

2M1103284.1

i

11618288

Université de Montréal

Les lymphocytes T mémoires... une question de survie

par

Marie-Pierre Hardy

Département de sciences biomédicales
Faculté de médecine



Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
maîtrise ès sciences (M. Sc.) en Sciences biomédicales



Décembre 2004

© Marie-Pierre Hardy, 2004

W

4

U58

2005

v.101

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Les lymphocytes T mémoires... une question de survie

présenté par :
Marie-Pierre Hardy

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Hugo Soudeyns
président-rapporteur

Nathalie Labrecque
directrice de recherche

Ciro Piccirillo
membre du jury

RÉSUMÉ

Lorsqu'un pathogène infecte l'organisme, les lymphocytes T naïfs qui le reconnaissent via leur récepteur spécifique (RCT) se différencient en lymphocytes T effecteurs (Te) qui l'éliminent. Les Te meurent ensuite par apoptose tandis que 1-10% deviennent des lymphocytes T mémoires (Tm) qui nous protègent à long terme contre ce pathogène. Les mécanismes permettant la survie des Te et leur différenciation en Tm sont toujours inconnus. Puisque l'IL-7 est requise pour le développement des Tm, nous proposons que les signaux fournis par cette cytokine dictent le sort des Te. Nous souhaitons déterminer si l'expression du récepteur de l'IL-7 (IL-7R) permet d'identifier les Te précurseurs des Tm. Dans les Tm, la machinerie de signalisation est réorganisée de façon à permettre une réponse secondaire rapide et efficace. Pour survivre, les Tm n'ont pas besoin d'interactions de leur RCT avec le CMH. Il est tout de même possible que les modifications du complexe de signalisation des Tm permettent la transmission de signaux constitutifs de survie par le RCT, indépendamment de contacts avec tout ligand. Notre second objectif consiste, à l'aide d'un modèle de souris transgénique dans lequel l'expression du RCT est inductible à la tétracycline, à vérifier si la survie des Tm dépend de l'expression du RCT. Nos résultats n'ont pas permis de corréler l'expression du IL-7R avec le développement des Tm. De plus, l'abolition d'expression du RCT provoque la mort des Tm CD4⁺. Étonnamment, leur disparition mène à une perte simultanée des lymphocytes B et des cellules dendritiques, révélant un nouveau rôle pour les cellules T dans le maintien de l'homéostasie ganglionnaire. Enfin, la compréhension du développement et de la survie des Tm permettra l'amélioration des techniques de vaccination.

Mots clés : Lymphocytes T mémoires, contraction, IL-7, homéostasie, récepteur des cellules T, récepteur de l'IL-7, survie.

ABSTRACT

When a pathogen infects the organism, T lymphocytes recognize it via their specific T cell receptor (TCR). This induces their proliferation and differentiation in effector T cells (Te) that eliminate the pathogen and then die by apoptosis, whereas some of them differentiate in memory T cells (Tm). Those cells provide long-term protection against this pathogen. Mechanisms underlying effector T cells survival and their differentiation into Tm are still unknown. Since IL-7 is required for CD8⁺ Tm development, we hypothesized that this cytokine signalling dictates the fate of Te. In Tm, the TCR signalling machinery is modified to allow rapid and sensitive recall responses against pathogens. Moreover, Tm do not require TCR-MHC interactions for their survival. This does not exclude a possible role for TCR signalling in this process. We postulated that Tm can maintain a basal signalling activity of their TCRs independently of engagement with any ligand. This phenomenon occurs in B cells. The project consists in determining if IL-7 receptor (IL-7R) expression identifies precursors of Tm amongst Te and if Tm survival depends on TCR expression. Our findings did not correlate IL-7R expression on CD8⁺ Te with the generation of Tm. Tm survival was studied using a tet-inducible TCR expression system in mice. We showed that CD4⁺ Tm cells failed to survive when TCR expression was stopped. Unexpectedly, we noticed that T cell loss led to the concomitant loss of B lymphocytes and dendritic cells, revealing a new role for T cells in lymph node homeostasis. Finally, understanding memory T cell development and survival will lead to the improvement of vaccination techniques.

