCs. Comme suggéré dans l'hypothèse précédente, ce défaut dans l'amplitude de la réponse des LT CD8⁺ peut être associé à un problème dans le recrutement du RCT à la SI.

Au niveau de la SI, il a été montré pour, des LT CD4⁺, que la sensibilité du RCT est dépendante de l'interaction du corécepteur CD4 avec un complexe CMH/peptide endogène. En effet, l'équipe de Davis a mis en évidence un recrutement substantiel de

complexe CMH/peptide endogène à l'aire de contact entre la CPA et le LT suite à de faibles interactions avec le RCT (591, 592). Ces faibles interactions entre le RCT et le complexe CMH/peptide endogène ont été montré comme pouvant initier l'activation de la cellule T (591). Ces données ont permis la proposition du modèle de pseudo-dimérisation (591, 593). À partir des expériences réalisées par Li et coll. sur le rôle du corécepteur CD4 au niveau de la SI (594), il a été proposé que l'interaction entre le RCT (RCT1) et un complexe CMH/peptide agoniste crée un environnement d'activation assez stable pour permettre le recrutement d'un autre RCT (RCT2). Ce second RCT (RCT2) pourra interagir avec un complexe CMH/peptide endogène qui jouera le rôle d'un co-agoniste dans cette situation. Ainsi, le pseudodimère formé, RCT1/agoniste/RCT2/endogène/CD4, entraînera une cascade de signalisation induisant le recrutement de Lck apporté par le corécepteur CD4 (593, 594). Le corécepteur CD4 stabilise le complexe pseudodimère (593) (**Figure 26**). De plus, Stefanova et coll. a montré que des LT CD4⁺ transférés pendant 36h dans un hôte déficient pour la molécule CMH de classe II montrent un défaut dans la sensibilité à l'antigène suite à un contact de LT CD4⁺ transgénique avec un antigène *in vitro* (595). Ces données suggèrent que lors de la sélection positive, les thymocytes sont sélectionnés pour leur répertoire de RCT pour reconnaître un complexe CMH/peptide du non-soi, mais aussi pour leur capacité à reconnaître un complexe CMH/peptide endogène afin d'augmenter la sensibilité pour achever la sensibilité maximale du RCT (595).

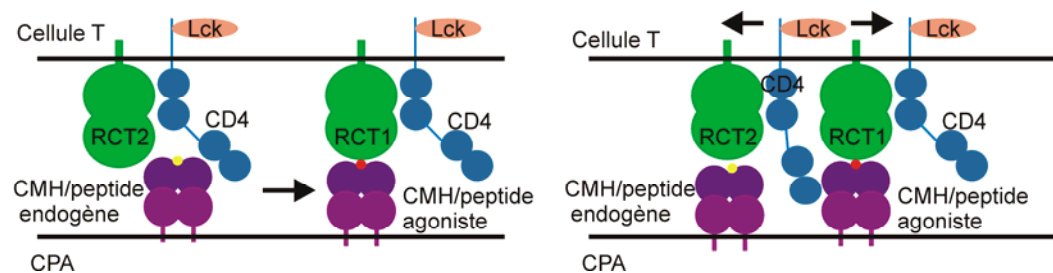


Figure 26: Représentation du modèle pseudodimère du RCT

Représentation de la condition où la sensibilité du RCT1 est augmentée par l'intervention d'un RCT2 qui reconnaît un complexe CMH/peptide endogène. Ainsi le complexe RCT1/CMH/peptide agoniste/RCT2/CMH peptide endogène/CD4 est généré pour favoriser la signalisation du RCT1.

Ainsi, d'après les données écrites ci-dessus et les résultats obtenus dans le papier n°1 de cette thèse, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une diminution de l'expression du RCT entraîne une diminution de l'interaction du RCT avec les complexes CMH/peptide endogènes et donc une diminution de la sensibilité du RCT. Pour vérifier

cette hypothèse, il faudrait transférer les LT spécifiques d'un antigène dans une souris déficiente pour la molécule CMH de classe I. Par la suite, la souris receveuse sera immunisée avec des DCs n'exprimant pas de molécules CMH de classe I, mais présentant de manière constitutive à leur surface le peptide antigénique spécifique des LT transférés. Ainsi, il nous sera possible de savoir si l'amplitude de la réponse des LT CD8⁺ est affectée comme dans la situation où les LT CD8⁺ expriment peu de RCT.

II. Cinétique de la réponse des LT CD8⁺

Dans les résultats de l'article n°1 de cette thèse, nous mettons en évidence un défaut dans l'amplitude de la réponse des LT CD8⁺ exprimant peu de RCT (1019 RCT) suite à une immunisation avec des DCs. Je vais donc émettre des hypothèses pour expliquer pourquoi l'amplitude de la réponse est affectée.

A. Déplacement du pic de la réponse

Selon l'hypothèse sur un défaut dans le recrutement des LT exprimant un faible nombre de RCT, le pourcentage réel de LT ayant la capacité de répondre à l'immunisation est donc inférieur au nombre de LT initialement transférés. Ceci pourrait donner lieu à un déplacement du pic de la réponse. En effet, il a été montré que plus le nombre de précurseurs est faible plus le pic de la réponse CD8⁺ est retardé dans le temps (596). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que *les LT exprimant peu de RCT atteignent plus tardivement le pic de la réponse par rapport aux LT exprimant un niveau normal de RCT*. Pour vérifier ceci, il faudrait réaliser une cinétique de la réponse. Nous pouvons spéculer qu'effectivement le pic de la réponse est déplacé dans le temps si seulement ceux sont les LT exprimant au delà de 1019 RCT qui répondent efficacement à l'immunisation.

Par ailleurs, si les LT exprimant un faible nombre de RCT ont la capacité d'atteindre plus tardivement une amplitude de la réponse équivalant aux LT exprimant un nombre normal de RCT, ceci mettrait en évidence une mort cellulaire massive lors de la phase de contraction puisque le nombre de LTm obtenu est significativement inférieur à celui obtenu dans la condition normale (TET 0µg/ml) et **Figure 27**). Pour étudier l'importance de la mort cellulaire dans ce cas-ci, il faudrait dans un premier temps regarder toutes les molécules anti-apoptotiques et pro-apoptotiques par cytométrie en

flux enfin d'observer si une différence d'expression du RCT lors de la reconnaissance de l'antigène peut affecter ou favoriser l'expression de ces molécules.

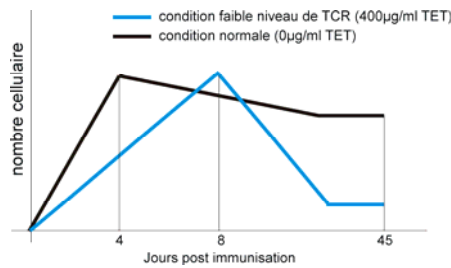


Figure 27: hypothèse sur la durée de la phase d'expansion

Spéculation de la cinétique de la réponse de LT CD8⁺ exprimant un niveau normal de RCT (ligne noire) ou faible nombre de RCT (ligne bleue) suite à une immunisation avec des DC chargées avec l'antigène spécifique des LT CD8⁺.

Dans le cas où la cinétique est identique (soit jour 4 post immunisation) il aurait été intéressant d'évaluer si le défaut observé dans l'amplitude de la phase d'expansion est un problème de prolifération. Pour vérifier ceci, les LT transgéniques exprimant différent niveau de RCT devraient être marqués au CFSE avant d'être transférés dans les souris receveuses, et ainsi il nous sera possible d'évaluer au pic de la réponse le nombre de division cellulaire. Si une différence dans le nombre de division cellulaire est observée, ceci signifie la présence d'un défaut dans la prolifération. La prolifération est intimement liée à l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, nous pouvons donc supposer que le défaut dans l'amplitude des LT CD8⁺ exprimant un faible nombre de RCT est relié à un problème dans l'entrée des LT CD8⁺ dans le cycle cellulaire.

B. Étude du cycle cellulaire

Si les LT ayant peu de RCT à leur surface présentent un défaut dans la division cellulaire, il serait intéressant d'étudier la voie mTOR qui est impliquée dans l'entrée (transition de la phase G0 vers la phase G1) et dans la progression (transition de la phase G1 vers la phase S) des LT dans le cycle cellulaire (597). En effet, l'activation de mTOR assure la dégradation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{KIP1}, l'expression du récepteur et de la cytokine IL-2 et la production d'ATP qui est la source d'énergie nécessaire pour une division cellulaire optimale (597). L'activation de la protéine sérine/thréonine atypique mTOR est dépendante de la voie de signalisation PI3K/AKT suite à la stimulation du complexe RCT/CD28 lors de la transition de la phase G0 vers la phase G1 ou du complexe RCT/CD28 avec IL-2R/IL2 lors de la progression des LT vers la

phase S du cycle cellulaire (597) (**Figure 28**). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la voie de signalisation PI3K/AKT est suboptimale suite à la stimulation des LT exprimant un faible nombre de RCT à leur surface. La réponse à cette hypothèse pourrait être vérifiée par la technique de *western blot* quantifiant l'état d'activation de ces molécules.

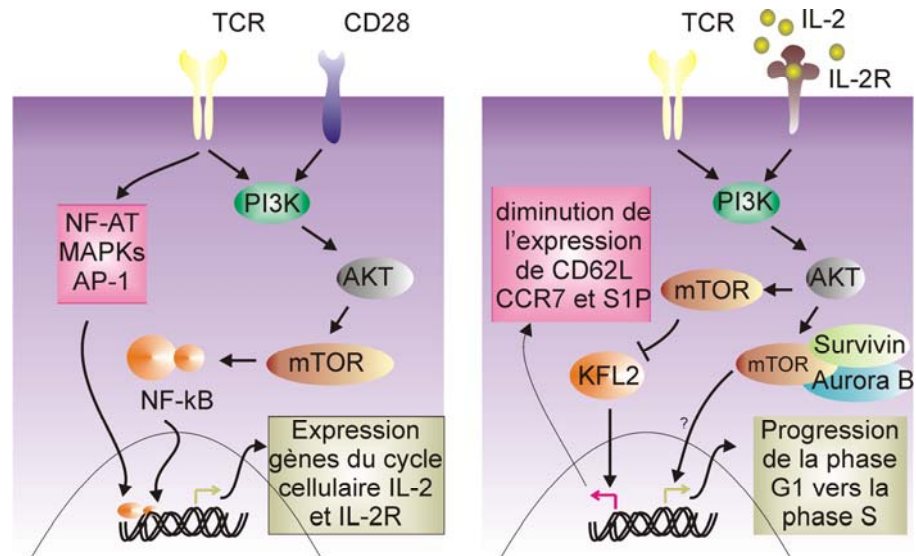


Figure 28: Rôle de la voie PI3K/AKT/mTOR dans la prolifération des LT

Représentation des voies de signalisation de mTOR impliquées dans l'entrée (transition G0 vers G1, à gauche) et dans la progression du cycle cellulaire (transition G1 vers phase S, à droite). Adapté de l'article (597)

Cependant du fait qu'il n'y ait pas de défaut dans l'expression du récepteur à l'IL-2 (**Figure n°2** de l'article n°1 de cette thèse), nous pouvons supposer que c'est la voie tardive de mTOR qui peut être impliquée dans le défaut des LT exprimant un faible nombre de RCT. Soit, la progression dans le cycle cellulaire des LT exprimant peu de RCT à leur surface pourrait être affectée ce qui expliquerait la diminution de l'amplitude au pic de la réponse.

Nous pouvons aussi suggérer qu'un défaut dans l'amplitude de la réponse peut être associé à un défaut dans les voies de signalisation impliquées dans l'activation du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est contrôlé par l'intervention de cycline et de CDK (cyclin dépendant kinase). Ces deux molécules forment un complexe cycline-CDK dont l'activation est sous le contrôle d'inhibiteurs tels que p21, p27^{KIP1} (**Figure 29**). Dans la littérature, il a été démontré que p27^{KIP1} est fortement exprimé dans les LT quiescents et que son expression diminue lors d'une activation mitogénique (598). Ainsi, l'activation des LT entraîne une diminution de p27^{KIP1} ce qui favorise l'entrée des LT dans le cycle

cellulaire. Cependant, il est intéressant d'observer dans les LT $CD4^+$ qui sont hétérozygotes pour le gène $p27^{KIP1}$ (menant à une diminution de 2 fois de l'expression de la protéine $p27^{KIP1}$) que leur taux de division cellulaire est intermédiaire par rapport aux LT normaux (598). Ceci signifie que l'activité inhibitrice de $p27^{KIP1}$ est dépendante de son niveau d'expression dans la cellule. Si $p27^{KIP1}$ est fortement exprimé, la cellule sera dans un état de quiescence, s'il est faiblement exprimé la cellule sera dans un état de forte prolifération.

Dans notre modèle, nous pouvons supposer que le défaut dans l'amplitude de l'expansion des LT exprimant un faible niveau de RCT est associé à une inhibition partielle des inhibiteurs du cycle cellulaire. Par ailleurs dans la littérature, il a été mis en évidence que la voie de signalisation inhibant $p27^{KIP1}$ est dépendante de l'activation de la kinase PKB via le complexe RCT/CD28. Ainsi, nous pourrions supposer que dans les LT exprimant un faible niveau de RCT, la signalisation de la voie PKB n'est pas optimale. Ceci pourra être vérifié à l'aide d'un western-blot.

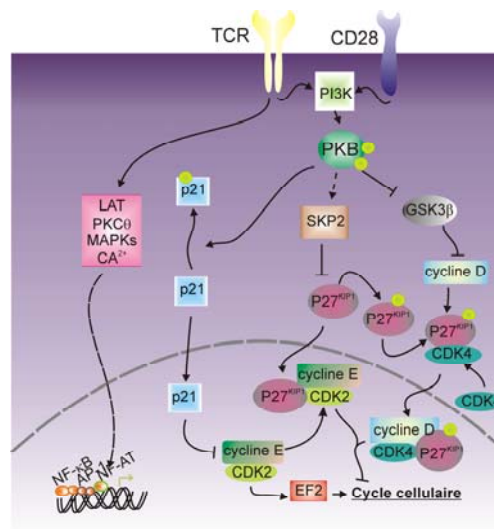


Figure 29: Schématisation de l'implication de la voie PI3K/PKB dans la prolifération cellulaire des LT

L'inhibiteur $p27^{KIP1}$ séquestre les complexes de cycline D/CDK4 et cycline E/CDK2, ce dernier est aussi inhibé par l'inhibiteur p21. L'activation de la voie PI3K/AKT permet l'inhibition de $p27^{KIP1}$ et de p21 entraînant ainsi l'entrée des LT dans le cycle cellulaire. Cette activation permet aussi la stabilité de la cycline D via l'inhibition de GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β). Fusion et modification des schémas représentés dans les articles (599, 600).

III. Le recrutement des MAPKs

En s'appuyant sur les découvertes faites sur le développement des thymocytes, la différenciation des LT CD4⁺, des LB etc., plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer comment la force du signal RCT dicte le devenir d'une cellule T suite à la reconnaissance de l'antigène comme montré dans le papier n°2 de cette thèse.

A. Compartimentalisation des MAPKs

Lors du développement thymique, la qualité du signal RCT permet aux thymocytes de distinguer la sélection positive et négative. Plusieurs études ont montré que la voie de signalisation des MAPKs ainsi que le flux calcique contrôlent ces étapes de sélection. En effet, le modèle prépondérant est qu'une activation faible, mais prolongée de Erk favorise la sélection positive alors qu'une stimulation forte et brève de Erk favorise la sélection négative (601). À la différence, les voies P38 et JNK sont uniquement impliquées dans la sélection négative (601). Une étude a mis en évidence, l'importance de la compartimentalisation des MAPKs lors de la sélection positive et négative (602). En effet, à l'aide de peptides altérés, cette étude a mis en évidence qu'une colocalisation d'Erk, Zap70, GrB2, SOS, Ras, Raf1 et RasGRP1 au niveau de la membrane favorise la sélection négative, alors que la localisation d'Erk dans le cytosol favorise la sélection positive (602). Nous pouvons supposer que le même mécanisme de compartimentalisation se produit lors de la reconnaissance de l'antigène dans la cellule T périphérique. En effet, nous pourrions émettre l'hypothèse que *les LT ayant reçu un signal suboptimal vont diriger les MAPKs vers le cytosol résultant à une activation transitoire des MAPKs alors que les LT ayant reçu un signal optimal retiennent les MAPKs au niveau de SI où leur activation sera maintenue*. L'activation transitoire des MAPKs ne permettra pas une activation efficace des facteurs de transcriptions impliqués dans la survie et la différenciation en LTm, tandis qu'une activation maintenue des MAPKs assure une amplification du signal RCT se traduisant par une activation optimale des facteurs de survie et de différenciation. Cette hypothèse peut être mise en parallèle avec l'étude de Teixeira et coll. qui en affectant la signalisation du RCT par une mutation au niveau de sa chaîne β entraîne une séquestration du facteur de transcription NF- κ B dans le cytosol donnant lieu à un défaut dans la génération des LTm (345). Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions stimuler *in vitro* des LT avec des DCs exprimant

un fort ou faible niveau de complexe CMH/peptide (DC O/N versus DC 3h). Par la suite, selon une cinétique établie les cellules seront marquées avec des anticorps spécifiques des MAPKs afin de visualiser leur emplacement (cytosol ou SI) dans la cellule par microscopie confocal. Nous pourrions aussi envisager que la localisation des MAPKs est interchangeable entre les deux conditions (DC O/N versus DC 3h), mais que c'est le recrutement d'une molécule de signalisation du RCT.

B. Phosphorylation des MAPK et le flux calcique

L'activation du RCT se manifeste par la phosphorylation des MAPKs et la concentration du flux calcique dans la cellule, ceci dans le but d'assurer la propagation du signal. L'activation de ces deux paramètres peut être modulée selon l'intensité du signal RCT et définit le devenir d'une cellule T. En effet, la sélection négative des thymocytes est associée à un flux calcique élevé et inversement pour la sélection positive (603). Par ailleurs, les travaux de Bachmann et coll. montrent une différence dans le flux calcium selon le peptide antigénique utilisé (antagoniste, partiel agoniste et agoniste) ce qui implique une corrélation entre la force du signal RCT et la concentration intracellulaire du calcium dans la cellule (604) ainsi nous pourrions suggérer que *les LT stimulés avec des DCs exprimant un haut ou faible niveau de complexe CMH/peptide (DC O/N versus DC 3h), manifesteront une différence au niveau de la force du signal RCT qui va se traduire par une variation de l'intensité de phosphorylation des molécules impliquées (telles que Lck, LAT, Zap70, les MAPKs ...), ainsi que du flux calcique.* Grâce à notre modèle, il nous sera possible de comparer ces paramètres (phosphorylation MAPKs, flux calcique) entre les LTn ayant la capacité de former la quantité de LTm (DC O/N) et ceux ayant une capacité moindre (DC 3h). Pour tester cette hypothèse, nous pourrions analyser la signalisation intracellulaire *ex vivo*. Ceci serait aidé par mes travaux antérieurs où j'ai démontré que les DCs maturées injectées I.V. à la base de la queue mettaient au minimum 1heure pour se retrouver dans la rate (**Figure 30**).

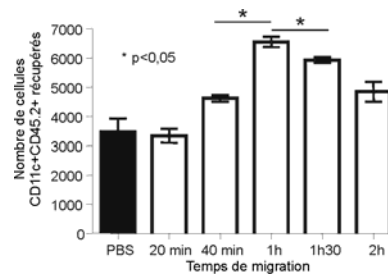


Figure 30: Cinétique de migration des DCs maturées injectées à la base de la queue de la souris vers la rate.

1 million de DCs matures provenant d'une souris B6.SJL ($CD45.1^+$) ont été injectées I.V. à la base de la queue d'une souris C57BL/6 ($CD45.2^+$). Les rates ont été prélevées à différents temps post-injection, traitées à la collagénase (Sigma) et les DCs sont purifiées sur un gradient d'histodenz (Sigma). Les DCs ont été identifiées à l'aide d'un marquage avec des anticorps anti-CD11c et anti-CD45.1, afin d'évaluer le nombre de Dcs récupérées. Le PBS a été utilisé comme contrôle négatif. ($n=2$).

A l'aide de ces résultats, nous pourrions injecter les LTn spécifiques de l'antigène 1 heure après l'injection I.V. des DCs, ceci nous permettra de contrôler et de favoriser la rencontre entre les deux types cellulaires dans un organe lymphoïde secondaire. Suite à l'injection des LTn, les souris receveuses seront euthanasiées selon une cinétique précise pour récupérer la rate. Suite à cela, les splénocytes seront marqués avec des anticorps spécifiques pour les MAPKs ou pour d'autres molécules de signalisation du RCT afin de visualiser leur état d'activation par cytométrie en flux.

Nous pourrions envisager que dans la condition DC O/N, les voies de signalisation du RCT sont plus activées. En effet, puisque la densité de l'antigène est optimale, nous pourrions supposer en tenant compte de l'hypothèse émise sur les seuils de signalisation du RCT, que chaque RCT a la possibilité d'interagir avec de nombreux complexes CMH/peptide et donc s'activer plusieurs fois. Et la sommation de chaque signal RCT émis suite à une interaction permettrait d'augmenter la force du signal RCT qui se traduira par une augmentation de l'activité des MAPKs ou d'autres molécules des voies de signalisation du RCT.

L'étude du flux calcique, quant à elle sera effectuée *in vitro*. Les LTn spécifiques seront préalablement marqués au Fura-2 et par la suite déposés sur des DCs chargées avec l'antigène spécifique des LT. La libération du Ca^{2+} sera visualisée par vidéo microscopie dès la rencontre du LTn avec la CPA. Par cette technique nous pourrions visualiser si la libération du calcium est (ou n'est pas) plus précoce et plus importante

dans les LTe activés par des DCs exprimant un haut niveau de complexe CMH/peptide (DC O/N).

IV. Les facteurs de transcription

Dans l'article n°2 de cette thèse, nous observons une différence dans l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la formation des LTm tels qu'Eomes, Blimp-1 et Bcl-6. Dans la littérature, il est établi que le degré d'inflammation ainsi que le ratio des facteurs de transcription T-bet/Eomes contrôle le choix des LT de mourir par apoptose ou de se différencier en LTm (349, 356). Un niveau élevé d'inflammation favorise l'expression de T-bet qui promeut la différenciation terminale ; tandis qu'Eomes avantage la génération des LTm lors d'une diminution de l'inflammation (349, 356). Dans notre modèle, le degré d'inflammation est faible et identique dans les deux conditions d'immunisation puisque nous utilisons des DCs maturés *in vitro* et que la densité d'épitope exprimé à la surface des DCs n'influence pas leur capacité à sécréter des cytokines inflammatoires. Ainsi, tel qu'illustré dans la **Figure 5** de l'article n°2, aucune variation de T-bet n'est observée, ceci suggère que ce facteur de transcription est dépendant de la présence des cytokines inflammatoires. De plus, du fait que dans nos deux conditions d'immunisation nous sommes capables de générer des LTe et des LTm avec une variation au niveau de la fréquence des LTm, et que T-bet ne varie pas, nous pouvons suggérer que le facteur de transcription T-bet n'est pas être un facteur clef du choix de différenciation entre LTe et LTm.