Keywords: Memory T cells, contraction, IL-7, IL-7 receptor, T cell receptor, homeostasis, survival.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	iii
RÉSUMÉ EN ANGLAIS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
REMERCIEMENTS	ix
1. INTRODUCTION	1
1.1 Introduction	2
1.1.1 Résumé de la réponse immunitaire.....	2
1.1.2 Réponse immunitaire des lymphocytes T.....	3
1.2 Architecture des organes lymphoïdes	4
1.2.1 Formation des organes lymphoïdes.....	4
1.2.2 Cellules des organes lymphoïdes.....	7
1.2.2.1 Les cellules stromales.....	7
1.2.2.2 Les cellules dendritiques.....	7
1.2.2.3 Les lymphocytes B.....	8
1.2.2.4 Les lymphocytes T.....	8
1.3 Réponse des lymphocytes T	9
1.3.1 Développement des lymphocytes T et diversité.....	9
1.3.2 Reconnaissance antigénique.....	10
1.3.3 Prolifération clonale des lymphocytes T.....	11
1.3.4 Phase de contraction et développement des T _m	13
1.3.5 Différenciation des lymphocytes T effecteurs en mémoires.....	14
1.3.5.1 Le rôle de l'aide CD4 ⁺	17
1.4 Les lymphocytes T mémoires	18
1.4.1 Caractéristiques.....	18
1.4.1.1 Rapidité et cinétique.....	18
1.4.1.2 Marqueurs.....	19
1.4.1.4 Auto-renouvellement et survie.....	20
1.4.2 Sous-types.....	20
1.5 Homéostasie des populations de lymphocytes T	21
1.5.1 Homéostasie des lymphocytes T naïfs.....	22
1.5.2 Homéostasie des lymphocytes T effecteurs.....	23
1.5.3 Homéostasie des lymphocytes T mémoires.....	24

1.5.3.1 La longévité de la mémoire immunologique	24
1.5.3.2 La vaccination	24
1.5.3.3 Facteurs impliqués dans le maintien des lymphocytes T mémoires	27
1.6 Problématique	29
1.6.1 Survie des lymphocytes T effecteurs qui se différencient en T mémoires	29
1.6.2 Rôle du RCT dans la survie des lymphocytes T mémoires	31
2. MÉTHODES	33
2.2 �tude des lymphocytes T mémoires CD8⁺	34
2.2.1 Souris 2C	34
2.2.2 Souris V�5LTAO : RCT OT-1 inductible à la tétracycline	34
2.2.3 Immunisation et génération de lymphocytes T mémoires	35
2.2 �tude des lymphocytes T mémoires CD4⁺	37
2.3.1 Souris LTAO	37
2.3.2 Lymphocytes T mémoires CD4 ⁺	37
3. ARTICLES	38
4. DISCUSSION	97
4.1 Identification des précurseurs des lymphocytes T mémoires lors de la phase de contraction	98
4.2 �tude de la survie des lymphocytes T mémoires	100
4.2.1 Survie des cellules T mémoires CD8 ⁺ et CD4 ⁺	101
4.2.2 Survie des lymphocytes T mémoires CD8 ⁺ lors d'un arrêt d'expression du RCT	104
4.2.3 Mort des lymphocytes T mémoires CD4 ⁺ lors d'un arrêt d'expression du RCT	105
4.3 Perturbation de l'homéostasie ganglionnaire lors de la perte des lymphocytes T CD4⁺	106
4.4 Conclusion	111
RÉFÉRENCES	125

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Résumé de la réponse immunitaire des lymphocytes T
- Figure 2 : Architecture des ganglions lymphatiques
- Figure 3 : Signalisation intracellulaire associée à l'activation des lymphocytes T
- Figure 4 : Modèle de différenciation linéaire
- Figure 5 : Facteurs régulant les différentes phases de la réponse immunitaire
- Figure 6 : Rôle des cytokines dans le développement des cellules T mémoires
- Figure 7 : Modèle de signalisation constitutive chez les lymphocytes T mémoires
- Figure 8 : Modèle de souris V β 5LTAO
- Figure 9 : Modèle récapitulatif proposé

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Ac :	Anticorps
Ag :	Antigène
AICD:	Activation-induced cell death
BAFF :	B cell activation factor from the TNF family
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMH-I :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
GM-CSF :	Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor
HEV :	High endothelial veinule
IFN :	Interféron
ITAM:	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
IL :	Interleukine
IL-7R :	Récepteur de l'interleukine-7
LCMV :	Lymphocytic choriomeningitis virus
LAT :	Linker for activation of T cells
LPS :	Lipopolysaccharide
LT :	Lymphotoxine
LT β R :	Récepteur de la lymphotoxine β
RAG :	Recombination activation gene
RANK :	Récepteur activateur de NF-kB
RANKL :	Ligand de RANK
RCT :	Récepteur des cellules T
Te :	Lymphocyte T effecteur
TET :	Tétracycline
Th :	T helper cell
Tm :	Lymphocyte T mémoire
Tn :	Lymphocyte T naif
TNF :	Facteur de nécrose tumorale
Zap-70 :	Zeta chain associated protein, 70 kDa

REMERCIEMENTS

D'abord, je désire remercier ma directrice de recherche, Nathalie Labrecque, pour m'avoir confié ce projet de maîtrise extrêmement stimulant. Merci pour les conseils toujours judicieux, les connaissances dont tu es une source presque inépuisable ainsi que l'encadrement constant, qui m'ont apporté plus que je n'aurais pu espérer tout au long de ces deux années.

Merci aussi à tous mes collègues de laboratoire qui ont contribué à l'ambiance agréable du labo. Marie-Hélène, Valérie, Dario, Miriam, Ève-Line et Julie, j'ai beaucoup apprécié le bon temps passé avec chacun de vous et votre bonne humeur me manquera ! Julie, un merci spécial pour ton aide qui m'a sauvée du désastre à de multiples reprises ! Tu es une assistante de recherche géniale et une très bonne amie.

Je tiens aussi à remercier Dr Hugo Soudeyns ainsi que Dr Ciro Piccirillo pour avoir accepté d'accorder de leur temps à la lecture de mon mémoire.

Enfin, je souhaite remercier tous les gens de mon entourage qui m'ont supporté dans la réalisation de ma maîtrise. À toute ma famille, merci pour vos encouragements que j'ai su apprécier à leur juste valeur à plusieurs moments. À mes amis, merci pour les rires et les activités qui m'ont permis de garder la forme et le sourire ! Finalement, Yoan, merci pour ton précieux soutien, ta présence me fait beaucoup de bien.

1. INTRODUCTION

1.1 INTRODUCTION

1.1.1 Résumé de la réponse immunitaire

Le système immunitaire défend et protège l'organisme contre les infections à l'aide de deux groupes d'acteurs principaux qui agissent en coopération. D'une part, l'immunité innée, qui est la première barrière que rencontrent les pathogènes, peut nous protéger de façon non spécifique contre tout corps étranger en activant toute une armée de cellules capables de créer de l'inflammation, d'activer le système du complément ou de tuer des cellules infectées. Les cellules NK, les macrophages et les neutrophiles sont les principaux acteurs de l'immunité innée et sont activés suite à la reconnaissance de signaux de danger, comme par exemple des structures bactériennes conservées. Lorsque les mécanismes non spécifiques de l'immunité naturelle ne suffisent pas pour éliminer l'agent infectieux, il y a recrutement et activation des cellules qui font partie du système acquis, les lymphocytes T et B, qui eux vont cibler directement l'agent infectieux ou antigène (Ag) qu'ils reconnaîtront de façon spécifique grâce à des récepteurs dirigés contre celui-ci.

La réponse immunitaire acquise peut être humorale ou à médiation cellulaire. L'immunité humorale comprend les lymphocytes B qui sécrètent des anticorps (Ac) spécifiques aux Ag rencontrés capables de lier les pathogènes et de les neutraliser. La destruction de l'agent invasif par les Ac peut aussi se faire via le recrutement du système du complément et par opsonisation. L'immunité à médiation cellulaire, elle, fait appel aux lymphocytes T auxiliaires ($CD4^+$) et cytotoxiques ($CD8^+$). Les lymphocytes T auxiliaires orchestrent la réponse immunitaire et peuvent se différencier en cellules $CD4^+$ Th1 (T «helper») ou Th2 qui sécrètent différentes cytokines. Généralement, les Th1 sécrètent de l'interféron- γ (IFN- γ) et du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) tandis que les Th2 produisent les interleukines 4, 5, 10 et 13 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). La réponse Th1 est enclenchée lorsque l'organisme est infecté par un pathogène intracellulaire qui envahit les vésicules des macrophages comme le parasite *Leishmania*. La réponse Th2, quant à elle, se caractérise par la promotion d'une réponse humorale durant laquelle l'activation des lymphocytes B par les Th2 provoque la sécrétion d'Ac qui permettront de combattre les pathogènes

extracellulaires. De leur côté, les cellules T CD8⁺ cytotoxiques utilisent deux mécanismes pour tuer les cellules infectées par les microorganismes intracellulaires tels que les virus, soit la relâche de granules de perforine ou l'induction de l'apoptose par la voie de Fas/FasL. Elles acquièrent aussi la capacité de sécréter des cytokines inflammatoires tel que l'IFN- γ .