Par contre, l'expression des facteurs de transcription Eomes et Bcl-6 est augmentée dans la condition favorisant la génération des LTm (DC O/N). Et la régulation de ces facteurs de transcription est très fine puisque nous observons, pour Eomes et Bcl-6, une augmentation respective de 2 à 1,5 fois dans les LTe obtenus qui privilégient la formation des LTm (DC O/N) par rapport à la condition qui ne favorise pas la formation des LTm (DC 3h). Ces résultats mettent en évidence à la fois le rôle crucial de ces facteurs de transcription dans la génération de LTm quelque soit la condition d'immunisation (inflammatoire ou non inflammatoire) et la sensibilité des modifications génétiques pour le choix de différenciation.

L'induction de l'expression d'Eomes peut être modulée par l'activité du facteur de transcription Runx3. En effet, il a été montré que le facteur de transcription Runx3 est

requis pour l'expression d'Eomes, la perforine et IFN γ (605). Cependant, aucune étude n'a mis en relation l'activité de Runx3 et la force du signal RCT. Runx3 est surtout étudié dans la différenciation des thymocytes, il est impliqué dans l'inhibition du corécepteur CD4 pour favoriser le développement des thymocytes CD4 $^-$ CD8 $^+$ (606).

Par ailleurs, dans notre modèle nous observons aussi une variation de l'expression de Blimp-1 dans les LTe qui favorisent la génération des LTm. Or il est intéressant de souligner que l'activation de Blimp-1 est dépendante de l'activité du facteur de transcription NF- κ B (607). Cette donnée nous permettrait d'envisager que *l'expression de Blimp-1 est augmentée dans les LT ayant reçu un signal optimal lors de la rencontre de l'antigène (condition DC O/N de l'article n°2) via une activation amplifiée de la voie NF- κ B.*

Par ailleurs, le facteur de transcription Blimp-1 contribue à la différenciation des LB en plasmocytes et dans la différenciation des LT CD4 $^+$ en Th2 (608). En effet, il a été démontré que Blimp-1 inhibe la transcription du facteur de transcription Bcl-6 dans les LB (608). De même que dans le modèle de différenciation des LT CD4 $^+$ en Th2, il a été prouvé que Blimp-1 réprime la transcription de T-bet et Bcl-6 (608). Cependant dans les LT CD8 $^+$ lors d'une situation d'inflammation, l'absence de Blimp-1 entraîne une diminution de l'expression de T-bet et une augmentation de l'expression de Eomes et Bcl-6 (357). Ceci sous-entend qu'à la différence des LT CD4 $^+$ et des LB, Blimp1 dans les LT CD8 $^+$ est un participant direct ou indirect de l'expression de T-bet et un inhibiteur direct ou indirect des facteurs de transcriptions Eomes et Bcl-6 (**Figure 31**).

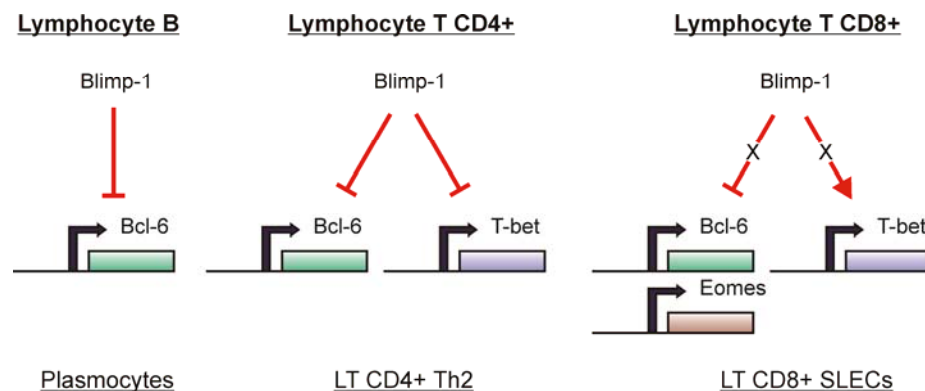


Figure 31: Les cibles de Blimp-1.

De gauche à droite : Représentation de l'effet de Blimp-1 sur l'expression des facteurs de transcription Bcl-6, T-bet et Eomes dans les LB, les LT CD4 $^+$ et les LT CD8 $^+$. L'action de Blimp-1 favorise la différenciation des LB en plasmocytes, des LT CD4 $^+$ en Th2 et des LT CD8 $^+$ en SLECs.

Ceci laisse suggérer que le facteur de transcription Blimp-1 pourrait influencer le ratio T-bet/Eomes ou que son expression pourrait être régulée selon le ratio T-bet/Eomes. Or dans notre modèle, il y a peu d'inflammation, ni de variation de l'expression de T-bet, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que *la fonction de Blimp-1 dans la différenciation des LTm CD8⁺ est dépendante du ratio de T-bet/ Eomes, et que la présence de T-bet et des cytokines inflammatoires influencent l'activation de Blimp-1 pour une différenciation terminale.* Par ailleurs, il a été montré que Bcl-6 inhibe l'expression des facteurs de transcription T-bet et ROR γ T (facteur de transcription préférentiellement activé pour la différenciation des Th17) (17) et que les souris déficientes pour Bcl-6 développent une incapacité de générer des LTm CD8⁺ et CD4⁺ (355, 387). Donc d'après nos résultats et ceux de la littérature, on pourrait émettre les hypothèses que *dans les LT CD8⁺, l'activation de T-bet est dépendante de la levée de l'inhibition de Bcl-6 par Blimp-1, et que l'inhibition de Blimp-1 sur Bcl-6 est sous le contrôle du niveau d'expression du facteur de transcription Eomes.* (**Figure 32**) Dans les LT CD8⁺, l'inhibition de Blimp-1 sur l'expression du facteur de transcription a été montré à l'aide d'une souris déficiente pour Blimp-1 et infectée avec le virus d'influenza (357). Il faudrait donc confirmer cette inhibition dans un modèle non inflammatoire comme le nôtre (immunisation avec des DCs maturées). L'inhibition de T-bet par Bcl-6 est montrée pour les LT CD4⁺, pour vérifier cette fonction dans les LT CD8⁺, la technique appropriée serait l'immunoprécipitation de chromatine (498) comme décrit dans le papier de Yu et coll. (17). Pour la seconde hypothèse qui consiste à étudier l'effet inhibiteur du facteur de transcription Eomes sur l'inhibition de Bcl-6 par Blimp-1, pourrait se réaliser par l'utilisation des expériences de transfection avec des vecteurs. En effet, les vecteurs permettraient une sur-expression du facteur Blimp-1 et/ou du facteur Eomes et celle d'un gène rapporteur placé sous le contrôle du promoteur de Bcl-6 dans les LT. Un plasmide contenant le promoteur albumine au lieu du promoteur Bcl-6 pourrait être utilisé comme contrôle négatif. Ainsi, on pourrait observer une influence du facteur de transcription Eomes sur l'activation du promoteur de Bcl-6 dans les LT. Si cette hypothèse est confirmée, il faudrait étudier le mécanisme de compétition entre Blimp-1 et Eomes pour le promoteur de Bcl-6, est-ce dû à une expression différentielle dans le temps des facteurs de transcription Eomes et Blimp-1, ou est-ce dû à une expression différentielle dans le ratio présent dans la cellule?

Par ailleurs, grâce à notre modèle d'immunisation avec des DCs exprimant beaucoup ou peu d'épitope, il nous serait possible de comparer les gènes cibles modulés par ces différents facteurs de transcription à l'aide de la technique de *microarray* dans les LTe favorisant ou pas le développement des LTm (DC O/N versus DC 3h).

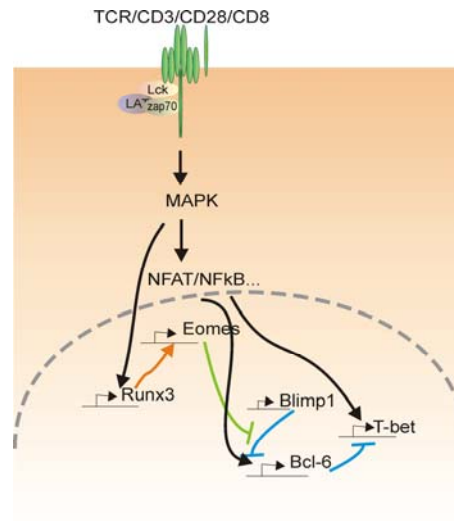


Figure 32: Activité des facteurs de transcription dans notre modèle d'étude.

Les flèches noires représentent les événements démontrés dans les LT CD4⁺ et CD8⁺, les flèches bleues et oranges correspondent respectivement aux données montrées uniquement dans les LT CD4⁺ et LT CD8⁺ et finalement la flèche verte est ma propre spéculation.

V. Intervention des microARNs

La force du signal RCT a été démontrée comme pouvant être modulée par le niveau post-transcriptionnel de microARN dans la cellule. Les microARNs sont de petits ARNs qui régulent l'expression des gènes par une répression translationnelle et/ou une dégradation de l'ARNm.

Les microARNs sont génétiquement codés dans le noyau sous la forme de long précurseur appelé pri-microARN. Ces précurseurs seront clivés dans le noyau en produit intermédiaire appelé pré-microARN puis seront exportés. Dans le cytoplasme les pré-microARNs sont hydrolysés par des enzymes appartenant à la famille DICER afin de devenir dans microARNs doubles brins. Ces microARNs vont interagir avec les molécules de la famille Argonaute (Argo1 ou Argo2) pour former le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Au cours de la formation du RISC il y a passage d'un microARN double brin à un microRNA simple brin. Seul le brin spécifique de l'ARNm cible du microRNA est gardé (réaction thermodynamique) au sein du complexe. Si le microARN est associé à Argo1 son intervention se fera par une répression de la

traduction alors que son association avec Argos2 va engendrer une dégradation de l'ARNm cible (609).

Dans la littérature, il a été démontré que le microARN miR-181a module la sensibilité et la force du signal RCT suite à la stimulation antigénique. En effet, il a été prouvé que suite à une stimulation *in vitro*, l'augmentation de miR-181a entraîne une inhibition principalement des phosphatases résultantes à une augmentation du niveau de phosphorylation des ERK et Lck (610). Deux équipes ont mis en évidence l'importance du microARN miR-155 dans la régulation de la réponse des LT et LB (590, 611). En effet, il a été démontré qu'une souris déficiente pour miR-155 vaccinée contre la souche atténuée de *Salmonella typhimurinum* ne réussit pas à développer une protection lors d'une réinfection avec la souche virulente (590). Un défaut de commutation de classe des Igs est aussi observé chez ces souris (590). De plus, il a été mis en évidence que l'expression de miR-155 biaise la différenciation des LT CD4⁺ vers le choix Th2, puisque sa cible est le facteur de transcription c-Maf qui joue un rôle important dans la production des cytokines IL-10, IL-4 et IL-5 (611). Récemment, il a été démontré que le facteur de transcription Bcl-6 régule l'expression de la famille de microARN miR-17-92 pour favoriser la différenciation des LT CD4⁺ en Tfh (17). De plus, l'équipe de Majunath a comparé en 2009, les différences d'expression des microARNs entre les LTn, les LTE et les LTm (612). Ils observent la présence de 69, 51 et 54 microARN dans respectivement les LTn, LTE et LTm, seulement 7 sont communs pour les 3 populations des LT dont 6 sont dramatiquement sous exprimés dans les LTE par rapport aux LTn, mais dont leur expression est réaugmentée au stade LTm tout en restant inférieure à celle des LTn (612). Seul le microARN miR-21 a une fréquence élevée dans les LTE. MiR-21 est associé à de nombreux cancers (613) ce qui lui vaut un rôle dans l'inhibition de l'apoptose (614). Nous pouvons donc d'après ces données émettre l'hypothèse que *les LT ayant reçu un signal optimal expriment plus de microARN qui inhiberaient les gènes impliqués dans l'apoptose et inversement pour les LT ayant reçu un signal suboptimal*. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions comparer à l'aide d'un *microarray* le profil d'expression des microARN chez les LTE générés suite à l'immunisation avec des DC O/N versus DC 3h. Dans notre modèle d'étude, on pourrait supposer que les microARNs exprimés entre la population de LTE généré suite à une immunisation avec des DC O/N ou des DC 3h sont différents. De plus, on pourrait envisager que les microARNs

présents dans les LTe obtenus suite à une immunisation avec des DC 3h seraient impliqués dans l'apoptose.

VI. Étude de l'activité de Nor-1

Lors de nos travaux, nous avons observé une diminution de l'expression du récepteur Nor-1 dans les LTe obtenus suite à une immunisation avec des DCs exprimant un haut niveau de complexe CMH/peptide (DC O/N, **Figure 6**). Nor-1 appartient à la famille des *orphan neural receptor* comme Nur77 et Nur1. Les membres de la famille Nur77 et Nor-1 jouent un rôle dans la sélection négative des thymocytes, leur présence permet l'élimination par apoptose des thymocytes autoréactifs (323). Leur mode d'action consiste à modifier la conformation de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 pour que cette dernière devienne pro-apoptotique. En effet, Nur77 et Nor-1 ont la capacité de se fixer entre le domaine BH3 et BH4 de Bcl-2 ce qui entraîne une modification de son activité (332). Ainsi, l'inhibition de Bcl-2 sur Bax et Bak sera levée, et donc la libération du cytochrome c sera activée menant à l'apoptose cellulaire.

L'activité de Nur77 et Nor-1 est identique et complémentaire, ainsi il aurait été intéressant de vérifier la présence du récepteur Nur77 dans les LTe exprimant Nor-1 (DC 3h). Ces deux récepteurs peuvent intervenir par deux mécanismes distincts soit via le noyau ou via la mitochondrie (323). En effet, en plus de leur capacité à modifier la fonction de Bcl-2 au niveau de la mitochondrie, il a récemment été démontré que Nor-1 a la capacité d'augmenter la transcription du gène codant pour la protéine UCP1 (*uncoupling protein*) de manière dépendante de l'activité de cAMP (615). Les protéines UCP sont des participants de l'activité mitochondriale. Par ailleurs, il a été montré que Nur77 peut augmenter la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose, incluant FasL et TRAIL, et les gènes NDG1 et NGD2 (*Nur77 downstream gene 1 or 2*) (616). Les molécules NGD1 et 2 assurent l'apoptose via l'activation des caspases 3 et 8 et de manière indépendante de Bcl-2.

A. Nor1 au niveau de la mitochondrie

Le promoteur codant pour la protéine UCP1 possède la séquence NBRE qui favorise l'interaction de Nor-1 (615). Les protéines UCP sont présentes au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et sont impliquées dans la dissipation du gradient de protons (H^+) nécessaire à la chaîne respiratoire mitochondriale (617). Les protéines

UCP sont au nombre de 5 (UCP1 à UCP5), UCP1 est principalement exprimée dans les tissus adipeux bruns, mais a aussi été identifiée dans les thymocytes (618-620). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que *la transcription du gène codant pour la protéine UCP via Nor-1 peut être aussi un intervenant de l'augmentation de l'apoptose dans les LTe obtenu suite à une immunisation avec des DCs faiblement chargées avec le peptide antigénique (DC 3h)*. En effet, l'activation de la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne une exportation des H^+ de la matrice mitochondriale. Cette exportation entraîne à une augmentation de superoxyde (O_2^-) dans la matrice mitochondriale due à la réduction des molécules d'oxygène par les complexes I et III de la chaîne respiratoire (**Figure 33**). Les superoxydes vont activer la protéine UCP qui va permettre l'entrée des H^+ dans la membrane causant une diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie et de l'activité de la pompe ATPase (**Figure 33**) (621). Ces altérations vont entraîner l'accumulation des superoxydes dans la matrice mitochondriale. Ces superoxydes vont, en plus de participer à l'activation de la protéine UCP, réagir avec l'oxyde nitrite (NO) présent dans la cellule pour former le peroxyde nitrite ($ONOO^-$) ou/et être transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'enzyme SOD (*superoxide dismutase*) (621, 622). La réaction entre le NO et O_2^- est trois fois plus rapide que la réaction entre le O_2^- et SOD (622). Ces deux composés seront à l'origine de dommages oxydatifs entraînant l'apoptose cellulaire. En effet, il a été montré que les $ONOO^-$ entraînent un défaut au niveau de la phosphorylation des tyrosines des molécules de signalisation du RCT donnant lieu à une mort cellulaire (**Figure 33**) (622).

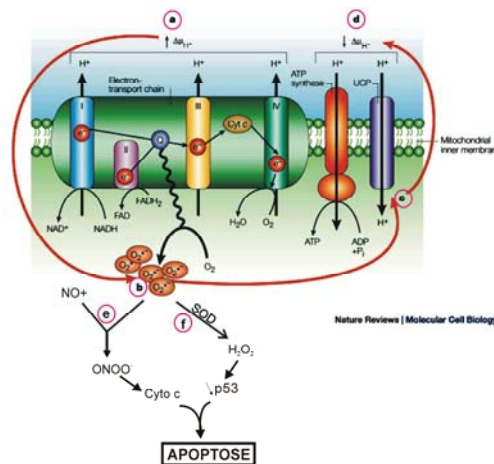


Figure 33: Représentation de l'activité de la protéine UCP dans le déclenchement de l'apoptose. (a) Lors de l'exportation des H^+ à travers la membrane interne mitochondriale, le potentiel ($\Delta\mu H^+$) de la mitochondrie augmente, (b) donnant lieu à une augmentation des superoxydes (O_2^-) dans la matrice mitochondriale et des électrons libres (e^-) dans les complexes I et III de la

chaîne respiratoire. Les superoxydes (O_2^-) peuvent soit (c) activer la protéine UCP ce qui entraîne (d) une diminution du potentiel mitochondrial et de l'activité de la pompe ATPase, soit réagir (e) avec l'oxyde nitrite (NO) présent dans la cellule pour former le peroxyde nitrite ($ONOO^-$) ou/et (f) être transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'enzyme SOD (superoxyde dismutase). La présence d' $ONOO^-$ et de H_2O_2 entraîneront la mort cellulaire par apoptose. Modification de la figure provenant de l'article (621)

De plus, il est montré dans les macrophages que la protéine UCP2 inhibe la production des ROS dans la cellule (623, 624). Du fait du maintien de l'activité des protéines UCP2 et 3 dans les différents types cellulaires, on pourrait émettre l'hypothèse que la/les protéine(s) UCP (UCP1 et/ou 2 et/ou 3) dans les LT inhibe(nt) la production des molécules ROS intracellulaires dans les LT $CD8^+$ stimulés avec des DCs exprimant peu de complexes CMH/peptide (DC 3h). Des travaux en 2007 ont mis en évidence que la diminution des ROS dans le LT se traduit par une inhibition de l'activation des LT puisque les ROS sont impliqués dans la formation de la SI (625). Toutes ces données expliqueraient le résultat obtenu avec les LT stimulés par des DCs exprimant un niveau faible de complexe CMH/peptide (DC 3h). En effet, si la présence de Nor-1 favorise la transcription des gènes codant pour les protéines UCP, la mort cellulaire est largement favorisée par une conversion de la fonctionnalité de Bcl-2 en molécule pro-apoptotique, par une augmentation de $ONOO^-$ et H_2O_2 dans la mitochondrie ce qui active l'apoptose et aussi par la diminution des ROS qui inhibent l'activité des LT en agissant au niveau de la SI (illustration **Figure 34**)

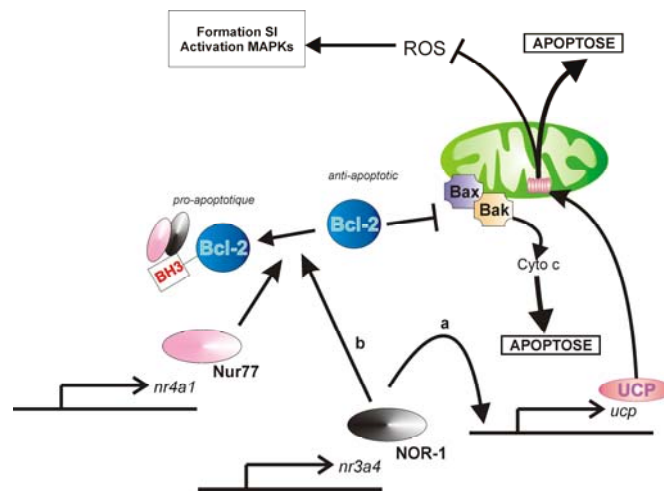


Figure 34: Représentation de l'hypothèse sur l'intervention de Nor-1 au niveau de la mitochondrie via Bcl-2 et UCP

a/ Nor-1 a la capacité de favoriser l'expression de la protéine UCP qui au niveau de la mitochondrie va activer l'apoptose ou/et la production de ROS qui eux inhiberont la formation de la SI. b/ Nor-1 et Nur77 peuvent interagir avec Bcl-2, ce qui va entraîner le changement de conformation et d'activité de Bcl-2 devenant une molécule pro-apoptotique.

B. Nor-1 au niveau du noyau

Tel qu'expliqué ci-dessus, l'activation du promoteur codant pour la protéine UCP1 est dépendante de l'activité de cAMP (615). Or l'activité cAMP est elle-même dépendante des protéines G présentes dans la SI (**Figure 35**). Les protéines G stimulent l'adenylyclase qui permet la production du second messenger cAMP (**Figure 35**). Ce messenger est impliqué dans de nombreux processus comme l'activation de la PKA, des canaux ioniques. De plus, l'inactivation de l'AMPc nécessite l'intervention des phosphodiesterase (626). La protéine kinase A est impliquée dans l'activation du facteur de transcription CREB (*cAMP response element-binding protein*) et de la protéine Csk (*c-src tyrosin kinase*). Le facteur de transcription CREB est impliqué dans l'apoptose et le stress oxydatif, et intervient dans la transcription des gènes nucléaires et mitochondriaux (627). De plus, il a été montré que de la forme active de CREB (forme phosphorylée) permet la transcription des gènes codant pour Nur77, Nor-1 et Nurr1 (628). De manière intéressante pour notre étude, il a été mis en évidence que l'absence de CREB favorise l'expression d'Eomes et de CD122 dans les LT CD8⁺ (629). Par ailleurs, la PKA active la kinase Csk qui elle-même joue un rôle dans l'inhibition du signal proximal du RCT. La kinase Csk activée (forme phosphorylée) par PKA se fixe au complexe Cbp/PAG (*Csk-binding protein/ phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomain 1*) pour augmenter son activité inhibitrice. En effet, l'activation de Csk entraîne une diminution de l'activité de Lck et de la phosphorylation de CD3ζ résultant donc à une inhibition du signal RCT (626) (**Figure 35**). Le regroupement de tous ces résultats nous permet d'émettre l'hypothèse que *l'augmentation de la transcription de Nor1 dans le groupe DC 3h est associée à une meilleure activation de la kinase PKA qui assure la fois l'inhibition de l'activation du RCT par activation de Csk et l'apoptose par activation du facteur de transcription CREB.*

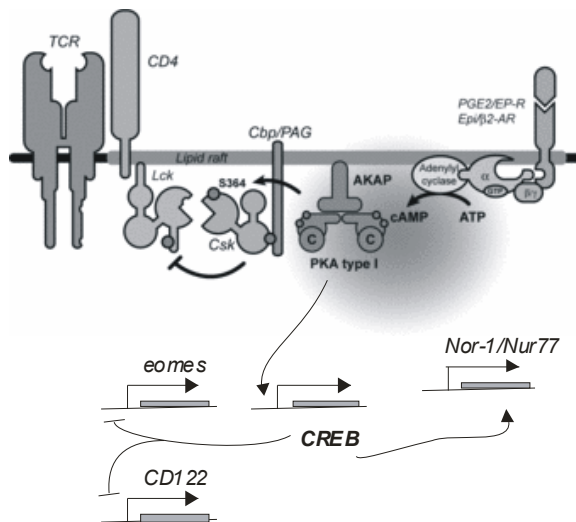


Figure 35: Représentation de l'activité inhibitrice de cAMP sur la signalisation du RCT et de l'influence de CREB sur l'activité des facteurs de transcription.

Le messager cAMP active la PKA qui a son tour active le complexe Csk/Cbp/PAK et le facteur de transcription CREB. Le complexe Csk/Cbp/PAK inhibe l'activation du signal RCT. Le facteur de transcription CREB agit sur l'expression de Nor-1/Nur77, CD122 et Eomes. Modification de la figure provenant de l'article (626).

VII. Étude de la voie mTOR

Dans notre étude, les LT activés suite à une immunisation avec des DCs exprimant un niveau élevé de complexe CMH/peptide (DC O/N) ont une capacité de survie supérieure celle des LT activés avec des DCs faiblement chargés en antigène (DC 3h). Or, cet avantage de survie pourrait finalement être dû à *une capacité d'un maintien de prolifération d'un groupe de cellule (les précurseurs des LTm) versus les autres cellules qui meurent par apoptose*. Pour vérifier ceci, les souris transférées avec des LT CD8⁺ spécifiques d'un antigène et immunisées avec des DCs exprimant beaucoup ou peu de complexes CMH/peptide (DC O/N versus DC 3h) devraient être traitées au BrdU durant la phase de contraction de la réponse des LT (J5 à J13 – **Figure 2** de l'article n°2). Ainsi, si le marquage BrdU est détectable dans la condition d'immunisation avec des DCs exprimant beaucoup d'antigène ceci signifie que l'augmentation du nombre de LTm est due à maintien de la capacité de prolifération des précurseurs des LTm.

De manière intéressante, il a été mis en évidence que l'inhibition de la voie mTOR par un traitement à la rapamycine favorise la formation des LTm (630). En effet, il a été démontré que le ratio T-bet/Eomes est dépendant de l'activation de la voie mTOR, son inhibition favorise l'expression du facteur de transcription Eomes (631). De

plus, dans l'article n°2 de cette thèse, nous avons observé que l'augmentation de la génération des LTm corrèle avec une meilleure expression d'Eomes. Ces données suggèrent que l'augmentation de l'expression d'Eomes favorise le développement des LTm.

Tel que dit dans la discussion de l'article n°1, la protéine mTOR est activée suite à la stimulation du RCT via la voie de signalisation PI3K/AKT et est impliquée dans la prolifération (597). Cependant, la voie mTOR est composée de deux complexes : mTORC1 et la sous unité mTORC2. Le complexe mTORC1 régule la croissance cellulaire, la prolifération, la traduction des ARNm. Tandis que mTORC2 régule le cytosquelette d'actine via la GTPase Ras et l'apoptose (597). Araki et coll. ont démontré que l'inhibition du complexe mTORC1 favorise la différenciation des LTm et que le complexe mTORC2 n'a pas effet sur les choix de différenciation (630). Ainsi, on pourrait émettre l'hypothèse que *les LTe obtenus suite à une immunisation avec des DCs exprimant un niveau élevé de complexe CMH/peptide (DC O/N) inhibent la voie mTORC1 pour favoriser leur survie*. Pour vérifier cette hypothèse, la technique de *microarray* ou de PCR quantitative permettrait d'analyser les gènes cibles de mTORC1 (*mTOR*, *raptor*) et de mTORC2 (*fkbp12*) dans les LTe obtenus suite à une immunisation avec des DCs exprimant beaucoup ou peu de complexes CMH/peptide (DC O/N versus DC 3h). Nous pouvons spéculer que le complexe mTORC1 dans les LTe obtenu suite à une immunisation avec des DC exprimant un haut niveau d'épitope (DC O/N) sera inhibé et inversement pour les LTe obtenus suite avec une immunisation avec des DC chargées 3h avec l'antigène.

VIII. Modèle final

Le modèle proposé dans la **Figure 36** réunit toutes les hypothèses émises dans cette discussion soit:

Pour une condition où le signal RCT est optimal pour la formation des LTm (condition DC O/N – **Figure 36**):

- MAPKs situées au niveau de la SI
- Activation soutenue des MAPKs
- Activation soutenue de la voie NF-κB qui favorise l'activation de Blimp-1

- Inhibition de la voie de signalisation de Nor-1, de mTORC1, et des microARN impliqués dans l'apoptose

- Eomes inhibe l'inhibition de Blimp-1 sur Bcl-6

- Activation de Runx3 qui favorise la transcription du gène codant pour Eomes

Pour la condition où le signal RCT est suboptimal pour la formation des LTm (condition DC 3h – **Figure 36**)

- MAPKs situées dans le cytosol

- Activation transitoire des MAPKs

- Augmentation de l'activité de PKA via cAMP

- Augmentation de l'activation de la voie de signalisation de Nor-1 entraînant une surexpression de la protéine UCP et des molécules pro-apoptotiques (Bcl-2-BH3, FasL, TRAIL, NGD1/2).

- Dérégulation de la chaîne respiratoire mitochondriale via la présence de la protéine UCP

- Augmentation de l'activité du facteur de transcription CREB qui inhibe la transcription d'Eomes et CD122.

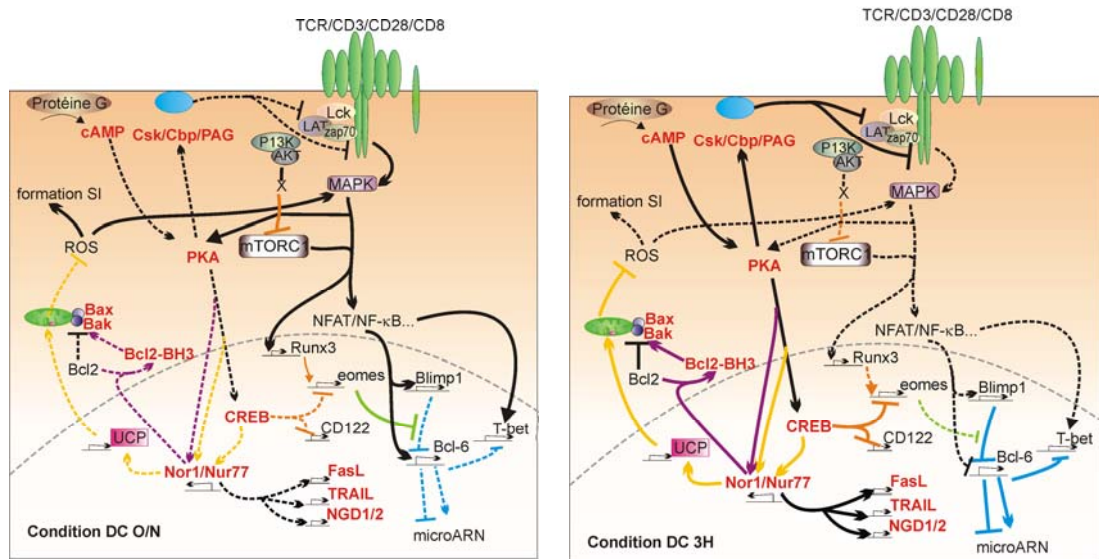


Figure 36: Représentation des voies de signalisation des LT CD8⁺ activés selon notre modèle d'étude.

En haut, représentation des voies de signalisation de LT activé par des DC exprimant beaucoup de complexes CMH/peptide (DC O/N). En bas, représentation des voies de signalisation de LT activé par des DC exprimant peu de complexes CMH/peptide (DC 3h). Les flèches noires représentent les événements démontrés à la fois dans les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺, les flèches bleues et oranges correspondent respectivement aux données montrées uniquement dans les LT CD4⁺ et LT CD8⁺, en beige sont des résultats provenant de data établit à partir d'autre type cellulaire (tels que macrophage, tissu adipeux brun), les flèches violettes sont représentatives des résultats provenant études sur les thymocytes et finalement la flèche verte est ma propre spéculation. Les flèches grasses représentent les voies de signalisation avantagées, sur les autres voies qui elles sont représentées en pointillées selon la condition (DC O/N versus DC 3h).

IX. Le maintien des LT mémoires

L'article n°3 de cette thèse avait pour but d'étudier l'importance de l'expression du RCT sur la survie des LTm CD4⁺ et CD8⁺. Nous démontrons dans cet article qu'il n'existe pas de signal constitutif du RCT impliqué dans la survie des LTm CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques d'un antigène. Ceci sous-entend que la survie de ces cellules est entièrement dépendante de la présence des cytokines γ c comme décrit dans la littérature. Dans notre étude, par contre nous mettons en valeur, comme dans les travaux de Purton et coll (564), qu'il existe deux groupes de LTm CD4⁺, l'un dépendant de présence du RCT et l'autre indépendant. Ces données suggèrent que les LTm CD4⁺ qui sont dépendants de l'expression du RCT représentent les LTm CD4⁺ naturels qui répondent aux antigènes commensaux. Pour vérifier cette suggestion, il faudrait réaliser la même expérience, mais avec des animaux exemptés de germes.

L'homéostasie des LT ne se limite pas qu'aux LTm. En effet, chez les vertébrés adultes, le nombre de LT périphériques est soumis à un contrôle strict. Bien qu'un grand nombre de LT soient produits chaque jour, le nombre de cellules T en périphérie reste constant. Chaque nouveau lymphocyte T produit ne s'établira en périphérie qu'après la mort cellulaire d'un lymphocyte déjà établi. Dans cette optique, la sélection du répertoire des cellules T périphériques n'est pas uniquement dépendante des interactions entre une cellule et son antigène, mais elle est également dépendante d'interactions entre différentes sous-populations cellulaires (340). Dans le but de comprendre comment l'homéostasie des LT périphériques est atteinte et comment l'équilibre de l'homéostasie se définit, il est nécessaire de délimiter les facteurs intervenant dans ce processus et leurs communications entre eux au sein du processus. L'homéostasie est caractéristique d'un système donné dans laquelle elle peut intervenir à des niveaux différents. En effet, la taille de la population des LT périphériques est déterminée par (i) le taux de LT sortant du thymus et (ii) la régulation de la survie et (iii) la prolifération périphérique (632). Ce processus d'homéostasie est essentiel pour un fonctionnement efficace du système immunitaire. En effet, chez un individu immunodéficient sa quantité de LT périphérique est dépendante de l'homéostasie, mais le pourcentage de LT générés est trop faible pour assurer un niveau de compétence immunitaire. De la même façon, l'immunocompétence ne dépend pas seulement de la composition quantitative des réservoirs de cellules T périphériques, elle est aussi dépendante de la présence de différentes classes et sous-populations de cellules T. Ainsi, l'homéostasie se définit de manière quantitative et qualitative.

Une caractéristique de l'homéostasie des LT périphériques est sa dépendance des LT matures qui migrent du thymus vers la périphérie. Or avec l'âge, le thymus s'atrophie, ainsi le nombre de LT sortant du thymus se réduit au cours du temps, ce qui entraîne une perte de LTn et donc une diminution du répertoire RCT résultat à un affaiblissement du système immunitaire face à de nouveaux pathogènes (633-636). Ainsi chez un jeune individu les LTn sont prédominants alors qu'un vieil individu ceux sont les LTm qui dominent. La sortie des LT matures du thymus est régulée par la chémokine S1P1. De plus, il a récemment été démontré qu'un défaut dans l'internalisation du RCT entraîne une diminution de nombre de LT sortant du thymus et une augmentation du ratio LTm/LTn (637). Pour démontrer ceci, l'équipe de Boding et coll. a muté la portion

dileucine du corécepteur CD3 γ (637). Cette portion est impliquée dans la diminution de l'expression du RCT à la surface des LT par internalisation, ainsi sa mutation entraîne un maintien de la signalisation du RCT.

En périphérie, le maintien des LTn nécessite une interaction du RCT avec le CMH et des cytokines γ c (IL-7 et IL-15) avec leurs récepteurs respectifs. Par contre, les LTm antigènes spécifiques ne nécessitent pas l'interaction entre le RCT avec le CMH, mais suscitent la présence des cytokines γ c. La question qui reste en suspend est de comprendre comment les LTn et LTm se maintient dans des niches différentes alors qu'ils utilisent les mêmes facteurs de survie : IL-7 et IL-15. Nous pouvons émettre l'hypothèse que *le partage des cytokines pour la survie des LT en périphérie est dépend de leur sensibilité aux cytokines et de leur niche qui favorise certaines interactions cellulaires.*

A. Sensibilité des cytokines

Il a été montré que les LTm CD8⁺ expriment un niveau de la chaîne CD122 du récepteur à l'IL-15 supérieure aux autres LT, ceci explique pourquoi l'IL-15 est importante dans la survie homéostatique des LTm CD8⁺ (411, 412, 550, 551, 558). Il en va de même pour le récepteur à l'IL-7 qui est plus exprimé à la surface des LTn, ceci signifie que les LTn sont plus sensibles à la cytokine que les LTm. De même que si les LTm CD8⁺ expriment le récepteur à IL-7 à leur surface, leur sensibilité à cette cytokine est inférieure à celle pour l'IL-15 et à celle que les LTm CD4⁺ ont pour l'IL-7. En effet, les LTm CD8⁺ sont dépendantes de la cytokine IL-15 quand la cytokine IL-7 est présente en faible quantité, si la concentration de l'IL-7 est au-dessus du niveau physiologique, l'IL-15 n'est pas requis (506). De plus, il est montré que dans un hôte lymphopénique IL-15 déficient ou IL-7 déficient, les LTm CD8⁺ ont la capacité de réaliser une prolifération lymphopénique qui n'est pas observable dans un hôte déficient à la fois pour l'IL-7 et pour l'IL-15 (558). Ainsi les LTm CD4⁺ et CD8⁺ diffèrent pour leur sensibilité aux cytokines. Cependant, les LTm CD4⁺ et LTn sont toujours en compétition pour la cytokine IL-7. Or il a été montré que la cytokine IL-7 favorise l'expression de la molécule costimulatrice OX-40 (581). Donc nous pouvons supposer que l'interaction d'OX-40 avec son ligand déclenche une voie de signalisation spécifique aux LTm CD4⁺. De même, que les LTn ont besoin de l'interaction avec le

complexe CMH/peptide endogène pour survivre (485, 486). Donc on peut supposer que les LTn et les LTm CD4⁺ diffèrent par les voies de signalisation qui sont différentes suite à l'interaction respective d'IL-7/IL-7R/RCT/CMH/peptide endogène et IL-7/IL-7R/OX-40/OX-40L (485, 486, 581) (**Figure 37**). De plus, les LTm CD8⁺ nécessitent l'expression de 4-1BB pour survivre, et l'expression de cette molécule de costimulation est dépendante de la cytokine IL-15 (561). Par ailleurs, il a récemment été montré que la cytokine IL-7 régule l'habilité aux LT d'interagir avec les DCs et donc d'influencer l'activation des LT mais aussi leur homéostasie (638). Ces travaux mettent en évidence que la compétition pour les cytokines entre les LTs peut varier selon les autres signaux environnementaux qui les entourent telle que les interactions intercellulaires, la concentration des cytokines. (638) (**Figure 37**).

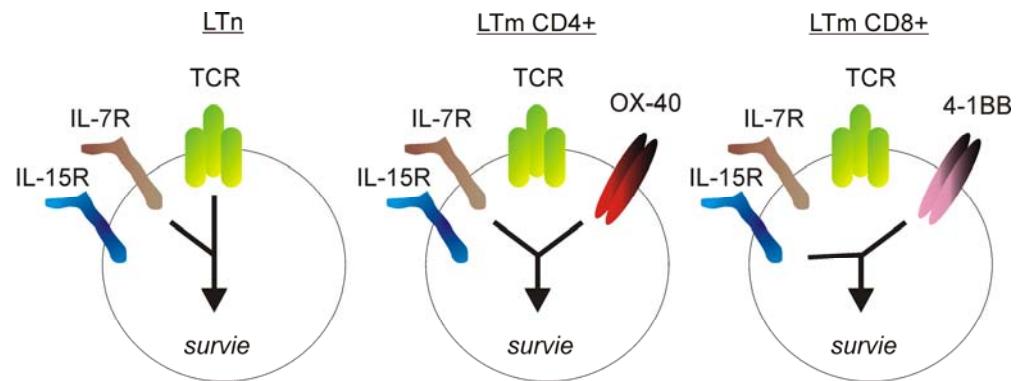


Figure 37: les différents signaux de survie des LTn et LTm.

De gauche à droite, mise en évidence des signaux agissant simultanément chez les LTn, les LTm CD4⁺ et les LTm CD8⁺ pour leur survie.

De plus, l'absence de compétition entre les LTn et LTm peut venir de l'hétérogénéité des "niches" et de la régulation de manière indépendante de la taille de chaque compartiment cellulaire (639).

B. Les niches des LT.

L'utilisation de différentes combinaisons de récepteurs aux chemokines et de molécules d'adhésion permet aux LT de se diriger vers de niches différentes où les facteurs nécessaires à leur survie sont présents.

1. Les marqueurs migratoires

La moelle osseuse est considérée comme la niche homéostatique préférentielle des LTm par rapport au LTn (569). En effet, les LTm expriment des molécules

d'adhésion qui les distingue des LTn leurs permettant une entrée préférentielle dans la moelle osseuse telles que l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ et l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (569). Il a été montré que les cellules de la moelle osseuse expriment une chémokine SDF-1 α (*stromal cell derived factor 1 α*) pour attirer les LTm et les LTn aussi bien CD4⁺ que CD8⁺ (579). Le récepteur de cette chémokine, CXCR4, est présent à la surface des LTm et des LTn mais il a été démontré par une expérience *in vitro* de migration transendothéliale que le pourcentage de cellules qui répondent à l'attraction de SDF1 est supérieur chez les LTm que les LTn (579). La moelle osseuse est considérée comme une ressource importante pour les cytokines IL-7 et IL-15 qui sont essentielles pour la survie des LTm CD4⁺ et CD8⁺.

Les LTn eux, migrent entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions et la rate. L'entrée des LTn dans les organes lymphoïdes secondaires est essentielle pour leur survie, puisque les cellules FRC des ganglions sécrètent une grande quantité la cytokine IL-7. L'entrée des LTn dans les ganglions est réalisable par l'expression des molécules de *homing* CD62L et CCR7. Les chemokines CCL21 et CCL19 reconnus par le récepteur CCR7, régulent la mobilité et la migration des LTn, par ailleurs ces chémokines ont été montrées comme étant impliquées dans la sécrétion de l'IL-7 au niveau des ganglions afin d'attirer spécifiquement les LTn au niveau de FRC (510). Dernièrement il a été mis en évidence qu'un défaut d'entrée des LTn dans les ganglions due à l'absence de l'expression de CD62L et CCR7 entraîne une diminution de leur survie en périphérie (511). Ces données mettent en évidence l'importance de circuler dans sa niche homéostatique d'intérêt afin d'y recevoir les signaux de survie.

2. Chacun sa niche homéostatique

D'autres cellules peuvent rentrer en compétition avec les cytokines de survie des LTs, mais leurs niches homéostatiques permettent d'éviter cette compétition.

En effet, les LTm CD4⁺ et les LTm CD8⁺ comme décrit ci-dessus différent par leurs sensibilités aux cytokines IL-7 et IL-15 mais aussi par l'expression des molécules de costimulation OX-40 et 4-1BB. L'expression de ces molécules entraîne une interaction différentielle entre les cellules environnantes. En effet, il a été montré que les LTm CD4⁺ exprimant OX-40 vont interagir avec des cellules accessoires CD3⁻ CD11c⁺CD4⁺. Ces cellules expriment de manière constitutive OX-40L et CD30L. La présence de ces cellules accessoires est préférentiellement dans la rate

En effet, IL-7 n'est pas nécessaire juste pour les LT $\alpha\beta$, il est aussi important pour les LT $\gamma\delta$. Néanmoins, il est montré que dans une souris RCT $\alpha^{-/-}$ les LT $\gamma\delta$ n'envahissent pas les organes lymphoïdes malgré la présence en excès de l'IL-7 et IL-15. Ceci peut être dû aux niches homéostatiques préférentiellement utilisées par les LT $\gamma\delta$ qui sont différentes de celles des LT $\alpha\beta$. Ces niches homéostatiques pourraient contenir des ressources spécifiques d'autres que l'IL-7 et IL-15 ou permettre des interactions primordiales pour la survie des LT $\gamma\delta$. La diversification des niches homéostatiques de la population LT $\gamma\delta$ est liée à son hétérogénéité due à une variabilité d'expression de la chaîne V γ . En effet, les LT $\gamma\delta$ exprimant les chaînes V $\gamma 1^+$ et V $\gamma 2^+$ sont prédominantes dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT $\gamma\delta$ V $\gamma 3^+$ se situent au niveau de la peau, les V $\gamma 4^+$ dans la muqueuse et la langue et les V $\gamma 5^+$ sont présents dans les intestins. Cette diversité de niches homéostatiques suggère que certaines interactions spécifiques, autres qu'IL-7/IL-7R, entretiennent la survie et la prolifération des LT $\gamma\delta$ et surtout diminue la compétition pour la cytokine IL-7 avec les LT $\alpha\beta$.