1.1.2 Réponse immunitaire des lymphocytes T

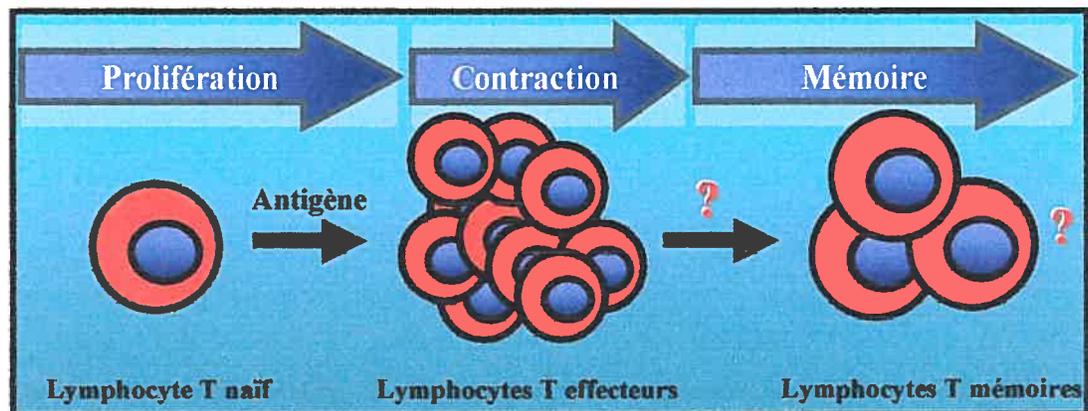


Figure 1. Phases de la réponse immunitaire des lymphocytes T. Lorsqu'un pathogène infecte l'organisme, les Tn qui expriment un récepteur spécifique pour des peptides antigéniques de cet agent infectieux s'activent, prolifèrent et se différencient en Te. Ces cellules acquièrent alors des fonctions effectrices et éliminent le pathogène. Ensuite, durant la phase de contraction, 90-99% des Te meurent par apoptose et une faible proportion d'entre eux se différencient en Tm capables de survivre à long terme dans l'organisme.

Les lymphocytes T sont présents dans le système immunitaire sous trois formes différentes qui correspondent à leur état d'activation (fig.1). Les lymphocytes T naïfs (Tn) patrouillent sans cesse l'organisme à la recherche d'agents infectieux. Lorsqu'un pathogène infecte l'organisme, celui-ci est d'abord capté et apprêté sous forme de peptides antigéniques par des cellules présentatrices d'Ag. Ces peptides sont alors présentés à la surface de ces cellules via des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi. Les Tn qui possèdent un récepteur des cellules T (RCT) spécifique pour ces peptides entrent en contact avec ceux-ci, ce qui leur fournit un signal d'activation qui les amène à proliférer et à se différencier en lymphocytes T effecteurs (Te) qui ont pour rôle d'éliminer l'agent pathogène. Suite à un défi antigénique, la majorité des

Te ayant combattu le pathogène meurent par apoptose de façon à rétablir l'espace homéostatique dans le système immunitaire. Toutefois, 1-10% des Te se différencient en lymphocytes T mémoires (Tm) qui confèrent à l'organisme une protection à long terme contre le pathogène éliminé.

La génération d'une population de Tm stable joue un rôle clé dans la protection à long terme des individus et constitue par le fait même la base du succès de la vaccination. De plus, le maintien de l'architecture des différents organes lymphoïdes ainsi que des cellules qui les composent s'avère essentiel pour parvenir à contrôler les agents infectieux qui nous attaquent au cours de notre vie. Les mécanismes qui permettent le développement et la survie des Tm sont encore mal compris. Dans ce mémoire, il sera question de deux aspects majeurs de la réponse immunitaire, soit le maintien de l'homéostasie au sein des organes lymphoïdes ainsi que le développement et la survie des Tm.

1.2 ARCHITECTURE DES ORGANES LYMPHOÏDES

1.2.1 Formation des organes lymphoïdes

Le système immunitaire est constitué de différents tissus et organes distribués dans l'organisme. Les organes lymphoïdes primaires (thymus et moelle osseuse) apportent les microenvironnements appropriés au développement et à la maturation des lymphocytes. Les organes lymphoïdes secondaires (ganglions et rate) constituent les sites où les lymphocytes matures peuvent efficacement entrer en interaction avec les Ag qui y sont transportés. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques connectent ces organes et permettent la circulation des cellules d'un endroit à l'autre dans le système. D'un point de vue anatomique, la structure générale des organes lymphoïdes secondaires est très bien conservée entre les espèces, suggérant un rôle critique de l'organisation de ces tissus dans leur fonctionnement. Les ganglions possèdent la structure typique de ces organes (fig.2) qui comprend une zone de cellules T et une zone de cellules B. Ils sont entourés d'une capsule et présentent une région corticale et une région médullaire.

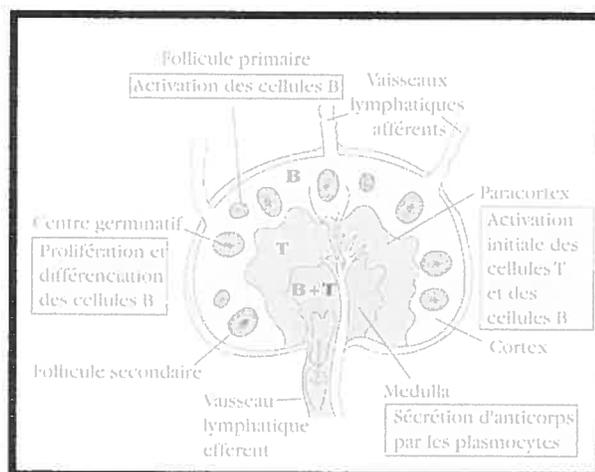


Image tirée de Goldsby REA *et al*, Immunology, 4th edition, 2000.

Figure 2. Structure des ganglions lymphatiques. Les trois couches d'un ganglion (paracortex, cortex et médulla) correspondent à des microenvironnements distincts. Les cellules dendritiques qui captent l'Ag sont présentes dans le cortex et le paracortex. Les cellules T sont concentrées dans le paracortex. Les cellules B sont localisées dans le cortex au sein des follicules et des centres germinaux. La médulla contient surtout des plasmocytes producteurs d'Ac.

Les molécules les plus importantes dans l'organogenèse des organes lymphoïdes font partie de la superfamille des TNF (tumor necrosis factor)-TNFR. Cette superfamille comprend une vingtaine de membres dont les rôles dans la régulation de la réponse immunitaire sont nombreux. La lymphotoxine α ($LT\alpha$) est un membre de la famille TNF qui inclut aussi CD40L, FasL, TRAIL, TNF- α , et la lymphotoxine β ($LT\beta$). La $LT\alpha$ peut se présenter sous forme d'homotrimère soluble ($LT\alpha_3$) qui joue un rôle dans une multitude de réponses inflammatoires. Toutefois, la forme qui nous intéresse le plus dans l'organogenèse des organes lymphoïdes est un hétérotrimère membranaire de la $LT\alpha$ associée à la $LT\beta$ ($LT\alpha_1\beta_2$). Cette forme membranaire possède une grande affinité pour le récepteur $LT\beta$ avec lequel elle interagit. L'expression de la $LT\alpha_1\beta_2$ peut être détectée sur les cellules T, B et NK activées et son récepteur est présent exclusivement sur les tissus non-lymphoïdes (cellules dendritiques, cellules stromales)¹⁻⁴. Plusieurs études ont proposé un rôle majeur de la voie de signalisation des lymphotoxines via le récepteur $LT\beta$ ($LT\beta R$) dans la formation et le maintien de la structure des organes lymphoïdes secondaires. Tout d'abord, nous savons qu'une déficience en $LT\alpha$ ($LT\alpha^{-/-}$) cause un défaut important dans la formation des ganglions et une absence des plaques de Peyers. Dans la rate de ces souris, on peut noter une forte

perturbation de l'architecture se traduisant par l'absence de zones de cellules T et de cellules B et la perte des cellules dendritiques folliculaires et interdigitées^{5,6}. Des résultats similaires ont pu être obtenus chez des souris $LT\beta^{-/-}$ et $LT\beta R^{-/-}$ de même que chez des souris chez lesquelles on injecte un Ac anti- $LT\beta$ ou une protéine de fusion $LT\beta R-Ig$ ⁷⁻⁹. La protéine de fusion $LT\beta R-Ig$ consiste en un récepteur de $LT\beta$ soluble qui se trouve en excès dans la circulation et qui abolit l'effet de la $LT\alpha_1\beta_2$ qui n'arrive plus à se lier à son vrai récepteur dans l'organisme. Dans un même ordre d'idées, il a été démontré que l'activation du récepteur $LT\beta$ à l'aide d'un Ac agoniste pouvait restaurer la formation des ganglions chez les souris $LT\alpha^{-/-}$ ¹⁰, ce qui renforce l'idée que l'acheminement des signaux de la $LT\alpha_1\beta_2$ via le $LT\beta R$ est crucial dans l'organogenèse des ganglions.

Il est aussi de plus en plus clair que les lymphotoxines sont impliquées dans la formation du microenvironnement qui caractérise les tissus lymphoïdes, tels que les follicules B, la ségrégation des lymphocytes T et B dans leurs zones respectives ou l'organisation spatiale des cellules dendritiques^{11,12}. Nous savons que les chémokines exprimées au niveau des organes lymphoïdes jouent aussi un rôle dans le recrutement et l'organisation des cellules à l'intérieur de ceux-ci. Les lymphotoxines ont la capacité de promouvoir la production de ces chémokines¹³.