Pour les NKT, IL-7 est moins important que l'IL-15, et les interactions CMH non conventionnelles via CD1d ne sont pas requises. Les NKT sont principalement présents dans le foie, la moelle osseuse, le thymus, et moins abondants dans le sang, la rate, les poumons et les ganglions (640). Les cellules NKT expriment des récepteurs de chemokines différents de ceux présents à la surface des LTm CD8 $^+$ telle que CXCR6 et CCR4, leur permettant ainsi d'avoir une localisation distincte aux LTm CD8 $^+$ et donc de ne pas être en compétition avec les LTm CD8 $^+$ pour l'IL-15 (640, 641).

Cette discussion essaye de mettre en évidence qu'une alliance est établie dans le système immunitaire de manière à ce que chaque cellule lui appartenant puisse survivre sans être en compétition avec les autres cellules du système immunitaire. Nous pouvons même supposer qu'il existe une cinétique d'expression de récepteur de chemokines entre les LT CD4 $^+$ et CD8 $^+$ pour éviter une entrée simultanée dans leurs niches homéostatiques

CONCLUSION

Dans cette thèse intitulée « Étude de l'implication du signal transmis par le récepteur des cellules T dans le développement et la survie des lymphocytes T mémoires », nous avons activement participé à l'avancement de la connaissance sur le développement des LTm. En effet, grâce à nos modèles d'études nous sommes les premiers à mettre en évidence *in vivo* :

(i) L'importance du nombre de RCT engagé dans l'amplitude de la réponse des LT CD8⁺ mais pas dans la génération des LTE et LTm ni dans l'acquisition des fonctions effectrices.

(ii) L'importance de l'avidité du signal RCT dans la génération des LTm mais pas dans l'expansion et ni dans l'acquisition des fonctions effectrices des LTE. De plus, nous mettons en évidence une corrélation entre l'avidité du signal du RCT et de la signature génique des LTE. Ceci sous-entend qu'un concept de programmation des LT par le signal RCT dans le choix de différenciation semble exister. De plus, ces travaux mettent en évidence l'implication d'une nouvelle molécule dans la génération des LTm : Nor-1. La compréhension de la voie de signalisation faisant intervenir Nor-1 permettrait de comprendre les signaux transmis par le RCT nécessaire pour le développement des LTm

(iii) L'absence de l'expression du RCT et donc de la signalisation du RCT dans la survie des LTm spécifiques d'un antigène.

Le principe de bien comprendre comment les LTm sont générés et comment les LTm survivent dans l'organisme est important puisque les LTm sont des cellules primordiales dans la protection à long terme de l'organisme et sont les cellules générées suite à une vaccination. La meilleure compréhension sur la génération et la survie des LTm permettra de développer des vaccins de meilleure qualité, et efficaces contre les maladies chroniques.

L'étude présentée dans l'article n°2 met en évidence que le nombre d'épitope peut rendre plus efficace une vaccination. L'utilisation des DCs pour la vaccination serait un beau moyen d'immunisation puisque les DCs offrent l'avantage de pouvoir

activer à la fois les CTL et LT « *helper* » et ont la capacité de migrer à travers les tissus périphériques à la recherche d'un antigène pour ensuite se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent l'antigène aux LTn. Cependant, l'obtention de DC est très difficile, car ces cellules sont rares et dispersées à travers tout l'organisme. Donc le concept de quantité d'épitope est important pour la vaccination, mais reste à trouver le meilleur moyen pour pouvoir vacciner les individus de manière efficace.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arens, R., K. Schepers, M. A. Nolte, M. F. van Oosterwijk, R. A. van Lier, T. N. Schumacher, and M. H. van Oers. 2004. Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8⁺ T cell formation. *The Journal of experimental medicine* 199:1595-1605.
2. Hansen, T. H., and M. Bouvier. 2009. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nature reviews* 9:503-513.
3. Landsverk, O. J., O. Bakke, and T. F. Gregers. 2009. MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain. *Scandinavian journal of immunology* 70:184-193.
4. Boyton, R. J., and D. M. Altmann. 2002. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends in immunology* 23:526-529.
5. Fazilleau, N., L. Mark, L. J. McHeyzer-Williams, and M. G. McHeyzer-Williams. 2009. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 30:324-335.
6. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng, and L. H. Glimcher. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual review of immunology* 21:713-758.
7. Paul, W. E., and R. A. Seder. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76:241-251.
8. Kaplan, M. H., U. Schindler, S. T. Smiley, and M. J. Grusby. 1996. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4:313-319.
9. Zheng, W., and R. A. Flavell. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89:587-596.
10. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 27:485-517.
11. Chen, Z., A. Laurence, and J. J. O'Shea. 2007. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Seminars in immunology* 19:400-408.
12. Vogelzang, A., H. M. McGuire, D. Yu, J. Sprent, C. R. Mackay, and C. King. 2008. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 29:127-137.
13. Nurieva, R. I., Y. Chung, D. Hwang, X. O. Yang, H. S. Kang, L. Ma, Y. H. Wang, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2008. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29:138-149.

14. McHeyzer-Williams, L. J., N. Pelletier, L. Mark, N. Fazilleau, and M. G. McHeyzer-Williams. 2009. Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity. *Current opinion in immunology* 21:266-273.
15. Fazilleau, N., L. J. McHeyzer-Williams, and M. G. McHeyzer-Williams. 2007. Local development of effector and memory T helper cells. *Current opinion in immunology* 19:259-267.
16. King, C., S. G. Tangye, and C. R. Mackay. 2008. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual review of immunology* 26:741-766.
17. Yu, D., S. Rao, L. M. Tsai, S. K. Lee, Y. He, E. L. Sutcliffe, M. Srivastava, M. Linterman, L. Zheng, N. Simpson, J. I. Ellyard, I. A. Parish, C. S. Ma, Q. J. Li, C. R. Parish, C. R. Mackay, and C. G. Vinuesa. 2009. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 31:457-468.
18. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nature reviews* 8:523-532.
19. Shevach, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30:636-645.
20. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y)* 299:1057-1061.
21. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22:329-341.
22. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4:330-336.
23. Curotto de Lafaille, M. A., and J. J. Lafaille. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30:626-635.
24. Josefowicz, S. Z., and A. Rudensky. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30:616-625.
25. Yannelli, J. R., J. A. Sullivan, G. L. Mandell, and V. H. Engelhard. 1986. Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. *J Immunol* 136:377-382.
26. Williams, M. A., and M. J. Bevan. 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annual review of immunology* 25:171-192.
27. Garcia, K. C., M. Degano, R. L. Stanfield, A. Brunmark, M. R. Jackson, P. A. Peterson, L. Teyton, and I. A. Wilson. 1996. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science (New York, N.Y)* 274:209-219.
28. Schumacher, T. N. 2002. T-cell-receptor gene therapy. *Nature reviews* 2:512-519.
29. Chothia, C., D. R. Boswell, and A. M. Lesk. 1988. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *The EMBO journal* 7:3745-3755.

30. Jorgensen, J. L., U. Esser, B. Fazekas de St Groth, P. A. Reay, and M. M. Davis. 1992. Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 355:224-230.
31. Sant'Angelo, D. B., G. Waterbury, P. Preston-Hurlburt, S. T. Yoon, R. Medzhitov, S. C. Hong, and C. A. Janeway, Jr. 1996. The specificity and orientation of a TCR to its peptide-MHC class II ligands. *Immunity* 4:367-376.
32. Gibbings, D., and A. D. Befus. 2009. CD4 and CD8: an inside-out coreceptor model for innate immune cells. *Journal of leukocyte biology* 86:251-259.
33. Janeway, C. A., Jr. 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annual review of immunology* 10:645-674.
34. Stone, J. D., A. S. Chervin, and D. M. Kranz. 2009. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* 126:165-176.
35. Vincent, S. D., N. R. Dunn, R. Sciammas, M. Shapiro-Shalef, M. M. Davis, K. Calame, E. K. Bikoff, and E. J. Robertson. 2005. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development* 132:1315-1325.
36. Sauer, H., L. Pratsch, J. Tschopp, S. Bhakdi, and R. Peters. 1991. Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. *Biochimica et biophysica acta* 1063:137-146.
37. Matsui, K., J. J. Boniface, P. Steffner, P. A. Reay, and M. M. Davis. 1994. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:12862-12866.
38. Sykulev, Y., A. Brunmark, M. Jackson, R. J. Cohen, P. A. Peterson, and H. N. Eisen. 1994. Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes. *Immunity* 1:15-22.
39. Weber, S., A. Traunecker, F. Oliveri, W. Gerhard, and K. Karjalainen. 1992. Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 356:793-796.
40. Davis, M. M., J. J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, and Y. Chien. 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annual review of immunology* 16:523-544.
41. Demotz, S., H. M. Grey, and A. Sette. 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science (New York, N.Y)* 249:1028-1030.
42. Hopfield, J. J. 1974. Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71:4135-4139.
43. Hopfield, J. J., T. Yamane, V. Yue, and S. M. Coutts. 1976. Direct experimental evidence for kinetic proofreading in amino acylation of tRNA^{Ala}. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73:1164-1168.

44. Ninio, J. 1975. Kinetic amplification of enzyme discrimination. *Biochimie* 57:587-595.
45. Yarus, M. 1992. Proofreading, NTPases and translation: successful increase in specificity. *Trends in biochemical sciences* 17:171-174.
46. Yarus, M. 1992. Proofreading, NTPases and translation: constraints on accurate biochemistry. *Trends in biochemical sciences* 17:130-133.
47. Burgess, S. M., and C. Guthrie. 1993. Beat the clock: paradigms for NTPases in the maintenance of biological fidelity. *Trends in biochemical sciences* 18:381-384.
48. McKeithan, T. W. 1995. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5042-5046.
49. Lyons, D. S., S. A. Lieberman, J. Hampl, J. J. Boniface, Y. Chien, L. J. Berg, and M. M. Davis. 1996. A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity* 5:53-61.
50. Rabinowitz, J. D., C. Beeson, D. S. Lyons, M. M. Davis, and H. M. McConnell. 1996. Kinetic discrimination in T-cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:1401-1405.
51. Risueno, R. M., D. Gil, E. Fernandez, F. Sanchez-Madrid, and B. Alarcon. 2005. Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood* 106:601-608.
52. Valitutti, S., and A. Lanzavecchia. 1997. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunology today* 18:299-304.
53. Padovan, E., G. Casorati, P. Dellabona, S. Meyer, M. Brockhaus, and A. Lanzavecchia. 1993. Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science (New York, N.Y)* 262:422-424.
54. Krangel, M. S. 1987. Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation. *The Journal of experimental medicine* 165:1141-1159.
55. Valitutti, S., S. Muller, M. Cella, E. Padovan, and A. Lanzavecchia. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375:148-151.
56. Evavold, B. D., and P. M. Allen. 1991. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science (New York, N.Y)* 252:1308-1310.
57. Sloan-Lancaster, J., A. S. Shaw, J. B. Rothbard, and P. M. Allen. 1994. Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 79:913-922.
58. De Magistris, M. T., J. Alexander, M. Coggeshall, A. Altman, F. C. Gaeta, H. M. Grey, and A. Sette. 1992. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* 68:625-634.

59. Madrenas, J., R. L. Wange, J. L. Wang, N. Isakov, L. E. Samelson, and R. N. Germain. 1995. Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science (New York, N.Y)* 267:515-518.
60. Kalergis, A. M., N. Boucheron, M. A. Doucey, E. Palmieri, E. C. Goyarts, Z. Vegh, I. F. Luescher, and S. G. Nathenson. 2001. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nature immunology* 2:229-234.
61. Bousso, P., N. R. Bhakta, R. S. Lewis, and E. Robey. 2002. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science (New York, N.Y)* 296:1876-1880.
62. Celli, S., F. Lemaitre, and P. Bousso. 2007. Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions in vivo reveals the importance of prolonged contacts for CD4+ T cell activation. *Immunity* 27:625-634.
63. Mempel, T. R., S. E. Henrickson, and U. H. Von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427:154-159.
64. Miller, M. J., S. H. Wei, I. Parker, and M. D. Cahalan. 2002. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science (New York, N.Y)* 296:1869-1873.
65. Nal, B., P. Carroll, E. Mohr, C. Verthuy, M. I. Da Silva, O. Gayet, X. J. Guo, H. T. He, A. Alcover, and P. Ferrier. 2004. Coronin-1 expression in T lymphocytes: insights into protein function during T cell development and activation. *International immunology* 16:231-240.
66. Miller, M. J., O. Safrina, I. Parker, and M. D. Cahalan. 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 200:847-856.
67. Garcia, Z., E. Pradelli, S. Celli, H. Beuneu, A. Simon, and P. Bousso. 2007. Competition for antigen determines the stability of T cell-dendritic cell interactions during clonal expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:4553-4558.
68. Huppa, J. B., M. Gleimer, C. Sumen, and M. M. Davis. 2003. Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nature immunology* 4:749-755.
69. Scholer, A., S. Hugues, A. Boissonnas, L. Fetler, and S. Amigorena. 2008. Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity* 28:258-270.
70. Jenkins, M. R., N. L. La Gruta, P. C. Doherty, J. A. Trapani, S. J. Turner, and N. J. Waterhouse. 2009. Visualizing CTL activity for different CD8+ effector T cells supports the idea that lower TCR/epitope avidity may be advantageous for target cell killing. *Cell death and differentiation* 16:537-542.
71. Maldonado, R. A., M. A. Soriano, L. C. Perdomo, K. Sigrist, D. J. Irvine, T. Decker, and L. H. Glimcher. 2009. Control of T helper cell differentiation through cytokine receptor inclusion in the immunological synapse. *The Journal of experimental medicine* 206:877-892.

72. Hao, S., and D. Baltimore. 2009. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nature immunology* 10:281-288.
73. Ansel, K. M., I. Djuretic, B. Tanasa, and A. Rao. 2006. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annual review of immunology* 24:607-656.
74. Dustin, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94:667-677.
75. Kupfer, A., and G. Dennert. 1984. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol* 133:2762-2766.
76. Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395:82-86.
77. Delon, J., and R. N. Germain. 2000. Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol* 10:R923-933.
78. Freiberg, B. A., H. Kupfer, W. Maslanik, J. Delli, J. Kappler, D. M. Zaller, and A. Kupfer. 2002. Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nature immunology* 3:911-917.
79. Blanchard, N., V. Di Bartolo, and C. Hivroz. 2002. In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17:389-399.
80. Allenspach, E. J., P. Cullinan, J. Tong, Q. Tang, A. G. Tesciuba, J. L. Cannon, S. M. Takahashi, R. Morgan, J. K. Burkhardt, and A. I. Sperling. 2001. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* 15:739-750.
81. Delon, J., K. Kaibuchi, and R. N. Germain. 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 15:691-701.
82. Varma, R., G. Campi, T. Yokosuka, T. Saito, and M. L. Dustin. 2006. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* 25:117-127.
83. Arstila, T. P., A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky. 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science (New York, N.Y)* 286:958-961.
84. Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science (New York, N.Y)* 285:221-227.
85. Lee, K. H., A. D. Holdorf, M. L. Dustin, A. C. Chan, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 2002. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science (New York, N.Y)* 295:1539-1542.

86. Yokosuka, T., K. Sakata-Sogawa, W. Kobayashi, M. Hiroshima, A. Hashimoto-Tane, M. Tokunaga, M. L. Dustin, and T. Saito. 2005. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nature immunology* 6:1253-1262.
87. Cemerski, S., J. Das, E. Giurisato, M. A. Markiewicz, P. M. Allen, A. K. Chakraborty, and A. S. Shaw. 2008. The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality. *Immunity* 29:414-422.
88. Campi, G., R. Varma, and M. L. Dustin. 2005. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *The Journal of experimental medicine* 202:1031-1036.
89. Yokosuka, T., and T. Saito. 2009. Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunological reviews* 229:27-40.
90. Li, X. C., D. M. Rothstein, and M. H. Sayegh. 2009. Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments. *Immunological reviews* 229:271-293.
91. Schwartz, R. H. 2003. T cell anergy. *Annual review of immunology* 21:305-334.
92. Linsley, P. S., E. A. Clark, and J. A. Ledbetter. 1990. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:5031-5035.
93. Shimizu, Y., G. A. van Seventer, E. Ennis, W. Newman, K. J. Horgan, and S. Shaw. 1992. Crosslinking of the T cell-specific accessory molecules CD7 and CD28 modulates T cell adhesion. *The Journal of experimental medicine* 175:577-582.
94. Rudd, C. E. 1996. Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* 4:527-534.
95. Schwartz, R. H. 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71:1065-1068.
96. Holdorf, A. D., K. H. Lee, W. R. Burack, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 2002. Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nature immunology* 3:259-264.
97. Frauwirth, K. A., J. L. Riley, M. H. Harris, R. V. Parry, J. C. Rathmell, D. R. Plas, R. L. Elstrom, C. H. June, and C. B. Thompson. 2002. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 16:769-777.
98. Viola, A., S. Schroeder, Y. Sakakibara, and A. Lanzavecchia. 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science (New York, N.Y)* 283:680-682.
99. Burack, W. R., K. H. Lee, A. D. Holdorf, M. L. Dustin, and A. S. Shaw. 2002. Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J Immunol* 169:2837-2841.
100. Acuto, O., and F. Michel. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature reviews* 3:939-951.

101. Green, J. M., P. J. Noel, A. I. Sperling, T. L. Walunas, G. S. Gray, J. A. Bluestone, and C. B. Thompson. 1994. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1:501-508.
102. Lucas, P. J., I. Negishi, K. Nakayama, L. E. Fields, and D. Y. Loh. 1995. Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response. *J Immunol* 154:5757-5768.
103. Gudmundsdottir, H., A. D. Wells, and L. A. Turka. 1999. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* 162:5212-5223.
104. Rulifson, I. C., A. I. Sperling, P. E. Fields, F. W. Fitch, and J. A. Bluestone. 1997. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol* 158:658-665.
105. Schweitzer, A. N., F. Borriello, R. C. Wong, A. K. Abbas, and A. H. Sharpe. 1997. Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. *J Immunol* 158:2713-2722.
106. Ferguson, S. E., S. Han, G. Kelsoe, and C. B. Thompson. 1996. CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol* 156:4576-4581.
107. Lane, P., C. Burdet, S. Hubele, D. Scheidegger, U. Muller, F. McConnell, and M. Kosco-Vilbois. 1994. B cell function in mice transgenic for mCTLA4-H gamma 1: lack of germinal centers correlated with poor affinity maturation and class switching despite normal priming of CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 179:819-830.
108. McAdam, A. J., A. N. Schweitzer, and A. H. Sharpe. 1998. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunological reviews* 165:231-247.
109. Herold, K. C., J. Lu, I. Rulifson, V. Vezys, D. Taub, M. J. Grusby, and J. A. Bluestone. 1997. Regulation of C-C chemokine production by murine T cells by CD28/B7 costimulation. *J Immunol* 159:4150-4153.
110. Park, W. R., C. S. Park, M. Tomura, H. J. Ahn, Y. Nakahira, M. Iwasaki, P. Gao, R. Abe, T. Hamaoka, and H. Fujiwara. 2001. CD28 costimulation is required not only to induce IL-12 receptor but also to render janus kinases/STAT4 responsive to IL-12 stimulation in TCR-triggered T cells. *European journal of immunology* 31:1456-1464.
111. Walker, L. S., A. Gulbranson-Judge, S. Flynn, T. Brocker, and P. J. Lane. 2000. Co-stimulation and selection for T-cell help for germinal centres: the role of CD28 and OX40. *Immunology today* 21:333-337.
112. Shahinian, A., K. Pfeffer, K. P. Lee, T. M. Kundig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P. S. Ohashi, C. B. Thompson, and T. W. Mak. 1993. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science (New York, N.Y)* 261:609-612.
113. Sharpe, A. H., and G. J. Freeman. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nature reviews* 2:116-126.
114. Boesteanu, A. C., and P. D. Katsikis. 2009. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Seminars in immunology* 21:69-77.

115. Masteller, E. L., E. Chuang, A. C. Mullen, S. L. Reiner, and C. B. Thompson. 2000. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol* 164:5319-5327.
116. Egen, J. G., M. S. Kuhns, and J. P. Allison. 2002. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nature immunology* 3:611-618.
117. Egen, J. G., and J. P. Allison. 2002. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16:23-35.
118. Collins, A. V., D. W. Brodie, R. J. Gilbert, A. Iaboni, R. Manso-Sancho, B. Walse, D. I. Stuart, P. A. van der Merwe, and S. J. Davis. 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17:201-210.
119. Linsley, P. S., J. L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J. A. Ledbetter, and R. Peach. 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1:793-801.
120. Pentcheva-Hoang, T., J. G. Egen, K. Wojnoonski, and J. P. Allison. 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21:401-413.
121. Marengere, L. E., P. Waterhouse, G. S. Duncan, H. W. Mittrucker, G. S. Feng, and T. W. Mak. 1996. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science (New York, N.Y)* 272:1170-1173.
122. Chuang, E., T. S. Fisher, R. W. Morgan, M. D. Robbins, J. M. Duerr, M. G. Vander Heiden, J. P. Gardner, J. E. Hambor, M. J. Neveu, and C. B. Thompson. 2000. The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13:313-322.
123. Lee, K. M., E. Chuang, M. Griffin, R. Khattri, D. K. Hong, W. Zhang, D. Straus, L. E. Samelson, C. B. Thompson, and J. A. Bluestone. 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science (New York, N.Y)* 282:2263-2266.
124. Schneider, H., E. Valk, S. da Rocha Dias, B. Wei, and C. E. Rudd. 2005. CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:12861-12866.
125. Coyle, A. J., S. Lehar, C. Lloyd, J. Tian, T. Delaney, S. Manning, T. Nguyen, T. Burwell, H. Schneider, J. A. Gonzalo, M. Gosselin, L. R. Owen, C. E. Rudd, and J. C. Gutierrez-Ramos. 2000. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13:95-105.
126. Beier, K. C., A. Hutloff, A. M. Dittrich, C. Heuck, A. Rauch, K. Buchner, B. Ludewig, H. D. Ochs, H. W. Mages, and R. A. Kroczeck. 2000. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *European journal of immunology* 30:3707-3717.
127. Okamoto, N., K. Tezuka, M. Kato, R. Abe, and T. Tsuji. 2003. PI3-kinase and MAP-kinase signaling cascades in AILIM/ICOS- and CD28-costimulated T-cells have distinct functions between cell proliferation and IL-10 production. *Biochemical and biophysical research communications* 310:691-702.

128. Parry, R. V., C. A. Rumbley, L. H. Vandenberghe, C. H. June, and J. L. Riley. 2003. CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *J Immunol* 171:166-174.
129. Yagi, J., Y. Arimura, U. Dianzani, T. Uede, T. Okamoto, and T. Uchiyama. 2003. Regulatory roles of IL-2 and IL-4 in H4/inducible costimulator expression on activated CD4+ T cells during Th cell development. *J Immunol* 171:783-794.
130. Harada, Y., D. Ohgai, R. Watanabe, K. Okano, O. Koiwai, K. Tanabe, H. Toma, A. Altman, and R. Abe. 2003. A single amino acid alteration in cytoplasmic domain determines IL-2 promoter activation by ligation of CD28 but not inducible costimulator (ICOS). *The Journal of experimental medicine* 197:257-262.
131. Kopf, M., A. J. Coyle, N. Schmitz, M. Barner, A. Oxenius, A. Gallimore, J. C. Gutierrez-Ramos, and M. F. Bachmann. 2000. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *The Journal of experimental medicine* 192:53-61.
132. Rousset, F., E. Garcia, T. Defrance, C. Peronne, N. Vezzio, D. H. Hsu, R. Kastelein, K. W. Moore, and J. Banchereau. 1992. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:1890-1893.
133. Nakae, S., H. Suto, M. Iikura, M. Kakurai, J. D. Sedgwick, M. Tsai, and S. J. Galli. 2006. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J Immunol* 176:2238-2248.
134. Parry, R. V., J. M. Chemnitz, K. A. Frauwirth, A. R. Lanfranco, I. Braunstein, S. V. Kobayashi, P. S. Linsley, C. B. Thompson, and J. L. Riley. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology* 25:9543-9553.
135. Nishimura, H., N. Minato, T. Nakano, and T. Honjo. 1998. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *International immunology* 10:1563-1572.
136. Salama, A. D., T. Chitnis, J. Imitola, M. J. Ansari, H. Akiba, F. Tushima, M. Azuma, H. Yagita, M. H. Sayegh, and S. J. Khoury. 2003. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 198:71-78.
137. Paterson, D. J., W. A. Jefferies, J. R. Green, M. R. Brandon, P. Corthesy, M. Puklavec, and A. F. Williams. 1987. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Molecular immunology* 24:1281-1290.
138. Gramaglia, I., A. D. Weinberg, M. Lemon, and M. Croft. 1998. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* 161:6510-6517.
139. Croft, M. 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nature reviews* 3:609-620.

140. Murata, K., N. Ishii, H. Takano, S. Miura, L. C. Ndhlovu, M. Nose, T. Noda, and K. Sugamura. 2000. Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *The Journal of experimental medicine* 191:365-374.
141. Kopf, M., C. Ruedl, N. Schmitz, A. Gallimore, K. Lefrang, B. Ecabert, B. Odermatt, and M. F. Bachmann. 1999. OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection. *Immunity* 11:699-708.
142. Chen, A. I., A. J. McAdam, J. E. Buhlmann, S. Scott, M. L. Lupper, Jr., E. A. Greenfield, P. R. Baum, W. C. Fanslow, D. M. Calderhead, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 1999. Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity* 11:689-698.
143. Pippig, S. D., C. Pena-Rossi, J. Long, W. R. Godfrey, D. J. Fowell, S. L. Reiner, M. L. Birkeland, R. M. Locksley, A. N. Barclay, and N. Killeen. 1999. Robust B cell immunity but impaired T cell proliferation in the absence of CD134 (OX40). *J Immunol* 163:6520-6529.
144. Gramaglia, I., A. Jember, S. D. Pippig, A. D. Weinberg, N. Killeen, and M. Croft. 2000. The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *J Immunol* 165:3043-3050.
145. Maxwell, J. R., A. Weinberg, R. A. Prell, and A. T. Vella. 2000. Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion. *J Immunol* 164:107-112.
146. Brocker, T., A. Gulbranson-Judge, S. Flynn, M. Riedinger, C. Raykundalia, and P. Lane. 1999. CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles. *European journal of immunology* 29:1610-1616.
147. Salek-Ardakani, S., and M. Croft. 2006. Regulation of CD4 T cell memory by OX40 (CD134). *Vaccine* 24:872-883.
148. Weinberg, A. D., D. E. Evans, C. Thalhoffer, T. Shi, and R. A. Prell. 2004. The generation of T cell memory: a review describing the molecular and cellular events following OX40 (CD134) engagement. *Journal of leukocyte biology* 75:962-972.
149. Rogers, P. R., J. Song, I. Gramaglia, N. Killeen, and M. Croft. 2001. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15:445-455.
150. Kwon, B. S., and S. M. Weissman. 1989. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:1963-1967.
151. Goodwin, R. G., W. S. Din, T. Davis-Smith, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. A. Sato, C. R. Maliszewski, C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and et al. 1993. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *European journal of immunology* 23:2631-2641.

152. Kwon, B. S., D. P. Kestler, Z. Eshhar, K. O. Oh, and M. Wakulchik. 1989. Expression characteristics of two potential T cell mediator genes. *Cellular immunology* 121:414-422.
153. Pollok, K. E., S. H. Kim, and B. S. Kwon. 1995. Regulation of 4-1BB expression by cell-cell interactions and the cytokines, interleukin-2 and interleukin-4. *European journal of immunology* 25:488-494.
154. Pollok, K. E., Y. J. Kim, Z. Zhou, J. Hurtado, K. K. Kim, R. T. Pickard, and B. S. Kwon. 1993. Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* 150:771-781.
155. Schwarz, H., J. Valbracht, J. Tuckwell, J. von Kempis, and M. Lotz. 1995. ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood* 85:1043-1052.
156. Gramaglia, I., D. Cooper, K. T. Miner, B. S. Kwon, and M. Croft. 2000. Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. *European journal of immunology* 30:392-402.
157. Shuford, W. W., K. Klussman, D. D. Tritchler, D. T. Loo, J. Chalupny, A. W. Siadak, T. J. Brown, J. Emswiler, H. Raecho, C. P. Larsen, T. C. Pearson, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, and R. S. Mittler. 1997. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *The Journal of experimental medicine* 186:47-55.
158. Saoulli, K., S. Y. Lee, J. L. Cannons, W. C. Yeh, A. Santana, M. D. Goldstein, N. Bangia, M. A. DeBenedette, T. W. Mak, Y. Choi, and T. H. Watts. 1998. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *The Journal of experimental medicine* 187:1849-1862.
159. DeBenedette, M. A., T. Wen, M. F. Bachmann, P. S. Ohashi, B. H. Barber, K. L. Stocking, J. J. Peschon, and T. H. Watts. 1999. Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J Immunol* 163:4833-4841.
160. Tan, J. T., J. K. Whitmire, R. Ahmed, T. C. Pearson, and C. P. Larsen. 1999. 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* 163:4859-4868.
161. Tan, J. T., J. K. Whitmire, K. Murali-Krishna, R. Ahmed, J. D. Altman, R. S. Mittler, A. Sette, T. C. Pearson, and C. P. Larsen. 2000. 4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination. *J Immunol* 164:2320-2325.
162. Bertram, E. M., W. Dawicki, B. Sedgmen, J. L. Bramson, D. H. Lynch, and T. H. Watts. 2004. A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo. *J Immunol* 172:981-988.
163. Cooper, D., P. Bansal-Pakala, and M. Croft. 2002. 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but does not contribute to the development of cytotoxicity. *European journal of immunology* 32:521-529.

164. Paulie, S., B. Ehlin-Henriksson, H. Mellstedt, H. Koho, H. Ben-Aissa, and P. Perlmann. 1985. A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 20:23-28.
165. Schonbeck, U., and P. Libby. 2001. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 58:4-43.
166. Allen, R. C., R. J. Armitage, M. E. Conley, H. Rosenblatt, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, M. A. Bedell, S. Edelhoff, C. M. Disteché, D. K. Simoneaux, and et al. 1993. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science (New York, N.Y)* 259:990-993.
167. Korthauer, U., D. Graf, H. W. Mages, F. Briere, M. Padayachee, S. Malcolm, A. G. Ugazio, L. D. Notarangelo, R. J. Levinsky, and R. A. Kroczeck. 1993. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361:539-541.
168. DiSanto, J. P., J. Y. Bonnefoy, J. F. Gauchat, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 1993. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361:541-543.
169. Aruffo, A., M. Farrington, D. Hollenbaugh, X. Li, A. Milatovich, S. Nonoyama, J. Bajorath, L. S. Grosmaire, R. Stenkamp, M. Neubauer, and et al. 1993. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 72:291-300.
170. Ramesh, N., R. Fuleihan, V. Ramesh, S. Lederman, M. J. Yellin, S. Sharma, L. Chess, F. S. Rosen, and R. S. Geha. 1993. Deletions in the ligand for CD40 in X-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM (HIGMX-1). *International immunology* 5:769-773.
171. Armitage, R. J., B. M. Macduff, M. K. Spriggs, and W. C. Fanslow. 1993. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J Immunol* 150:3671-3680.
172. Bishop, G. A., and B. S. Hostager. 2001. Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation. *Immunologic research* 24:97-109.
173. Gray, D., K. Siepmann, and G. Wohlleben. 1994. CD40 ligation in B cell activation, isotype switching and memory development. *Seminars in immunology* 6:303-310.
174. Callard, R. E., R. J. Armitage, W. C. Fanslow, and M. K. Spriggs. 1993. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunology today* 14:559-564.
175. Notarangelo, L. D., M. Duse, and A. G. Ugazio. 1992. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodeficiency reviews* 3:101-121.
176. Grewal, I. S., J. Xu, and R. A. Flavell. 1995. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 378:617-620.
177. van Essen, D., H. Kikutani, and D. Gray. 1995. CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature* 378:620-623.
178. Balasa, B., T. Krahl, G. Patstone, J. Lee, R. Tisch, H. O. McDevitt, and N. Sarvetnick. 1997. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 159:4620-4627.

179. Griggs, N. D., S. S. Agersborg, R. J. Noelle, J. A. Ledbetter, P. S. Linsley, and K. S. Tung. 1996. The relative contribution of the CD28 and gp39 costimulatory pathways in the clonal expansion and pathogenic acquisition of self-reactive T cells. *The Journal of experimental medicine* 183:801-810.
180. Durie, F. H., R. A. Fava, T. M. Foy, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, and R. J. Noelle. 1993. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science (New York, N.Y)* 261:1328-1330.
181. Gerritse, K., J. D. Laman, R. J. Noelle, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, W. J. Boersma, and E. Claassen. 1996. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:2499-2504.
182. Vogel, L. A., and R. J. Noelle. 1998. CD40 and its crucial role as a member of the TNFR family. *Seminars in immunology* 10:435-442.
183. Clark, L. B., T. M. Foy, and R. J. Noelle. 1996. CD40 and its ligand. *Advances in immunology* 63:43-78.
184. Van Kooten, C., and J. Banchereau. 1996. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Advances in immunology* 61:1-77.
185. Boussiotis, V. A., D. L. Barber, T. Nakarai, G. J. Freeman, J. G. Gribben, G. M. Bernstein, A. D. D'Andrea, J. Ritz, and L. M. Nadler. 1994. Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. *Science (New York, N.Y)* 266:1039-1042.
186. Burdin, N., C. Van Kooten, L. Galibert, J. S. Abrams, J. Wijdenes, J. Banchereau, and F. Rousset. 1995. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol* 154:2533-2544.
187. Worm, M., and R. S. Geha. 1994. CD40 ligation induces lymphotoxin alpha gene expression in human B cells. *International immunology* 6:1883-1890.
188. Anderson, D. C., and T. A. Springer. 1987. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annual review of medicine* 38:175-194.
189. Kishimoto, T. K., N. Hollander, T. M. Roberts, D. C. Anderson, and T. A. Springer. 1987. Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell* 50:193-202.
190. Kim, M., C. V. Carman, and T. A. Springer. 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science (New York, N.Y)* 301:1720-1725.
191. Shimaoka, M., C. Lu, R. T. Palframan, U. H. von Andrian, A. McCormack, J. Takagi, and T. A. Springer. 2001. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin alphaL I domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:6009-6014.
192. Lu, C., M. Shimaoka, Q. Zang, J. Takagi, and T. A. Springer. 2001. Locking in alternate conformations of the integrin alphaLbeta2 I domain with disulfide bonds

reveals functional relationships among integrin domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2393-2398.

193. Hughes, P. E., F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J. A. McDonald, S. J. Shattil, and M. H. Ginsberg. 1996. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *The Journal of biological chemistry* 271:6571-6574.

194. Lu, C. F., and T. A. Springer. 1997. The alpha subunit cytoplasmic domain regulates the assembly and adhesiveness of integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *J Immunol* 159:268-278.

195. Lu, C., J. Takagi, and T. A. Springer. 2001. Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *The Journal of biological chemistry* 276:14642-14648.

196. Vinogradova, O., A. Velyvis, A. Velyviene, B. Hu, T. Haas, E. Plow, and J. Qin. 2002. A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 110:587-597.

197. Weljie, A. M., P. M. Hwang, and H. J. Vogel. 2002. Solution structures of the cytoplasmic tail complex from platelet integrin alpha IIb- and beta 3-subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:5878-5883.

198. Li, R., C. R. Babu, J. D. Lear, A. J. Wand, J. S. Bennett, and W. F. DeGrado. 2001. Oligomerization of the integrin alphaIIb beta3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12462-12467.

199. Ulmer, T. S., B. Yaspan, M. H. Ginsberg, and I. D. Campbell. 2001. NMR analysis of structure and dynamics of the cytosolic tails of integrin alpha IIb beta 3 in aqueous solution. *Biochemistry* 40:7498-7508.

200. Wulfig, C., and M. M. Davis. 1998. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science (New York, N.Y)* 282:2266-2269.

201. Dustin, M. L., and T. A. Springer. 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341:619-624.

202. Bachmann, M. F., K. McCall-Faienza, R. Schmits, D. Bouchard, J. Beach, D. E. Speiser, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. 1997. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 7:549-557.

203. Goldrath, A. W., and M. J. Bevan. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402:255-262.

204. Weninger, W., M. A. Crowley, N. Manjunath, and U. H. von Andrian. 2001. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* 194:953-966.

205. Manjunath, N., P. Shankar, J. Wan, W. Weninger, M. A. Crowley, K. Hieshima, T. A. Springer, X. Fan, H. Shen, J. Lieberman, and U. H. von Andrian. 2001. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 108:871-878.

206. Vijh, S., and E. G. Pamer. 1997. Immunodominant and subdominant CTL responses to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 158:3366-3371.

207. Wherry, E. J., K. A. Puorro, A. Porgador, and L. C. Eisenlohr. 1999. The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: responses rise steadily until excessively high levels of epitope are attained. *J Immunol* 163:3735-3745.
208. Kaech, S. M., and R. Ahmed. 2001. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nature immunology* 2:415-422.
209. Mercado, R., S. Vijh, S. E. Allen, K. Kerksiek, I. M. Pilip, and E. G. Pamer. 2000. Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* 165:6833-6839.
210. Kedl, R. M., W. A. Rees, D. A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *The Journal of experimental medicine* 192:1105-1113.
211. Ludewig, B., S. Ehl, U. Karrer, B. Odermatt, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1998. Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity. *Journal of virology* 72:3812-3818.
212. Seder, R. A., and R. Ahmed. 2003. Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation. *Nature immunology* 4:835-842.
213. van Stipdonk, M. J., E. E. Lemmens, and S. P. Schoenberger. 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nature immunology* 2:423-429.
214. Wong, P., and E. G. Pamer. 2001. Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation. *J Immunol* 166:5864-5868.
215. Muralitharan, S., Y. A. Wali, D. Dennison, Z. A. Lamki, M. Zachariah, B. Nagwa el, A. Pathare, and R. Krishnamoorthy. 2007. Novel spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in ethnic Omani patients. *American journal of hematology* 82:1099-1102.
216. Stepp, S. E., R. Dufourcq-Lagelouse, F. Le Deist, S. Bhawan, S. Certain, P. A. Mathew, J. I. Henter, M. Bennett, A. Fischer, G. de Saint Basile, and V. Kumar. 1999. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science (New York, N.Y)* 286:1957-1959.
217. Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369:31-37.
218. Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, and P. Golstein. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science (New York, N.Y)* 265:528-530.
219. Smyth, M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, D. MacGregor, D. I. Godfrey, and J. A. Trapani. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 192:755-760.
220. Peters, P. J., J. Borst, V. Oorschot, M. Fukuda, O. Krahenbuhl, J. Tschopp, J. W. Slot, and H. J. Geuze. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes,

containing both perforin and granzymes. *The Journal of experimental medicine* 173:1099-1109.

221. Voskoboinik, I., M. C. Thia, J. Fletcher, A. Ciccone, K. Browne, M. J. Smyth, and J. A. Trapani. 2005. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *The Journal of biological chemistry* 280:8426-8434.

222. Liu, C. C., C. M. Walsh, and J. D. Young. 1995. Perforin: structure and function. *Immunology today* 16:194-201.

223. Kawasaki, Y., T. Saito, Y. Shiota-Someya, Y. Ikegami, H. Komano, M. H. Lee, C. J. Froelich, N. Shinohara, and H. Takayama. 2000. Cell death-associated translocation of plasma membrane components induced by CTL. *J Immunol* 164:4641-4648.

224. Metkar, S. S., B. Wang, M. Aguilar-Santelises, S. M. Raja, L. Uhlin-Hansen, E. Podack, J. A. Trapani, and C. J. Froelich. 2002. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16:417-428.

225. Motyka, B., G. Korbitt, M. J. Pinkoski, J. A. Heibein, A. Caputo, M. Hobman, M. Barry, I. Shostak, T. Sawchuk, C. F. Holmes, J. Gauldie, and R. C. Bleackley. 2000. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103:491-500.

226. Bi, G. Q., J. M. Alderton, and R. A. Steinhardt. 1995. Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *The Journal of cell biology* 131:1747-1758.

227. McNeil, P. L., and R. A. Steinhardt. 2003. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annual review of cell and developmental biology* 19:697-731.

228. Miyake, K., and P. L. McNeil. 1995. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *The Journal of cell biology* 131:1737-1745.

229. Reddy, A., E. V. Caler, and N. W. Andrews. 2001. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106:157-169.

230. Steinhardt, R. A., G. Bi, and J. M. Alderton. 1994. Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science (New York, N.Y)* 263:390-393.

231. Chavez-Galan, L., M. C. Arenas-Del Angel, E. Zenteno, R. Chavez, and R. Lascrain. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & molecular immunology* 6:15-25.

232. Nakajima, H., H. L. Park, and P. A. Henkart. 1995. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *The Journal of experimental medicine* 181:1037-1046.

233. Pasternack, M. S., and H. N. Eisen. 1985. A novel serine esterase expressed by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 314:743-745.

234. Gershenfeld, H. K., and I. L. Weissman. 1986. Cloning of a cDNA for a T cell-specific serine protease from a cytotoxic T lymphocyte. *Science (New York, N.Y)* 232:854-858.
235. Beresford, P. J., C. M. Kam, J. C. Powers, and J. Lieberman. 1997. Recombinant human granzyme A binds to two putative HLA-associated proteins and cleaves one of them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:9285-9290.
236. Fan, Z., P. J. Beresford, D. Zhang, and J. Lieberman. 2002. HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Molecular and cellular biology* 22:2810-2820.
237. Waterhouse, N. J., K. A. Sedelies, and J. A. Trapani. 2006. Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunology and cell biology* 84:72-78.
238. Metkar, S. S., B. Wang, M. L. Ebbs, J. H. Kim, Y. J. Lee, S. M. Raja, and C. J. Froelich. 2003. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *The Journal of cell biology* 160:875-885.
239. Bi, L. L., G. Pan, T. P. Atkinson, L. Zheng, J. K. Dale, C. Makris, V. Reddy, J. M. McDonald, R. M. Siegel, J. M. Puck, M. J. Lenardo, and S. E. Straus. 2007. Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC medical genetics* 8:41.
240. Carrington, P. E., C. Sandu, Y. Wei, J. M. Hill, G. Morisawa, T. Huang, E. Gavathiotis, Y. Wei, and M. H. Werner. 2006. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Molecular cell* 22:599-610.
241. Shedlock, D. J., J. K. Whitmire, J. Tan, A. S. MacDonald, R. Ahmed, and H. Shen. 2003. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 170:2053-2063.
242. Janssen, E. M., N. M. Droin, E. E. Lemmens, M. J. Pinkoski, S. J. Bensinger, B. D. Ehst, T. S. Griffith, D. R. Green, and S. P. Schoenberger. 2005. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434:88-93.
243. Festjens, N., T. Vanden Berghe, S. Cornelis, and P. Vandenabeele. 2007. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell death and differentiation* 14:400-410.
244. Varfolomeev, E., and D. Vucic. 2008. (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFkappaB signaling pathways. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7:1511-1521.
245. Barnhart, B. C., P. Legembre, E. Pietras, C. Bubici, G. Franzoso, and M. E. Peter. 2004. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *The EMBO journal* 23:3175-3185.
246. Desbarats, J., R. B. Birge, M. Mimouni-Rongy, D. E. Weinstein, J. S. Palerme, and M. K. Newell. 2003. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nature cell biology* 5:118-125.

247. Legembre, P., B. C. Barnhart, L. Zheng, S. Vijayan, S. E. Straus, J. Puck, J. K. Dale, M. Lenardo, and M. E. Peter. 2004. Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO reports* 5:1084-1089.
248. Peter, M. E., P. Legembre, and B. C. Barnhart. 2005. Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochimica et biophysica acta* 1755:25-36.
249. Zuliani, C., S. Kleber, S. Klussmann, T. Wenger, M. Kenzelmann, N. Schreglmann, A. Martinez, J. A. del Rio, E. Soriano, P. Vodrazka, R. Kuner, H. J. Groene, I. Herr, P. H. Krammer, and A. Martin-Villalba. 2006. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell death and differentiation* 13:31-40.
250. Micheau, O., and J. Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-190.
251. Wang, L., F. Du, and X. Wang. 2008. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133:693-703.
252. Varfolomeev, E., H. Maecker, D. Sharp, D. Lawrence, M. Renz, D. Vucic, and A. Ashkenazi. 2005. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of biological chemistry* 280:40599-40608.
253. Lavrik, I. N., A. Golks, and P. H. Krammer. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of clinical investigation* 115:2665-2672.
254. Thornberry, N. A., and Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science (New York, N.Y)* 281:1312-1316.
255. Igney, F. H., and P. H. Krammer. 2002. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of leukocyte biology* 71:907-920.
256. Thornberry, N. A. 1998. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chemistry & biology* 5:R97-103.
257. Ashkenazi, A., and V. M. Dixit. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y)* 281:1305-1308.
258. Ashkenazi, A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2:420-430.
259. Krammer, P. H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-795.
260. Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh, and P. H. Schlesinger. 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell death and differentiation* 7:1166-1173.
261. Rodriguez, I., K. Matsuura, C. Ody, S. Nagata, and P. Vassalli. 1996. Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *The Journal of experimental medicine* 184:2067-2072.
262. Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer. 2001.

Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y)* 292:727-730.

263. Algeciras-Schimmich, A., T. S. Griffith, D. H. Lynch, and C. V. Paya. 1999. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 162:5205-5211.

264. Refaeli, Y., L. Van Parijs, C. A. London, J. Tschopp, and A. K. Abbas. 1998. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8:615-623.

265. Schmitz, I., H. Weyd, A. Krueger, S. Baumann, S. C. Fas, P. H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2004. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J Immunol* 172:2194-2200.

266. Schmitz, I., A. Krueger, S. Baumann, H. Schulze-Bergkamen, P. H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2003. An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol* 171:2930-2936.

267. Kirchhoff, S., W. W. Muller, A. Krueger, I. Schmitz, and P. H. Krammer. 2000. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 165:6293-6300.

268. Krammer, P. H., R. Arnold, and I. N. Lavrik. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nature reviews* 7:532-542.

269. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 87:99-163.

270. Erlacher, M., E. M. Michalak, P. N. Kelly, V. Labi, H. Niederegger, L. Coultas, J. M. Adams, A. Strasser, and A. Villunger. 2005. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106:4131-4138.

271. Hildeman, D. A., Y. Zhu, T. C. Mitchell, P. Bouillet, A. Strasser, J. Kappler, and P. Murrack. 2002. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* 16:759-767.

272. Shi, Y. F., B. M. Sahai, and D. R. Green. 1989. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 339:625-626.

273. Lenardo, M., K. M. Chan, F. Hornung, H. McFarland, R. Siegel, J. Wang, and L. Zheng. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annual review of immunology* 17:221-253.

274. Dhein, J., H. Walczak, C. Baumler, K. M. Debatin, and P. H. Krammer. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373:438-441.

275. Trauth, B. C., C. Klas, A. M. Peters, S. Matzku, P. Moller, W. Falk, K. M. Debatin, and P. H. Krammer. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science (New York, N.Y)* 245:301-305.

276. Sytwu, H. K., R. S. Liblau, and H. O. McDevitt. 1996. The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 5:17-30.

277. Martinez-Lorenzo, M. J., M. A. Alava, S. Gamen, K. J. Kim, A. Chuntharapai, A. Pineiro, J. Naval, and A. Anel. 1998. Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *European journal of immunology* 28:2714-2725.
278. Cantrell, D. A., and K. A. Smith. 1984. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science (New York, N.Y)* 224:1312-1316.
279. Lenardo, M. J. 1991. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353:858-861.
280. Kneitz, B., T. Herrmann, S. Yonehara, and A. Schimpl. 1995. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *European journal of immunology* 25:2572-2577.
281. Scaffidi, C., I. Schmitz, J. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *The Journal of biological chemistry* 274:22532-22538.
282. Van Parijs, L., Y. Refaeli, J. D. Lord, B. H. Nelson, A. K. Abbas, and D. Baltimore. 1999. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* 11:281-288.
283. Trimarchi, J. M., and J. A. Lees. 2002. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:11-20.
284. Levrero, M., V. De Laurenzi, A. Costanzo, J. Gong, J. Y. Wang, and G. Melino. 2000. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *Journal of cell science* 113 (Pt 10):1661-1670.
285. Lissy, N. A., P. K. Davis, M. Irwin, W. G. Kaelin, and S. F. Dowdy. 2000. A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature* 407:642-645.
286. Irwin, M., M. C. Marin, A. C. Phillips, R. S. Seelan, D. I. Smith, W. Liu, E. R. Flores, K. Y. Tsai, T. Jacks, K. H. Vousden, and W. G. Kaelin, Jr. 2000. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 407:645-648.
287. Brunner, T., R. J. Mogil, D. LaFace, N. J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S. J. Martin, W. R. Force, D. H. Lynch, C. F. Ware, and et al. 1995. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373:441-444.
288. Bonfoco, E., P. M. Stuart, T. Brunner, T. Lin, T. S. Griffith, Y. Gao, H. Nakajima, P. A. Henkart, T. A. Ferguson, and D. R. Green. 1998. Inducible nonlymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. *Immunity* 9:711-720.
289. Mountz, J. D., H. Bluethmann, T. Zhou, and J. Wu. 1994. Defective clonal deletion and anergy induction in TCR transgenic lpr/lpr mice. *Seminars in immunology* 6:27-37.
290. Mixter, P. F., J. Q. Russell, and R. C. Budd. 1994. Delayed kinetics of T lymphocyte anergy and deletion in lpr mice. *Journal of autoimmunity* 7:697-710.

291. Zheng, L., G. Fisher, R. E. Miller, J. Peschon, D. H. Lynch, and M. J. Lenardo. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377:348-351.
292. Strasser, A., and M. Pellegrini. 2004. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends in immunology* 25:610-615.
293. Hildeman, D. A., T. Mitchell, T. K. Teague, P. Henson, B. J. Day, J. Kappler, and P. C. Marrack. 1999. Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* 10:735-744.
294. Suzuki, A., M. T. Yamaguchi, T. Ohteki, T. Sasaki, T. Kaisho, Y. Kimura, R. Yoshida, A. Wakeham, T. Higuchi, M. Fukumoto, T. Tsubata, P. S. Ohashi, S. Koyasu, J. M. Penninger, T. Nakano, and T. W. Mak. 2001. T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* 14:523-534.
295. Green, D. R., and J. C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y)* 281:1309-1312.
296. Gross, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 13:1899-1911.
297. Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 15:2922-2933.
298. Huang, D. C., and A. Strasser. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103:839-842.
299. Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, and N. Tanaka. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science (New York, N.Y)* 288:1053-1058.
300. Nakano, K., and K. H. Vousden. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell* 7:683-694.
301. Yu, J., L. Zhang, P. M. Hwang, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular cell* 7:673-682.
302. Bouillet, P., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, H. Puthalakath, L. O'Connor, S. Cory, J. M. Adams, and A. Strasser. 2000. The role of the pro-apoptotic Bcl-2 family member bim in physiological cell death. *Annals of the New York Academy of Sciences* 926:83-89.
303. Kerstan, A., and T. Hunig. 2004. Cutting edge: distinct TCR- and CD28-derived signals regulate CD95L, Bcl-xL, and the survival of primary T cells. *J Immunol* 172:1341-1345.
304. Golks, A., D. Brenner, P. H. Krammer, and I. N. Lavrik. 2006. The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. *The Journal of experimental medicine* 203:1295-1305.
305. Budd, R. C., W. C. Yeh, and J. Tschopp. 2006. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature reviews* 6:196-204.
306. Kamata, H., S. Honda, S. Maeda, L. Chang, H. Hirata, and M. Karin. 2005. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120:649-661.

307. Pham, C. G., C. Bubici, F. Zazzeroni, S. Papa, J. Jones, K. Alvarez, S. Jayawardena, E. De Smaele, R. Cong, C. Beaumont, F. M. Torti, S. V. Torti, and G. Franzoso. 2004. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell* 119:529-542.
308. Hildeman, D. A., T. Mitchell, B. Aronow, S. Wojciechowski, J. Kappler, and P. Marrack. 2003. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:15035-15040.
309. Wan, Y. Y., and J. DeGregori. 2003. The survival of antigen-stimulated T cells requires NFkappaB-mediated inhibition of p73 expression. *Immunity* 18:331-342.
310. Ruland, J., and T. W. Mak. 2003. From antigen to activation: specific signal transduction pathways linking antigen receptors to NF-kappaB. *Seminars in immunology* 15:177-183.
311. Weil, R., and A. Israel. 2006. Deciphering the pathway from the TCR to NF-kappaB. *Cell death and differentiation* 13:826-833.
312. Liou, J., F. Kiefer, A. Dang, A. Hashimoto, M. H. Cobb, T. Kurosaki, and A. Weiss. 2000. HPK1 is activated by lymphocyte antigen receptors and negatively regulates AP-1. *Immunity* 12:399-408.
313. Liu, S. K., C. A. Smith, R. Arnold, F. Kiefer, and C. J. McGlade. 2000. The adaptor protein Gads (Grb2-related adaptor downstream of Shc) is implicated in coupling hemopoietic progenitor kinase-1 to the activated TCR. *J Immunol* 165:1417-1426.
314. Brenner, D., A. Golks, F. Kiefer, P. H. Krammer, and R. Arnold. 2005. Activation or suppression of NFkappaB by HPK1 determines sensitivity to activation-induced cell death. *The EMBO journal* 24:4279-4290.
315. Guicciardi, M. E., J. Deussing, H. Miyoshi, S. F. Bronk, P. A. Svingen, C. Peters, S. H. Kaufmann, and G. J. Gores. 2000. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *The Journal of clinical investigation* 106:1127-1137.
316. Bidere, N., H. K. Lorenzo, S. Carmona, M. Laforge, F. Harper, C. Dumont, and A. Senik. 2003. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 278:31401-31411.
317. Boya, P., K. Andreau, D. Poncet, N. Zamzami, J. L. Perfettini, D. Metivier, D. M. Ojcius, M. Jaattela, and G. Kroemer. 2003. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *The Journal of experimental medicine* 197:1323-1334.
318. Deiss, L. P., H. Galinka, H. Berissi, O. Cohen, and A. Kimchi. 1996. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *The EMBO journal* 15:3861-3870.
319. Turk, V., B. Turk, and D. Turk. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO journal* 20:4629-4633.
320. Vancompernelle, K., F. Van Herreweghe, G. Pynaert, M. Van de Craen, K. De Vos, N. Totty, A. Sterling, W. Fiers, P. Vandenabeele, and J. Grooten. 1998.

Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS letters* 438:150-158.

321. Schotte, P., W. Van Criekinge, M. Van de Craen, G. Van Loo, M. Desmedt, J. Grooten, M. Cornelissen, L. De Ridder, J. Vandekerckhove, W. Fiers, P. Vandenabeele, and R. Beyaert. 1998. Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochemical and biophysical research communications* 251:379-387.

322. Foghsgaard, L., D. Wissing, D. Mauch, U. Lademann, L. Bastholm, M. Boes, F. Elling, M. Leist, and M. Jaattela. 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *The Journal of cell biology* 153:999-1010.

323. Sohn, S. J., J. Thompson, and A. Winoto. 2007. Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. *Current opinion in immunology* 19:510-515.

324. Winoto, A., and D. R. Littman. 2002. Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell* 109 Suppl:S57-66.

325. Woronicz, J. D., B. Calnan, V. Ngo, and A. Winoto. 1994. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 367:277-281.

326. Liu, Z. G., S. W. Smith, K. A. McLaughlin, L. M. Schwartz, and B. A. Osborne. 1994. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 367:281-284.

327. Calnan, B. J., S. Szychowski, F. K. Chan, D. Cado, and A. Winoto. 1995. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 3:273-282.

328. Zhou, T., J. Cheng, P. Yang, Z. Wang, C. Liu, X. Su, H. Bluethmann, and J. D. Mountz. 1996. Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *The Journal of experimental medicine* 183:1879-1892.

329. Cheng, L. E., F. K. Chan, D. Cado, and A. Winoto. 1997. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *The EMBO journal* 16:1865-1875.

330. Thompson, J., and A. Winoto. 2008. During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain. *The Journal of experimental medicine* 205:1029-1036.

331. Kolluri, S. K., X. Zhu, X. Zhou, B. Lin, Y. Chen, K. Sun, X. Tian, J. Town, X. Cao, F. Lin, D. Zhai, S. Kitada, F. Luciano, E. O'Donnell, Y. Cao, F. He, J. Lin, J. C. Reed, A. C. Satterthwait, and X. K. Zhang. 2008. A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. *Cancer cell* 14:285-298.

332. Lin, B., S. K. Kolluri, F. Lin, W. Liu, Y. H. Han, X. Cao, M. I. Dawson, J. C. Reed, and X. K. Zhang. 2004. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116:527-540.

333. Williams, M. A., E. V. Ravkov, and M. J. Bevan. 2008. Rapid culling of the CD4+ T cell repertoire in the transition from effector to memory. *Immunity* 28:533-545.

334. Jacob, J., and D. Baltimore. 1999. Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo. *Nature* 399:593-597.

335. Opferman, J. T., B. T. Ober, and P. G. Ashton-Rickardt. 1999. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science (New York, N.Y)* 283:1745-1748.
336. Kaech, S. M., S. Hemby, E. Kersh, and R. Ahmed. 2002. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111:837-851.
337. Bannard, O., M. Kraman, and D. T. Fearon. 2009. Secondary replicative function of CD8⁺ T cells that had developed an effector phenotype. *Science (New York, N.Y)* 323:505-509.
338. Hu, H., G. Huston, D. Duso, N. Lepak, E. Roman, and S. L. Swain. 2001. CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. *Nature immunology* 2:705-710.
339. Harrington, L. E., K. M. Janowski, J. R. Oliver, A. J. Zajac, and C. T. Weaver. 2008. Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors. *Nature* 452:356-360.
340. Freitas, A. A., and B. Rocha. 2000. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annual review of immunology* 18:83-111.
341. Lauvau, G., S. Vijh, P. Kong, T. Horng, K. Kerksiek, N. Serbina, R. A. Tuma, and E. G. Pamer. 2001. Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine. *Science (New York, N.Y)* 294:1735-1739.
342. Badovinac, V. P., K. A. Messingham, A. Jabbari, J. S. Haring, and J. T. Harty. 2005. Accelerated CD8⁺ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nature medicine* 11:748-756.
343. Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2004. CD8⁺ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature immunology* 5:809-817.
344. Chang, J. T., V. R. Palanivel, I. Kinjyo, F. Schambach, A. M. Intlekofer, A. Banerjee, S. A. Longworth, K. E. Vinup, P. Mrass, J. Oliaro, N. Killeen, J. S. Orange, S. M. Russell, W. Weninger, and S. L. Reiner. 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science (New York, N.Y)* 315:1687-1691.
345. Teixeira, E., M. A. Daniels, S. E. Hamilton, A. G. Schrum, R. Bragado, S. C. Jameson, and E. Palmer. 2009. Different T cell receptor signals determine CD8⁺ memory versus effector development. *Science (New York, N.Y)* 323:502-505.
346. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2002. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nature reviews* 2:982-987.
347. Gett, A. V., F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and J. Geginat. 2003. T cell fitness determined by signal strength. *Nature immunology* 4:355-360.
348. Joshi, N. S., and S. M. Kaech. 2008. Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *J Immunol* 180:1309-1315.
349. Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Hagman, L. Gapin, and S. M. Kaech. 2007. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27:281-295.

350. Grayson, J. M., A. J. Zajac, J. D. Altman, and R. Ahmed. 2000. Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 164:3950-3954.
351. Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh, and R. Ahmed. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature immunology* 4:1191-1198.
352. Wherry, E. J., V. Teichgraber, T. C. Becker, D. Masopust, S. M. Kaech, R. Antia, U. H. von Andrian, and R. Ahmed. 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature immunology* 4:225-234.
353. Bachmann, M. F., P. Wolint, K. Schwarz, P. Jager, and A. Oxenius. 2005. Functional properties and lineage relationship of CD8⁺ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J Immunol* 175:4686-4696.
354. Cannarile, M. A., N. A. Lind, R. Rivera, A. D. Sheridan, K. A. Camfield, B. B. Wu, K. P. Cheung, Z. Ding, and A. W. Goldrath. 2006. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8⁺ T cell immunity. *Nature immunology* 7:1317-1325.
355. Ichii, H., A. Sakamoto, M. Hatano, S. Okada, H. Toyama, S. Taki, M. Arima, Y. Kuroda, and T. Tokuhisa. 2002. Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8⁺ T cells. *Nature immunology* 3:558-563.
356. Intlekofer, A. M., N. Takemoto, E. J. Wherry, S. A. Longworth, J. T. Northrup, V. R. Palanivel, A. C. Mullen, C. R. Gasink, S. M. Kaech, J. D. Miller, L. Gapin, K. Ryan, A. P. Russ, T. Lindsten, J. S. Orange, A. W. Goldrath, R. Ahmed, and S. L. Reiner. 2005. Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature immunology* 6:1236-1244.
357. Kallies, A., A. Xin, G. T. Belz, and S. L. Nutt. 2009. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* 31:283-295.
358. Rutishauser, R. L., G. A. Martins, S. Kalachikov, A. Chandele, I. A. Parish, E. Meffre, J. Jacob, K. Calame, and S. M. Kaech. 2009. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* 31:296-308.
359. Ahmed, R., and D. Gray. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science (New York, N.Y)* 272:54-60.
360. Moulton, V. R., N. D. Bushar, D. B. Leeser, D. S. Patke, and D. L. Farber. 2006. Divergent generation of heterogeneous memory CD4 T cells. *J Immunol* 177:869-876.
361. Lacombe, M. H., M. P. Hardy, J. Rooney, and N. Labrecque. 2005. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8⁺ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* 175:4400-4407.
362. Keppler, S. J., K. Theil, S. Vucikujja, and P. Aichele. 2009. Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: Role of direct IL-12 signals for cell fate decision of CD8(+) T cells. *European journal of immunology* 39:1774-1783.
363. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, C. Stemmann, A. R. Satoskar, B. P. Sleckman, and L. H. Glimcher. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science (New York, N.Y)* 295:338-342.

364. Pearce, E. L., A. C. Mullen, G. A. Martins, C. M. Krawczyk, A. S. Hutchins, V. P. Zediak, M. Banica, C. B. DiCioccio, D. A. Gross, C. A. Mao, H. Shen, N. Cereb, S. Y. Yang, T. Lindsten, J. Rossant, C. A. Hunter, and S. L. Reiner. 2003. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science (New York, N.Y)* 302:1041-1043.
365. Glimcher, L. H., M. J. Townsend, B. M. Sullivan, and G. M. Lord. 2004. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nature reviews* 4:900-911.
366. Kallies, A. 2008. Distinct regulation of effector and memory T-cell differentiation. *Immunology and cell biology* 86:325-332.
367. Intlekofer, A. M., N. Takemoto, C. Kao, A. Banerjee, F. Schambach, J. K. Northrop, H. Shen, E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2007. Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 204:2015-2021.
368. Takemoto, N., A. M. Intlekofer, J. T. Northrup, E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2006. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8⁺ T cell differentiation. *J Immunol* 177:7515-7519.
369. Pearce, E. L., and H. Shen. 2007. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J Immunol* 179:2074-2081.
370. Liu, N., S. M. Raja, F. Zazzeroni, S. S. Metkar, R. Shah, M. Zhang, Y. Wang, D. Bromme, W. A. Russin, J. C. Lee, M. E. Peter, C. J. Froelich, G. Franzoso, and P. G. Ashton-Rickardt. 2003. NF-kappaB protects from the lysosomal pathway of cell death. *The EMBO journal* 22:5313-5322.
371. Bots, M., and J. P. Medema. 2008. Serpins in T cell immunity. *Journal of leukocyte biology* 84:1238-1247.
372. Liu, N., T. Phillips, M. Zhang, Y. Wang, J. T. Opferman, R. Shah, and P. G. Ashton-Rickardt. 2004. Serine protease inhibitor 2A is a protective factor for memory T cell development. *Nature immunology* 5:919-926.
373. Phillips, T., J. T. Opferman, R. Shah, N. Liu, C. J. Froelich, and P. G. Ashton-Rickardt. 2004. A role for the granzyme B inhibitor serine protease inhibitor 6 in CD8⁺ memory cell homeostasis. *J Immunol* 173:3801-3809.
374. Zhang, M., S. Byrne, N. Liu, Y. Wang, A. Oxenius, and P. G. Ashton-Rickardt. 2007. Differential survival of cytotoxic T cells and memory cell precursors. *J Immunol* 178:3483-3491.
375. Bachmann, M. F., R. R. Beerli, P. Agnellini, P. Wolint, K. Schwarz, and A. Oxenius. 2006. Long-lived memory CD8⁺ T cells are programmed by prolonged antigen exposure and low levels of cellular activation. *European journal of immunology* 36:842-854.
376. Benezra, R., R. L. Davis, D. Lockshon, D. L. Turner, and H. Weintraub. 1990. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61:49-59.
377. Massari, M. E., and C. Murre. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and cellular biology* 20:429-440.

378. Murre, C. 2005. Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nature immunology* 6:1079-1086.
379. Rivera, R. R., C. P. Johns, J. Quan, R. S. Johnson, and C. Murre. 2000. Thymocyte selection is regulated by the helix-loop-helix inhibitor protein, Id3. *Immunity* 12:17-26.
380. Hacker, C., R. D. Kirsch, X. S. Ju, T. Hieronymus, T. C. Gust, C. Kuhl, T. Jorgas, S. M. Kurz, S. Rose-John, Y. Yokota, and M. Zenke. 2003. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nature immunology* 4:380-386.
381. Kim, J. K., M. Takeuchi, and Y. Yokota. 2004. Impairment of intestinal intraepithelial lymphocytes in Id2 deficient mice. *Gut* 53:480-486.
382. Yokota, Y., A. Mansouri, S. Mori, S. Sugawara, S. Adachi, S. Nishikawa, and P. Gruss. 1999. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397:702-706.
383. Fukuda, T., T. Yoshida, S. Okada, M. Hatano, T. Miki, K. Ishibashi, S. Okabe, H. Koseki, S. Hirose, M. Taniguchi, N. Miyasaka, and T. Tokuhi. 1997. Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *The Journal of experimental medicine* 186:439-448.
384. Scheeren, F. A., M. Naspetti, S. Diehl, R. Schotte, M. Nagasawa, E. Wijnands, R. Gimeno, F. A. Vyth-Dreese, B. Blom, and H. Spits. 2005. STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nature immunology* 6:303-313.
385. Yoshida, K., A. Sakamoto, K. Yamashita, E. Arguni, S. Horigome, M. Arima, M. Hatano, N. Seki, T. Ichikawa, and T. Tokuhi. 2006. Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8+ T cells. *European journal of immunology* 36:3146-3156.
386. Ichii, H., A. Sakamoto, Y. Kuroda, and T. Tokuhi. 2004. Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells. *J Immunol* 173:883-891.
387. Ichii, H., A. Sakamoto, M. Arima, M. Hatano, Y. Kuroda, and T. Tokuhi. 2007. Bcl6 is essential for the generation of long-term memory CD4+ T cells. *International immunology* 19:427-433.
388. Manders, P. M., P. J. Hunter, A. I. Telaranta, J. M. Carr, J. L. Marshall, M. Carrasco, Y. Murakami, M. J. Palmowski, V. Cerundolo, S. M. Kaech, R. Ahmed, and D. T. Fearon. 2005. BCL6b mediates the enhanced magnitude of the secondary response of memory CD8+ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:7418-7425.
389. Kallies, A., J. Hasbold, D. M. Tarlinton, W. Dietrich, L. M. Corcoran, P. D. Hodgkin, and S. L. Nutt. 2004. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *The Journal of experimental medicine* 200:967-977.
390. Shapiro-Shelef, M., K. I. Lin, L. J. McHeyzer-Williams, J. Liao, M. G. McHeyzer-Williams, and K. Calame. 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19:607-620.