D'autres membres de la famille des TNF sont impliqués dans l'organogenèse des organes lymphoïdes. Le ligand de RANK (récepteur activateur de NF- κ B), est surtout connu pour son rôle dans la formation de la masse osseuse. Toutefois, il a été noté chez des souris qu'une déficience en RANKL cause l'absence de formation des ganglions et une hypoplasie du thymus^{14,15}. RANKL pourrait aussi avoir un rôle à jouer dans les interactions entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques. En effet, RANKL peut stimuler la survie des cellules dendritiques via une augmentation de l'expression de Bcl-XL et engendre l'activation et la prolifération des lymphocytes T par celles-ci¹⁶⁻¹⁸.

L'organogenèse des organes lymphoïdes implique donc plusieurs molécules qui agissent de concert pour permettre leur développement et leur organisation cellulaire. Les cellules des organes lymphoïdes constituent les

principaux acteurs de la réponse immunitaire. Dans la prochaine section, il sera donc question des différents types cellulaires qui peuplent ces organes.

1.2.2 Cellules des organes lymphoïdes

1.2.2.1 Les cellules stromales

Les cellules réticulaires fibroblastiques constituent la majeure population de cellules stromales des ganglions et forment le réseau interne de ceux-ci¹⁹. Elles ont longtemps été considérées comme de simples cellules de soutien mais il est de plus en plus clair qu'elles détiennent plusieurs fonctions additionnelles. En effet, il a été montré que les cellules du stroma ganglionnaire expriment des molécules de surface et produisent des chémokines d'adhésion aux organes lymphoïdes pour les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B^{11,20,21}. Par exemple, CCL19 et CCL21, deux chémokines qui attirent les cellules T au niveau des ganglions, sont constitutivement exprimées par les cellules stromales situées dans la zone T de ces organes²². De plus, les cellules stromales de la zone de cellules B produisent la chémokine CXCL13, qui elle entraîne les lymphocytes B dans les follicules B²³. Enfin, nous savons que l'IL-7, une cytokine importante dans le maintien des populations lymphocytaires (voir section 1.5), est également sécrétée par ces cellules^{24,25}. Les cellules réticulaires fibroblastiques jouent aussi un rôle majeur lors d'une réponse immunitaire contre un pathogène en aidant à la réorganisation de la matrice et de l'architecture des ganglions qui s'hypertrophient de façon spectaculaire durant l'expansion clonale des cellules spécifiques à l'Ag²⁶.

1.2.2.2 Les cellules dendritiques

Les ganglions abritent plusieurs types de cellules dendritiques qui sont des cellules se différenciant à partir de précurseurs hématopoïétiques de la lignée myéloïde ou lymphoïde. La plupart des cellules dendritiques de l'organisme appréhendent les Ag et les présentent aux lymphocytes T au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Différents types de cellules dendritiques ont été identifiés selon leur localisation dans l'organisme. Par exemple, les cellules de

Langerhans sont rencontrées essentiellement dans l'épiderme et les muqueuses tandis que les cellules dendritiques interdigitées se trouvent dans les zones de cellules T des ganglions et de la rate et dans la zone médullaire du thymus²⁷.

Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans la présentation des Ag aux lymphocytes T. Elles appréhendent et présentent des peptides antigéniques associés à leurs molécules du CMH. Suite à la reconnaissance d'un signal de danger fourni par certaines protéines bactériennes ou virales conservées, elles deviennent matures et expriment les molécules de co-stimulation CD80 et CD86^{28,29}. Les lymphocytes T peuvent ainsi reconnaître les peptides antigéniques portés par les cellules dendritiques, ce qui conduit à leur activation.

Un autre type de cellule dendritique, la cellule dendritique folliculaire, se localise dans les follicules du ganglion qui sont riches en cellules B. Ces cellules permettent la prolifération et la différenciation des cellules B dans les centres germinaux³⁰. Elles se spécialisent particulièrement dans la stimulation des lymphocytes B mémoires spécifiques à un Ag lors d'une réponse secondaire.³⁰⁻³².

1.2.2.3 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B entrent dans les ganglions via les HEV (high endothelial veinule) et passent par la zone des cellules T pour ensuite être attirés au niveau des follicules par des chémokines. Lors d'un défi antigénique, les cellules B migrent au bord d'un follicule primaire, où elles rencontrent une cellule T CD4⁺ spécifique à l'Ag, et initient alors la formation d'un centre germinale qui permet le développement de cellules B mémoires et de plasmocytes de forte affinité pour l'Ag combattu³³.