391. Kallies, A., E. D. Hawkins, G. T. Belz, D. Metcalf, M. Hommel, L. M. Corcoran, P. D. Hodgkin, and S. L. Nutt. 2006. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nature immunology* 7:466-474.
392. Martins, G. A., L. Cimmino, M. Shapiro-Shelef, M. Szabolcs, A. Herron, E. Magnusdottir, and K. Calame. 2006. Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nature immunology* 7:457-465.
393. Martins, G. A., L. Cimmino, J. Liao, E. Magnusdottir, and K. Calame. 2008. Blimp-1 directly represses Il2 and the Il2 activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival. *The Journal of experimental medicine* 205:1959-1965.
394. Gong, D., and T. R. Malek. 2007. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. *J Immunol* 178:242-252.
395. Bullock, T. N., T. A. Colella, and V. H. Engelhard. 2000. The density of peptides displayed by dendritic cells affects immune responses to human tyrosinase and gp100 in HLA-A2 transgenic mice. *J Immunol* 164:2354-2361.
396. Viola, A., and A. Lanzavecchia. 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science (New York, N.Y)* 273:104-106.
397. Wulfig, C., J. D. Rabinowitz, C. Beeson, M. D. Sjaastad, H. M. McConnell, and M. M. Davis. 1997. Kinetics and extent of T cell activation as measured with the calcium signal. *The Journal of experimental medicine* 185:1815-1825.
398. Tuosto, L., and O. Acuto. 1998. CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement. *European journal of immunology* 28:2131-2142.
399. Fraser, J. D., B. A. Irving, G. R. Crabtree, and A. Weiss. 1991. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science (New York, N.Y)* 251:313-316.
400. Iezzi, G., K. Karjalainen, and A. Lanzavecchia. 1998. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8:89-95.
401. Iezzi, G., E. Scotet, D. Scheidegger, and A. Lanzavecchia. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *European journal of immunology* 29:4092-4101.
402. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science (New York, N.Y)* 290:92-97.
403. Langenkamp, A., G. Casorati, C. Garavaglia, P. Dellabona, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2002. T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intracлонаl functional diversification. *European journal of immunology* 32:2046-2054.
404. Hugues, S., L. Fetler, L. Bonifaz, J. Helft, F. Amblard, and S. Amigorena. 2004. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nature immunology* 5:1235-1242.
405. Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille, and M. L. Dustin. 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 203:505-511.

406. Tang, Q., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel, and J. A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nature immunology* 7:83-92.
407. Prlic, M., G. Hernandez-Hoyos, and M. J. Bevan. 2006. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8⁺ T cell response. *The Journal of experimental medicine* 203:2135-2143.
408. Zehn, D., S. Y. Lee, and M. J. Bevan. 2009. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 458:211-214.
409. Rubinstein, M. P., N. A. Lind, J. F. Purton, P. Filippou, J. A. Best, P. A. McGhee, C. D. Surh, and A. W. Goldrath. 2008. IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8⁺ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood* 112:3704-3712.
410. Schluns, K. S., K. Williams, A. Ma, X. X. Zheng, and L. Lefrancois. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 168:4827-4831.
411. Goldrath, A. W., P. V. Sivakumar, M. Glaccum, M. K. Kennedy, M. J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis, and E. A. Butz. 2002. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 195:1515-1522.
412. Judge, A. D., X. Zhang, H. Fujii, C. D. Surh, and J. Sprent. 2002. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* 196:935-946.
413. Yajima, T., H. Nishimura, R. Ishimitsu, T. Watase, D. H. Busch, E. G. Pamer, H. Kuwano, and Y. Yoshikai. 2002. Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8⁺ T cells following a microbe exposure. *J Immunol* 168:1198-1203.
414. Yajima, T., K. Yoshihara, K. Nakazato, S. Kumabe, S. Koyasu, S. Sad, H. Shen, H. Kuwano, and Y. Yoshikai. 2006. IL-15 regulates CD8⁺ T cell contraction during primary infection. *J Immunol* 176:507-515.
415. Rubinstein, M. P., A. N. Kadima, M. L. Salem, C. L. Nguyen, W. E. Gillanders, and D. J. Cole. 2002. Systemic administration of IL-15 augments the antigen-specific primary CD8⁺ T cell response following vaccination with peptide-pulsed dendritic cells. *J Immunol* 169:4928-4935.
416. Rubinstein, M. P., M. Kovar, J. F. Purton, J. H. Cho, O. Boyman, C. D. Surh, and J. Sprent. 2006. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:9166-9171.
417. Nanjappa, S. G., J. H. Walent, M. Morre, and M. Suresh. 2008. Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *The Journal of clinical investigation* 118:1027-1039.
418. Blattman, J. N., J. M. Grayson, E. J. Wherry, S. M. Kaech, K. A. Smith, and R. Ahmed. 2003. Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nature medicine* 9:540-547.

419. Sarkar, S., V. Kalia, W. N. Haining, B. T. Konieczny, S. Subramaniam, and R. Ahmed. 2008. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *The Journal of experimental medicine* 205:625-640.
420. Hand, T. W., M. Morre, and S. M. Kaech. 2007. Expression of IL-7 receptor alpha is necessary but not sufficient for the formation of memory CD8 T cells during viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11730-11735.
421. Tripathi, P., T. C. Mitchell, F. Finkelman, and D. A. Hildeman. 2007. Cutting Edge: Limiting amounts of IL-7 do not control contraction of CD4+ T cell responses. *J Immunol* 178:4027-4031.
422. Curtsinger, J. M., C. M. Johnson, and M. F. Mescher. 2003. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol* 171:5165-5171.
423. Curtsinger, J. M., D. C. Lins, and M. F. Mescher. 2003. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *The Journal of experimental medicine* 197:1141-1151.
424. Li, Q., C. Eppolito, K. Odunsi, and P. A. Shrikant. 2006. IL-12-programmed long-term CD8+ T cell responses require STAT4. *J Immunol* 177:7618-7625.
425. Schmidt, C. S., and M. F. Mescher. 1999. Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* 163:2561-2567.
426. Haring, J. S., and J. T. Harty. 2006. Aberrant contraction of antigen-specific CD4 T cells after infection in the absence of gamma interferon or its receptor. *Infection and immunity* 74:6252-6263.
427. Whitmire, J. K., B. Eam, N. Benning, and J. L. Whitton. 2007. Direct interferon-gamma signaling dramatically enhances CD4+ and CD8+ T cell memory. *J Immunol* 179:1190-1197.
428. Whitmire, J. K., J. T. Tan, and J. L. Whitton. 2005. Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *The Journal of experimental medicine* 201:1053-1059.
429. Kolumam, G. A., S. Thomas, L. J. Thompson, J. Sprent, and K. Murali-Krishna. 2005. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *The Journal of experimental medicine* 202:637-650.
430. Thompson, L. J., G. A. Kolumam, S. Thomas, and K. Murali-Krishna. 2006. Innate inflammatory signals induced by various pathogens differentially dictate the IFN-I dependence of CD8 T cells for clonal expansion and memory formation. *J Immunol* 177:1746-1754.
431. Cui, W., N. S. Joshi, A. Jiang, and S. M. Kaech. 2009. Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. *Vaccine* 27:2177-2187.

432. Kaech, S. M., and E. J. Wherry. 2007. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8⁺ T cell differentiation during viral infection. *Immunity* 27:393-405.
433. Grayson, J. M., K. Murali-Krishna, J. D. Altman, and R. Ahmed. 2001. Gene expression in antigen-specific CD8⁺ T cells during viral infection. *J Immunol* 166:795-799.
434. Veiga-Fernandes, H., and B. Rocha. 2004. High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division. *Nature immunology* 5:31-37.
435. Goldrath, A. W., C. J. Luckey, R. Park, C. Benoist, and D. Mathis. 2004. The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:16885-16890.
436. Hammarlund, E., M. W. Lewis, S. G. Hansen, L. I. Strelow, J. A. Nelson, G. J. Sexton, J. M. Hanifin, and M. K. Slifka. 2003. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nature medicine* 9:1131-1137.
437. Lau, L. L., B. D. Jamieson, T. Somasundaram, and R. Ahmed. 1994. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 369:648-652.
438. Boyman, O., J. F. Purton, C. D. Surh, and J. Sprent. 2007. Cytokines and T-cell homeostasis. *Current opinion in immunology* 19:320-326.
439. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
440. Arbones, M. L., D. C. Ord, K. Ley, H. Ratech, C. Maynard-Curry, G. Otten, D. J. Capon, and T. F. Tedder. 1994. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1:247-260.
441. Warnock, R. A., S. Askari, E. C. Butcher, and U. H. von Andrian. 1998. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 187:205-216.
442. Campbell, J. J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M. A. Siani, D. A. Thompson, and E. C. Butcher. 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science (New York, N.Y)* 279:381-384.
443. Masopust, D., V. Vezys, A. L. Marzo, and L. Lefrancois. 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science (New York, N.Y)* 291:2413-2417.
444. Reinhardt, R. L., A. Khoruts, R. Merica, T. Zell, and M. K. Jenkins. 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410:101-105.
445. Blattman, J. N., R. Antia, D. J. Sourdive, X. Wang, S. M. Kaech, K. Murali-Krishna, J. D. Altman, and R. Ahmed. 2002. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine* 195:657-664.
446. Harty, J. T., and V. P. Badovinac. 2008. Shaping and reshaping CD8⁺ T-cell memory. *Nature reviews* 8:107-119.

447. Lefrancois, L., and A. L. Marzo. 2006. The descent of memory T-cell subsets. *Nature reviews* 6:618-623.
448. Marzo, A. L., K. D. Klonowski, A. Le Bon, P. Borrow, D. F. Tough, and L. Lefrancois. 2005. Initial T cell frequency dictates memory CD8⁺ T cell lineage commitment. *Nature immunology* 6:793-799.
449. Williams, M. A., and M. J. Bevan. 2005. T cell memory: fixed or flexible? *Nature immunology* 6:752-754.
450. Wherry, E. J., and R. Ahmed. 2004. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *Journal of virology* 78:5535-5545.
451. Shin, H., and E. J. Wherry. 2007. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Current opinion in immunology* 19:408-415.
452. Wherry, E. J., J. N. Blattman, and R. Ahmed. 2005. Low CD8 T-cell proliferative potential and high viral load limit the effectiveness of therapeutic vaccination. *Journal of virology* 79:8960-8968.
453. Betts, M. R., B. Exley, D. A. Price, A. Bansal, Z. T. Camacho, V. Teaberry, S. M. West, D. R. Ambrozak, G. Tomaras, M. Roederer, J. M. Kilby, J. Tartaglia, R. Belshe, F. Gao, D. C. Douek, K. J. Weinhold, R. A. Koup, P. Goepfert, and G. Ferrari. 2005. Characterization of functional and phenotypic changes in anti-Gag vaccine-induced T cell responses and their role in protection after HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4512-4517.
454. Betts, M. R., M. C. Nason, S. M. West, S. C. De Rosa, S. A. Migueles, J. Abraham, M. M. Lederman, J. M. Benito, P. A. Goepfert, M. Connors, M. Roederer, and R. A. Koup. 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 107:4781-4789.
455. Day, C. L., D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman, and B. D. Walker. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443:350-354.
456. Petrovas, C., J. P. Casazza, J. M. Brenchley, D. A. Price, E. Gostick, W. C. Adams, M. L. Precopio, T. Schacker, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup. 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *The Journal of experimental medicine* 203:2281-2292.
457. Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M. R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature medicine* 12:1198-1202.
458. Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-687.
459. Blackburn, S. D., H. Shin, W. N. Haining, T. Zou, C. J. Workman, A. Polley, M. R. Betts, G. J. Freeman, D. A. Vignali, and E. J. Wherry. 2009. Coregulation of CD8⁺ T

cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature immunology* 10:29-37.

460. Badovinac, V. P., and J. T. Harty. 2006. Programming, demarcating, and manipulating CD8⁺ T-cell memory. *Immunological reviews* 211:67-80.

461. Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nature immunology* 3:619-626.

462. Sun, J. C., and M. J. Bevan. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science (New York, N.Y)* 300:339-342.

463. Badovinac, V. P., K. A. Messingham, T. S. Griffith, and J. T. Harty. 2006. TRAIL deficiency delays, but does not prevent, erosion in the quality of "helpless" memory CD8 T cells. *J Immunol* 177:999-1006.

464. Sacks, J. A., and M. J. Bevan. 2008. TRAIL deficiency does not rescue impaired CD8⁺ T cell memory generated in the absence of CD4⁺ T cell help. *J Immunol* 180:4570-4576.

465. Sun, J. C., M. A. Williams, and M. J. Bevan. 2004. CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nature immunology* 5:927-933.

466. Williams, M. A., B. J. Holmes, J. C. Sun, and M. J. Bevan. 2006. Developing and maintaining protective CD8⁺ memory T cells. *Immunological reviews* 211:146-153.

467. Hamilton, S. E., and S. C. Jameson. 2007. CD8(+) T cell differentiation: choosing a path through T-bet. *Immunity* 27:180-182.

468. Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478-480.

469. Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, and C. J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480-483.

470. Ridge, J. P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-478.

471. Bevan, M. J. 2004. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nature reviews* 4:595-602.

472. Bourgeois, C., B. Rocha, and C. Tanchot. 2002. A role for CD40 expression on CD8⁺ T cells in the generation of CD8⁺ T cell memory. *Science (New York, N.Y)* 297:2060-2063.

473. Lee, B. O., L. Hartson, and T. D. Randall. 2003. CD40-deficient, influenza-specific CD8 memory T cells develop and function normally in a CD40-sufficient environment. *The Journal of experimental medicine* 198:1759-1764.

474. Sun, J. C., and M. J. Bevan. 2004. Cutting edge: long-lived CD8 memory and protective immunity in the absence of CD40 expression on CD8 T cells. *J Immunol* 172:3385-3389.

475. Smith, C. M., N. S. Wilson, J. Waithman, J. A. Villadangos, F. R. Carbone, W. R. Heath, and G. T. Belz. 2004. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nature immunology* 5:1143-1148.
476. Williams, M. A., A. J. Tyznik, and M. J. Bevan. 2006. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 441:890-893.
477. Bachmann, M. F., P. Wolint, S. Walton, K. Schwarz, and A. Oxenius. 2007. Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *European journal of immunology* 37:1502-1512.
478. Wan, Y., L. Lu, J. L. Bramson, S. Baral, Q. Zhu, A. Pilon, and K. Dayball. 2001. Dendritic cell-derived IL-12 is not required for the generation of cytotoxic, IFN-gamma-secreting, CD8(+) CTL in vivo. *J Immunol* 167:5027-5033.
479. Bianchi, R., U. Grohmann, C. Vacca, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 1999. Autocrine IL-12 is involved in dendritic cell modulation via CD40 ligation. *J Immunol* 163:2517-2521.
480. Prilliman, K. R., E. E. Lemmens, G. Palioungas, T. G. Wolfe, J. P. Allison, A. H. Sharpe, and S. P. Schoenberger. 2002. Cutting edge: a crucial role for B7-CD28 in transmitting T help from APC to CTL. *J Immunol* 169:4094-4097.
481. Bullock, T. N., and H. Yagita. 2005. Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J Immunol* 174:710-717.
482. Hendriks, J., Y. Xiao, and J. Borst. 2003. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *The Journal of experimental medicine* 198:1369-1380.
483. Diehl, L., G. J. van Mierlo, A. T. den Boer, E. van der Voort, M. Fransen, L. van Bostelen, P. Krimpenfort, C. J. Melief, R. Mittler, R. E. Toes, and R. Offringa. 2002. In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. *J Immunol* 168:3755-3762.
484. Oh, S., L. P. Perera, M. Terabe, L. Ni, T. A. Waldmann, and J. A. Berzofsky. 2008. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:5201-5206.
485. Takeda, S., H. R. Rodewald, H. Arakawa, H. Bluethmann, and T. Shimizu. 1996. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5:217-228.
486. Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Perarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science (New York, N.Y)* 276:2057-2062.
487. Labrecque, N., L. S. Whitfield, R. Obst, C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 2001. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15:71-82.
488. Polic, B., D. Kunkel, A. Scheffold, and K. Rajewsky. 2001. How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8744-8749.

489. Seddon, B., and R. Zamoyska. 2002. TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells. *J Immunol* 169:2997-3005.
490. Moses, C. T., K. M. Thorstenson, S. C. Jameson, and A. Khoruts. 2003. Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1185-1190.
491. Kieper, W. C., J. T. Burghardt, and C. D. Surh. 2004. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J Immunol* 172:40-44.
492. Hataye, J., J. J. Moon, A. Khoruts, C. Reilly, and M. K. Jenkins. 2006. Naive and memory CD4+ T cell survival controlled by clonal abundance. *Science (New York, N.Y.)* 312:114-116.
493. Moon, J. J., H. H. Chu, M. Pepper, S. J. McSorley, S. C. Jameson, R. M. Kedl, and M. K. Jenkins. 2007. Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27:203-213.
494. Obar, J. J., K. M. Khanna, and L. Lefrancois. 2008. Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 28:859-869.
495. Rochman, Y., R. Spolski, and W. J. Leonard. 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nature reviews* 9:480-490.
496. Mazzucchelli, R., and S. K. Durum. 2007. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature reviews* 7:144-154.
497. Khaled, A. R., and S. K. Durum. 2002. Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nature reviews* 2:817-830.
498. Chipuk, J. E., and D. R. Green. 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in cell biology* 18:157-164.
499. Opferman, J. T., A. Letai, C. Beard, M. D. Sorcinelli, C. C. Ong, and S. J. Korsmeyer. 2003. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426:671-676.
500. Surh, C. D., and J. Sprent. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29:848-862.
501. Vivien, L., C. Benoist, and D. Mathis. 2001. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *International immunology* 13:763-768.
502. Kondrack, R. M., J. Harbertson, J. T. Tan, M. E. McBreen, C. D. Surh, and L. M. Bradley. 2003. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *The Journal of experimental medicine* 198:1797-1806.
503. Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg, and C. D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8732-8737.
504. Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology* 1:426-432.

505. Mertsching, E., C. Burdet, and R. Ceredig. 1995. IL-7 transgenic mice: analysis of the role of IL-7 in the differentiation of thymocytes in vivo and in vitro. *International immunology* 7:401-414.
506. Kieper, W. C., J. T. Tan, B. Bondi-Boyd, L. Gapin, J. Sprent, R. Ceredig, and C. D. Surh. 2002. Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 195:1533-1539.
507. Park, J. H., Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes, and A. Singer. 2004. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 21:289-302.
508. Wrenshall, L. E., and J. L. Platt. 1999. Regulation of T cell homeostasis by heparan sulfate-bound IL-2. *J Immunol* 163:3793-3800.
509. Dummer, W., B. Ernst, E. LeRoy, D. Lee, and C. Surh. 2001. Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment. *J Immunol* 166:2460-2468.
510. Link, A., T. K. Vogt, S. Favre, M. R. Britschgi, H. Acha-Orbea, B. Hinz, J. G. Cyster, and S. A. Luther. 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nature immunology* 8:1255-1265.
511. Kerdiles, Y. M., D. R. Beisner, R. Tinoco, A. S. Dejean, D. H. Castrillon, R. A. DePinho, and S. M. Hedrick. 2009. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nature immunology* 10:176-184.
512. Carlson, C. M., B. T. Endrizzi, J. Wu, X. Ding, M. A. Weinreich, E. R. Walsh, M. A. Wani, J. B. Lingrel, K. A. Hogquist, and S. C. Jameson. 2006. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* 442:299-302.
513. Berard, M., K. Brandt, S. Bulfone-Paus, and D. F. Tough. 2003. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8⁺ T cells. *J Immunol* 170:5018-5026.
514. Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce, and J. J. Peschon. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 191:771-780.
515. Davey, G. M., R. Starr, A. L. Cornish, J. T. Burghardt, W. S. Alexander, F. R. Carbone, C. D. Surh, and W. R. Heath. 2005. SOCS-1 regulates IL-15-driven homeostatic proliferation of antigen-naive CD8 T cells, limiting their autoimmune potential. *The Journal of experimental medicine* 202:1099-1108.
516. Ramanathan, S., J. Gagnon, C. Leblanc, R. Rottapel, and S. Ilangumaran. 2006. Suppressor of cytokine signaling 1 stringently regulates distinct functions of IL-7 and IL-15 in vivo during T lymphocyte development and homeostasis. *J Immunol* 176:4029-4041.
517. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature reviews* 7:454-465.

518. Foger, N., L. Rangell, D. M. Danilenko, and A. C. Chan. 2006. Requirement for coronin 1 in T lymphocyte trafficking and cellular homeostasis. *Science (New York, N.Y)* 313:839-842.
519. Mueller, P., J. Massner, R. Jayachandran, B. Combaluzier, I. Albrecht, J. Gatfield, C. Blum, R. Ceredig, H. R. Rodewald, A. G. Rolink, and J. Pieters. 2008. Regulation of T cell survival through coronin-1-mediated generation of inositol-1,4,5-trisphosphate and calcium mobilization after T cell receptor triggering. *Nature immunology* 9:424-431.
520. Haraldsson, M. K., C. A. Louis-Dit-Sully, B. R. Lawson, G. Sternik, M. L. Santiago-Raber, N. R. Gascoigne, A. N. Theofilopoulos, and D. H. Kono. 2008. The lupus-related Lmb3 locus contains a disease-suppressing Coronin-1A gene mutation. *Immunity* 28:40-51.
521. Grogan, A., E. Reeves, N. Keep, F. Wientjes, N. F. Totty, A. L. Burlingame, J. J. Hsuan, and A. W. Segal. 1997. Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. *Journal of cell science* 110 (Pt 24):3071-3081.
522. Menon, S., H. Chi, H. Zhang, X. W. Deng, R. A. Flavell, and N. Wei. 2007. COP9 signalosome subunit 8 is essential for peripheral T cell homeostasis and antigen receptor-induced entry into the cell cycle from quiescence. *Nature immunology* 8:1236-1245.
523. Schwechheimer, C. 2004. The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochimica et biophysica acta* 1695:45-54.
524. Cope, G. A., and R. J. Deshaies. 2003. COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell* 114:663-671.
525. Wolf, D. A., C. Zhou, and S. Wee. 2003. The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nature cell biology* 5:1029-1033.
526. Kuo, C. T., M. L. Veselits, K. P. Barton, M. M. Lu, C. Clendenin, and J. M. Leiden. 1997. The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes & development* 11:2996-3006.
527. Sebzda, E., Z. Zou, J. S. Lee, T. Wang, and M. L. Kahn. 2008. Transcription factor KLF2 regulates the migration of naive T cells by restricting chemokine receptor expression patterns. *Nature immunology* 9:292-300.
528. Min, B., R. McHugh, G. D. Sempowski, C. Mackall, G. Foucras, and W. E. Paul. 2003. Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity* 18:131-140.
529. Ernst, B., D. S. Lee, J. M. Chang, J. Sprent, and C. D. Surh. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11:173-181.
530. Workman, C. J., and D. A. Vignali. 2005. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol* 174:688-695.
531. Krieg, C., O. Boyman, Y. X. Fu, and J. Kaye. 2007. B and T lymphocyte attenuator regulates CD8+ T cell-intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nature immunology* 8:162-171.