1.2.2.4 Les lymphocytes T

Les cellules T naïves circulent constamment dans le sang et les organes lymphoïdes et sont sans arrêt à l'affût d'une rencontre possible avec un Ag. Elles

expriment la L-sélectine CD62L qui leur permet d'entrer dans les ganglions par les HEV qui expriment le ligand de CD62L, la PNad (peripheral node adressin). La molécule d'adhésion LFA-1 joue aussi un rôle dans l'entrée des Tn dans les ganglions. Les Tn sont retenus dans la zone T des ganglions lymphatiques pour environ 24h³⁴, en partie grâce au signal qu'elles reçoivent via leur récepteur CCR7, en réponse aux chémokines CCL19 et CCL21 produites par les cellules stromales et les cellules dendritiques^{35,36}. Les HEV sont les seuls vaisseaux sanguins de l'organisme qui possèdent les ligands de toutes ces molécules, ce qui facilite l'entrée des Tn dans le paracortex des ganglions. C'est à cet endroit qu'ils entrent en contact avec les cellules dendritiques qui leur présentent des Ag dans le but de les activer ou simplement de leur fournir un signal de survie. Dans cet ordre d'idée, il a été démontré par microscopie que chaque cellule dendritique peut contacter environ 500 cellules T différentes en une heure³⁷. Enfin, des expériences ont révélé que des souris RAG^{-/-} et SCID, déficientes en lymphocytes T, présentent une réduction du nombre de cellules dendritiques dans leurs ganglions et que leur capacité de stimuler des Tn est aussi compromise³⁸. Le rôle des interactions entre les cellules dendritiques et les Tn dans les ganglions est donc très important pour le maintien de ces deux populations cellulaires.

1.3 REPONSE DES LYMPHOCYTES T

1.3.1 Développement des cellules T et diversité

Le développement des lymphocytes T prend place dans le thymus où les précurseurs des lymphocytes provenant de la moelle osseuse se différencient en passant par divers stades de maturation et de sélection. Suite à ces processus, les lymphocytes T matures de spécificités variées deviennent moins aptes à répondre à des Ag du soi et à induire l'auto-immunité. Ils sont ainsi prêts à quitter le thymus pour aller patrouiller l'organisme à la recherche de leurs Ag spécifiques.

C'est effectivement dans le thymus que les lymphocytes T acquièrent leur spécificité à un peptide antigénique donné qu'ils reconnaîtront via leur récepteur spécifique (RCT). Le séquençage des acides aminés des chaînes α et β des RCT a révélé une structure en domaine extrêmement semblable à celle du récepteur des

cellules B; ainsi, les RCT sont considérés comme des membres de la superfamille des immunoglobulines. Les RCT sont des protéines membranaires généralement composées de deux chaînes, α et β , qui comprennent des régions constantes et des régions variables. Les gènes du RCT sont organisés en familles multigéniques correspondant aux chaînes α et β . Chaque famille multigénique contient de multiples segments géniques des régions variables (V, J dans l'ADN des chaînes α ; V, D, J dans l'ADN des chaînes β) ainsi qu'un ou plusieurs segments géniques de la région constante C. Par des mécanismes de recombinaison impliquant les recombinases RAG 1 et 2, les cellules T joignent, de façon aléatoire, les segments géniques entre eux pour former des gènes fonctionnels codant pour les chaînes α et β du RCT. La jonction des segments géniques lors du réarrangement des gènes des RCT peut aussi provoquer l'ajout de nucléotides aux sites des jonctions. En raison de ces mécanismes, la diversité potentielle des gènes des RCT est extrêmement grande, soit d'environ 10^{13} RCT de spécificités différentes³⁹.

Étant donné que les chaînes α et β du RCT présentent une courte queue cytoplasmique, le RCT est toujours associé au complexe CD3 composé de 5 chaînes polypeptidiques qui permet la transduction des signaux. Les chaînes du CD3 (γ , ζ , ϵ , δ , η) s'associent entre elles pour former 3 dimères dont les longues queues cytoplasmiques contiennent une séquence commune ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Ce motif, présenté à raison de trois copies sur les chaînes ζ du CD3 et d'une copie sur les autres chaînes, est composé de la séquence conservée (D/E)XXYXXLX₍₆₋₈₎YXXL. Il est impliqué dans la transmission des signaux lors de la reconnaissance d'un Ag par le RCT⁴⁰.