532. Posevitz, V., B. Arndt, T. Krieger, N. Warnecke, B. Schraven, and L. Simeoni. 2008. Regulation of T cell homeostasis by the transmembrane adaptor protein SIT. *J Immunol* 180:1634-1642.
533. Simeoni, L., J. A. Lindquist, M. Smida, V. Witte, B. Arndt, and B. Schraven. 2008. Control of lymphocyte development and activation by negative regulatory transmembrane adapter proteins. *Immunological reviews* 224:215-228.
534. Li, O., P. Zheng, and Y. Liu. 2004. CD24 expression on T cells is required for optimal T cell proliferation in lymphopenic host. *The Journal of experimental medicine* 200:1083-1089.
535. Li, O., X. Chang, H. Zhang, E. Kocak, C. Ding, P. Zheng, and Y. Liu. 2006. Massive and destructive T cell response to homeostatic cue in CD24-deficient lymphopenic hosts. *The Journal of experimental medicine* 203:1713-1720.
536. Fry, T. J., and C. L. Mackall. 2001. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends in immunology* 22:564-571.
537. Surh, C. D., and J. Sprent. 2005. Regulation of mature T cell homeostasis. *Seminars in immunology* 17:183-191.
538. Osborne, L. C., S. Dhanji, J. W. Snow, J. J. Priatel, M. C. Ma, M. J. Miners, H. S. Teh, M. A. Goldsmith, and N. Abraham. 2007. Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *The Journal of experimental medicine* 204:619-631.
539. Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* 13:1501-1512.
540. Li, J., G. Huston, and S. L. Swain. 2003. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *The Journal of experimental medicine* 198:1807-1815.
541. Cho, J. H., O. Boyman, H. O. Kim, B. Hahm, M. P. Rubinstein, C. Ramsey, D. M. Kim, C. D. Surh, and J. Sprent. 2007. An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2. *The Journal of experimental medicine* 204:1787-1801.
542. Ramsey, C., M. P. Rubinstein, D. M. Kim, J. H. Cho, J. Sprent, and C. D. Surh. 2008. The lymphopenic environment of CD132 (common gamma-chain)-deficient hosts elicits rapid homeostatic proliferation of naive T cells via IL-15. *J Immunol* 180:5320-5326.
543. Kieper, W. C., A. Troy, J. T. Burghardt, C. Ramsey, J. Y. Lee, H. Q. Jiang, W. Dummer, H. Shen, J. J. Cebra, and C. D. Surh. 2005. Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J Immunol* 174:3158-3163.
544. Min, B., H. Yamane, J. Hu-Li, and W. E. Paul. 2005. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J Immunol* 174:6039-6044.
545. Hagen, K. A., C. T. Moses, E. F. Drasler, K. M. Podetz-Pedersen, S. C. Jameson, and A. Khoruts. 2004. A role for CD28 in lymphopenia-induced proliferation of CD4 T cells. *J Immunol* 173:3909-3915.

546. Mullbacher, A. 1994. The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen. *The Journal of experimental medicine* 179:317-321.
547. Murali-Krishna, K., L. L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science (New York, N.Y)* 286:1377-1381.
548. Tough, D. F., P. Borrow, and J. Sprent. 1996. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science (New York, N.Y)* 272:1947-1950.
549. Tough, D. F., S. Sun, and J. Sprent. 1997. T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *The Journal of experimental medicine* 185:2089-2094.
550. Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough, and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591-599.
551. Becker, T. C., E. J. Wherry, D. Boone, K. Murali-Krishna, R. Antia, A. Ma, and R. Ahmed. 2002. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine* 195:1541-1548.
552. Waldmann, T. A., and Y. Tagaya. 1999. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annual review of immunology* 17:19-49.
553. Fehniger, T. A., K. Suzuki, A. Ponnappan, J. B. VanDeusen, M. A. Cooper, S. M. Florea, A. G. Freud, M. L. Robinson, J. Durbin, and M. A. Caligiuri. 2001. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 193:219-231.
554. Surh, C. D., O. Boyman, J. F. Purton, and J. Sprent. 2006. Homeostasis of memory T cells. *Immunological reviews* 211:154-163.
555. Vos, Q., L. A. Jones, and A. M. Kruisbeek. 1992. Mice deprived of exogenous antigenic stimulation develop a normal repertoire of functional T cells. *J Immunol* 149:1204-1210.
556. Ku, C. C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science (New York, N.Y)* 288:675-678.
557. Murakami, M., A. Sakamoto, J. Bender, J. Kappler, and P. Marrack. 2002. CD25⁺CD4⁺ T cells contribute to the control of memory CD8⁺ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8832-8837.
558. Tan, J. T., B. Ernst, W. C. Kieper, E. LeRoy, J. Sprent, and C. D. Surh. 2002. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *The Journal of experimental medicine* 195:1523-1532.
559. Buentke, E., A. Mathiot, M. Tolaini, J. Di Santo, R. Zamoyska, and B. Seddon. 2006. Do CD8 effector cells need IL-7R expression to become resting memory cells? *Blood* 108:1949-1956.

560. Carrio, R., C. E. Rolle, and T. R. Malek. 2007. Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8⁺ memory T cells. *European journal of immunology* 37:3078-3088.
561. Pulle, G., M. Vidric, and T. H. Watts. 2006. IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. *J Immunol* 176:2739-2748.
562. Swain, S. L., H. Hu, and G. Huston. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science (New York, N.Y)* 286:1381-1383.
563. Homann, D., L. Teyton, and M. B. Oldstone. 2001. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8⁺ but declining CD4⁺ T-cell memory. *Nature medicine* 7:913-919.
564. Purton, J. F., J. T. Tan, M. P. Rubinstein, D. M. Kim, J. Sprent, and C. D. Surh. 2007. Antiviral CD4⁺ memory T cells are IL-15 dependent. *The Journal of experimental medicine* 204:951-961.
565. Lenz, D. C., S. K. Kurz, E. Lemmens, S. P. Schoenberger, J. Sprent, M. B. Oldstone, and D. Homann. 2004. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4⁺T cell memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:9357-9362.
566. Martin, B., C. Bourgeois, N. Dautigny, and B. Lucas. 2003. On the role of MHC class II molecules in the survival and lymphopenia-induced proliferation of peripheral CD4⁺ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:6021-6026.
567. Robertson, J. M., M. MacLeod, V. S. Marsden, J. W. Kappler, and P. Marrack. 2006. Not all CD4⁺ memory T cells are long lived. *Immunological reviews* 211:49-57.
568. Seddon, B., and R. Zamoyska. 2002. TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells. *J Immunol* 169:3752-3759.
569. Di Rosa, F., and R. Pabst. 2005. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends in immunology* 26:360-366.
570. Di Rosa, F., and A. Santoni. 2002. Bone marrow CD8 T cells are in a different activation state than those in lymphoid periphery. *European journal of immunology* 32:1873-1880.
571. Zeng, D., P. Hoffmann, F. Lan, P. Huie, J. Higgins, and S. Strober. 2002. Unique patterns of surface receptors, cytokine secretion, and immune functions distinguish T cells in the bone marrow from those in the periphery: impact on allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 99:1449-1457.
572. Mazo, I. B., M. Honczarenko, H. Leung, L. L. Cavanagh, R. Bonasio, W. Weninger, K. Engelke, L. Xia, R. P. McEver, P. A. Koni, L. E. Silberstein, and U. H. von Andrian. 2005. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8⁺ T cells. *Immunity* 22:259-270.
573. Parretta, E., G. Cassese, P. Barba, A. Santoni, J. Guardiola, and F. Di Rosa. 2005. CD8 cell division maintaining cytotoxic memory occurs predominantly in the bone marrow. *J Immunol* 174:7654-7664.

574. Slifka, M. K., J. K. Whitmire, and R. Ahmed. 1997. Bone marrow contains virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 90:2103-2108.
575. Becker, T. C., S. M. Coley, E. J. Wherry, and R. Ahmed. 2005. Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells. *J Immunol* 174:1269-1273.
576. Cavanagh, L. L., R. Bonasio, I. B. Mazo, C. Halin, G. Cheng, A. W. van der Velden, A. Cariappa, C. Chase, P. Russell, M. N. Starnbach, P. A. Koni, S. Pillai, W. Weninger, and U. H. von Andrian. 2005. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nature immunology* 6:1029-1037.
577. Zammit, D. J., and L. Lefrancois. 2006. Dendritic cell-T cell interactions in the generation and maintenance of CD8 T cell memory. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8:1108-1115.
578. Butcher, E. C., and L. J. Picker. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science (New York, N.Y)* 272:60-66.
579. Di Rosa, F., and A. Santoni. 2003. Memory T-cell competition for bone marrow seeding. *Immunology* 108:296-304.
580. Selin, L. K., M. Y. Lin, K. A. Kraemer, D. M. Pardoll, J. P. Schneck, S. M. Varga, P. A. Santolucito, A. K. Pinto, and R. M. Welsh. 1999. Attrition of T cell memory: selective loss of LCMV epitope-specific memory CD8 T cells following infections with heterologous viruses. *Immunity* 11:733-742.
581. Gaspal, F. M., M. Y. Kim, F. M. McConnell, C. Raykundalia, V. Bekiaris, and P. J. Lane. 2005. Mice deficient in OX40 and CD30 signals lack memory antibody responses because of deficient CD4 T cell memory. *J Immunol* 174:3891-3896.
582. Kim, M. Y., F. M. Gaspal, H. E. Wiggett, F. M. McConnell, A. Gulbranson-Judge, C. Raykundalia, L. S. Walker, M. D. Goodall, and P. J. Lane. 2003. CD4(+)CD3(-) accessory cells costimulate primed CD4 T cells through OX40 and CD30 at sites where T cells collaborate with B cells. *Immunity* 18:643-654.
583. Hofmann, A., G. P. Nolan, and H. M. Blau. 1996. Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5185-5190.
584. Kraus, M., M. B. Alimzhanov, N. Rajewsky, and K. Rajewsky. 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalphabeta heterodimer. *Cell* 117:787-800.
585. Lam, K. P., R. Kuhn, and K. Rajewsky. 1997. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90:1073-1083.
586. Benschop, R. J., D. Melamed, D. Nemazee, and J. C. Cambier. 1999. Distinct signal thresholds for the unique antigen receptor-linked gene expression programs in mature and immature B cells. *The Journal of experimental medicine* 190:749-756.
587. Neuberger, M. S. 1997. Antigen receptor signaling gives lymphocytes a long life. *Cell* 90:971-973.
588. Aoki, Y., K. J. Isselbacher, B. J. Cherayil, and S. Pillai. 1994. Tyrosine phosphorylation of Blk and Fyn Src homology 2 domain-binding proteins occurs in

- response to antigen-receptor ligation in B cells and constitutively in pre-B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:4204-4208.
589. Borowski, A. B., A. C. Boesteanu, Y. M. Mueller, C. Carafides, D. J. Topham, J. D. Altman, S. R. Jennings, and P. D. Katsikis. 2007. Memory CD8⁺ T cells require CD28 costimulation. *J Immunol* 179:6494-6503.
590. Rodriguez, A., E. Vigorito, S. Clare, M. V. Warren, P. Couttet, D. R. Soond, S. van Dongen, R. J. Grocock, P. P. Das, E. A. Miska, D. Vetrie, K. Okkenhaug, A. J. Enright, G. Dougan, M. Turner, and A. Bradley. 2007. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science (New York, N.Y)* 316:608-611.
591. Irvine, D. J., M. A. Purbhoo, M. Krogsgaard, and M. M. Davis. 2002. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 419:845-849.
592. Wulfiging, C., C. Sumen, M. D. Sjaastad, L. C. Wu, M. L. Dustin, and M. M. Davis. 2002. Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nature immunology* 3:42-47.
593. Krogsgaard, M., Q. J. Li, C. Sumen, J. B. Huppa, M. Huse, and M. M. Davis. 2005. Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature* 434:238-243.
594. Li, Q. J., A. R. Dinner, S. Qi, D. J. Irvine, J. B. Huppa, M. M. Davis, and A. K. Chakraborty. 2004. CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse. *Nature immunology* 5:791-799.
595. Stefanova, I., J. R. Dorfman, and R. N. Germain. 2002. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420:429-434.
596. Stock, A. T., S. N. Mueller, L. M. Kleinert, W. R. Heath, F. R. Carbone, and C. M. Jones. 2007. Optimization of TCR transgenic T cells for in vivo tracking of immune responses. *Immunology and cell biology* 85:394-396.
597. Thomson, A. W., H. R. Turnquist, and G. Raimondi. 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nature reviews* 9:324-337.
598. Rowell, E. A., M. C. Walsh, and A. D. Wells. 2005. Opposing roles for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in the control of CD4⁺ T cell proliferation and effector function. *J Immunol* 174:3359-3368.
599. Liang, J., and J. M. Slingerland. 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2:339-345.
600. Saibil, S. D., E. K. Deenick, and P. S. Ohashi. 2007. The sound of silence: modulating anergy in T lymphocytes. *Current opinion in immunology* 19:658-664.
601. Mariathasan, S., A. Zakarian, D. Bouchard, A. M. Michie, J. C. Zuniga-Pflucker, and P. S. Ohashi. 2001. Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* 167:4966-4973.
602. Daniels, M. A., E. Teixeira, J. Gill, B. Hausmann, D. Roubaty, K. Holmberg, G. Werlen, G. A. Hollander, N. R. Gascoigne, and E. Palmer. 2006. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444:724-729.

603. Mariathasan, S., M. F. Bachmann, D. Bouchard, T. Ohteki, and P. S. Ohashi. 1998. Degree of TCR internalization and Ca²⁺ flux correlates with thymocyte selection. *J Immunol* 161:6030-6037.
604. Bachmann, M. F., S. Mariathasan, D. Bouchard, D. E. Speiser, and P. S. Ohashi. 1997. Four types of Ca²⁺ signals in naive CD8⁺ cytotoxic T cells after stimulation with T cell agonists, partial agonists and antagonists. *European journal of immunology* 27:3414-3419.
605. Cruz-Guilloty, F., M. E. Pipkin, I. M. Djuretic, D. Levanon, J. Lotem, M. G. Lichtenheld, Y. Groner, and A. Rao. 2009. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *The Journal of experimental medicine* 206:51-59.
606. Egawa, T. 2009. Runx and ThPOK: a balancing act to regulate thymocyte lineage commitment. *Journal of cellular biochemistry* 107:1037-1045.
607. Wang, X., K. Belguise, C. F. O'Neill, N. Sanchez-Morgan, M. Romagnoli, S. F. Eddy, N. D. Mineva, Z. Yu, C. Min, V. Trinkaus-Randall, D. Chalbos, and G. E. Sonenshein. 2009. RelB NF-kappaB represses estrogen receptor alpha expression via induction of the zinc finger protein Blimp1. *Molecular and cellular biology* 29:3832-3844.
608. Martins, G., and K. Calame. 2008. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annual review of immunology* 26:133-169.
609. Bi, Y., G. Liu, and R. Yang. 2009. MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *Journal of cellular physiology* 218:467-472.
610. Li, Q. J., J. Chau, P. J. Ebert, G. Sylvester, H. Min, G. Liu, R. Braich, M. Manoharan, J. Soutschek, P. Skare, L. O. Klein, M. M. Davis, and C. Z. Chen. 2007. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 129:147-161.
611. Thai, T. H., D. P. Calado, S. Casola, K. M. Ansel, C. Xiao, Y. Xue, A. Murphy, D. Friendewey, D. Valenzuela, J. L. Kutok, M. Schmidt-Supprian, N. Rajewsky, G. Yancopoulos, A. Rao, and K. Rajewsky. 2007. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science (New York, N.Y)* 316:604-608.
612. Wu, H., J. R. Neilson, P. Kumar, M. Manocha, P. Shankar, P. A. Sharp, and N. Manjunath. 2007. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS one* 2:e1020.
613. Krichevsky, A. M., and G. Gabriely. 2009. miR-21: a small multi-faceted RNA. *Journal of cellular and molecular medicine* 13:39-53.
614. Wang, Y., and C. G. Lee. 2009. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. *Journal of cellular and molecular medicine* 13:12-23.
615. Kumar, N., D. Liu, H. Wang, J. Robidoux, and S. Collins. 2008. Orphan nuclear receptor NOR-1 enhances 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent uncoupling protein-1 gene transcription. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 22:1057-1064.
616. Rajpal, A., Y. A. Cho, B. Yelent, P. H. Koza-Taylor, D. Li, E. Chen, M. Whang, C. Kang, T. G. Turi, and A. Winoto. 2003. Transcriptional activation of known and

novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor. *The EMBO journal* 22:6526-6536.

617. Nedergaard, J., D. Ricquier, and L. P. Kozak. 2005. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO reports* 6:917-921.

618. Adams, A. E., A. M. Carroll, P. G. Fallon, and R. K. Porter. 2008. Mitochondrial uncoupling protein 1 expression in thymocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1777:772-776.

619. Adams, A. E., O. Hanrahan, D. N. Nolan, H. P. Voorheis, P. Fallon, and R. K. Porter. 2008. Images of mitochondrial UCP 1 in mouse thymocytes using confocal microscopy. *Biochimica et biophysica acta* 1777:115-117.

620. Krauss, S., C. Y. Zhang, and B. B. Lowell. 2002. A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:118-122.

621. Krauss, S., C. Y. Zhang, and B. B. Lowell. 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:248-261.

622. Brito, C., M. Naviliat, A. C. Tiscornia, F. Vuillier, G. Gualco, G. Dighiero, R. Radi, and A. M. Cayota. 1999. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* 162:3356-3366.

623. Arsenijevic, D., H. Onuma, C. Pecqueur, S. Raimbault, B. S. Manning, B. Miroux, E. Couplan, M. C. Alves-Guerra, M. Gubern, R. Surwit, F. Bouillaud, D. Richard, S. Collins, and D. Ricquier. 2000. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nature genetics* 26:435-439.

624. Emre, Y., C. Hurtaud, T. Nubel, F. Criscuolo, D. Ricquier, and A. M. Cassard-Doulier. 2007. Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *The Biochemical journal* 402:271-278.

625. Lu, S. P., M. H. Lin Feng, H. L. Huang, Y. C. Huang, W. I. Tsou, and M. Z. Lai. 2007. Reactive oxygen species promote raft formation in T lymphocytes. *Free radical biology & medicine* 42:936-944.

626. Tasken, K., and A. J. Stokka. 2006. The molecular machinery for cAMP-dependent immunomodulation in T-cells. *Biochemical Society transactions* 34:476-479.

627. De Rasmio, D., A. Signorile, E. Roca, and S. Papa. 2009. cAMP response element-binding protein (CREB) is imported into mitochondria and promotes protein synthesis. *The FEBS journal* 276:4325-4333.

628. Darragh, J., A. Soloaga, V. A. Beardmore, A. D. Wingate, G. R. Wiggin, M. Peggie, and J. S. Arthur. 2005. MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors Nur77, Nurr1 and Nor1 downstream of MAPK signalling. *The Biochemical journal* 390:749-759.

629. Fukuyama, T., L. H. Kasper, F. Boussovar, T. Jeevan, J. van Deursen, and P. K. Brindle. 2009. Histone acetyltransferase CBP is vital to demarcate conventional and innate CD8+ T-cell development. *Molecular and cellular biology* 29:3894-3904.

630. Araki, K., A. P. Turner, V. O. Shaffer, S. Gangappa, S. A. Keller, M. F. Bachmann, C. P. Larsen, and R. Ahmed. 2009. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 460:108-112.
631. Shrikant, P. A., R. Rao, Q. Li, J. Kesterson, C. Eppolito, A. Mischo, and P. Singhal. 2009. Regulating functional cell fates in CD8 T cells. *Immunologic research*.
632. Antia, R., V. V. Ganusov, and R. Ahmed. 2005. The role of models in understanding CD8+ T-cell memory. *Nature reviews* 5:101-111.
633. Ahmed, M., K. G. Lanzer, E. J. Yager, P. S. Adams, L. L. Johnson, and M. A. Blackman. 2009. Clonal expansions and loss of receptor diversity in the naive CD8 T cell repertoire of aged mice. *J Immunol* 182:784-792.
634. Messaoudi, I., J. Lemaoult, J. A. Guevara-Patino, B. M. Metzner, and J. Nikolich-Zugich. 2004. Age-related CD8 T cell clonal expansions constrict CD8 T cell repertoire and have the potential to impair immune defense. *The Journal of experimental medicine* 200:1347-1358.
635. Nikolich-Zugich, J. 2008. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nature reviews* 8:512-522.
636. Yager, E. J., M. Ahmed, K. Lanzer, T. D. Randall, D. L. Woodland, and M. A. Blackman. 2008. Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus. *The Journal of experimental medicine* 205:711-723.
637. Boding, L., C. M. Bonefeld, B. L. Nielsen, J. P. Lauritsen, M. R. von Essen, A. K. Hansen, J. M. Larsen, M. M. Nielsen, N. Odum, and C. Geisler. 2009. TCR down-regulation controls T cell homeostasis. *J Immunol* 183:4994-5005.
638. Saini, M., C. Pearson, and B. Seddon. 2009. Regulation of T cell-dendritic cell interactions by IL-7 governs T-cell activation and homeostasis. *Blood* 113:5793-5800.
639. Tanchot, C., H. V. Fernandes, and B. Rocha. 2000. The organization of mature T-cell pools. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 355:323-328.
640. Matsuda, J. L., L. Gapin, S. Sidobre, W. C. Kieper, J. T. Tan, R. Ceredig, C. D. Surh, and M. Kronenberg. 2002. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nature immunology* 3:966-974.
641. Germanov, E., L. Veinotte, R. Cullen, E. Chamberlain, E. C. Butcher, and B. Johnston. 2008. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in homeostasis and activation of CD1d-restricted NKT cells. *J Immunol* 181:81-91.