1.3.2 Reconnaissance antigénique

Les Tn, qui n'ont jamais rencontré l'Ag pour lequel ils sont spécifiques, patrouillent l'organisme et circulent entre les différents organes lymphoïdes à la recherche d'agents infectieux. Ce cheminement appelé immunosurveillance est possible grâce à l'expression par les Tn de la L-sélectine (CD62L) et du récepteur de chémokine CCR7 qui leur permettent d'entrer dans les organes lymphoïdes

secondaires lors de leur patrouille. Dans les ganglions, les cellules dendritiques ayant migré des sites périphériques où se trouvent les infections présentent aux cellules T naïves des fragments peptidiques d'Ag via une molécule du soi du CMH de classe I ou II. Les Tn spécifiques aux peptides présentés reconnaissent les complexes CMH-peptides via leur RCT. Les molécules du CMH de classe I (CMH-I), exprimées par presque toutes les cellules nucléées de l'organisme, présentent les fragments peptidiques de protéines synthétisées dans le cytosol (soit des fragments de protéines cellulaires du soi, soit des peptides provenant d'Ag endogènes). Contrairement aux molécules du CMH-I, celles du CMH de classe II (CMH-II) sont exprimées exclusivement par les cellules présentatrices d'Ag, soit les cellules B matures, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces molécules présentent aussi bien des protéines cellulaires du soi que des Ag exogènes ayant été phagocytés et dégradés par la vacuole phagolytique. Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent les Ag présentés par le CMH-I tandis que les cellules T CD4⁺ s'activent suite à leur liaison avec des Ag présentés par le CMH-II⁴¹.

1.3.3 Prolifération clonale des lymphocytes T

Suite à la reconnaissance d'un Ag étranger par un Tn, la cellule se met à proliférer et acquiert au même moment des fonctions effectrices. Pour ce faire, la cellule, en plus de recevoir un signal de reconnaissance antigénique via son RCT, doit obtenir un second signal délivré par les molécules de costimulation CD80 et CD86 exprimées à la surface des cellules présentatrices d'Ag matures et qui interagissent avec CD28, présent sur les lymphocytes T^{41,42}. En effet, les souris déficientes pour CD28 ou ses ligands CD80 et CD86 présentent des réponses immunitaires compromises⁴³⁻⁴⁵. Dans le cas où la cellule T naïve reçoit bien ces deux signaux, il se produit une transmission de signaux intracellulaires responsable de la prolifération et de la différenciation en cellules T effectrices (Te) (fig.3). Ces signaux sont d'abord initiés par une interaction du complexe RCT-CD3 accompagné des co-récepteurs CD4 ou CD8 avec un complexe CMH-peptide. Brièvement, en premier lieu, la kinase lck de la famille src, qui est associée au co-récepteur CD4 ou CD8, phosphoryle les motifs ITAM des chaînes du CD3^{46,47}. Une fois les ITAM phosphorylés, il y a recrutement de la kinase Zap-

70 au niveau de ces motifs sur la chaîne ζ du CD3. Lck phosphoryle alors Zap-70 qui devient active et qui phosphoryle à son tour différents adaptateurs dont le plus important est LAT. Ce sont ces molécules adaptatrices qui ensuite propagent le signal jusqu'aux principales voies de signalisation, les MAP-kinases, PLC γ et PI3K. L'activation des lymphocytes T augmente de 100 à 5000 fois le nombre de cellules spécifiques à l'Ag^{48,49}. La différenciation en T_e permet non seulement aux cellules de migrer au site d'infection mais aussi d'acquérir des fonctions effectrices comme la production de cytokines ou la cytotoxicité. Toutefois, dans le cas où la maturation d'une cellule présentatrice d'Ag n'est pas complète, celle-ci est incapable, lors du contact avec un lymphocyte T, de fournir à ce dernier un signal de co-stimulation. Le lymphocyte T, au lieu d'être activé, devient alors tolérant à l'Ag présenté.

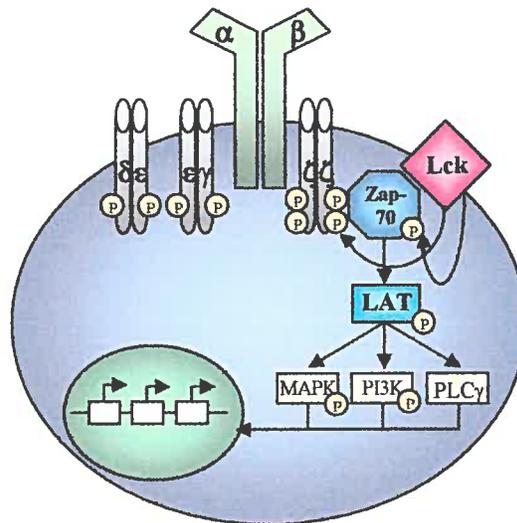


Figure 3 Signalisation intracellulaire suivant l'activation d'un lymphocyte T La reconnaissance d'un complexe CMH-peptide par un RCT provoque le recrutement de la kinase lck au niveau de la synapse. La phosphorylation des ITAM du CD3 par lck permet la liaison et la phosphorylation de Zap-70 qui, une fois activé, phosphoryle à son tour l'adaptateur LAT. LAT peut engendrer l'activation de la voie Ras qui initie une cascade de phosphorylations connue sous le nom des MAP kinases, ou encore des voies PI3K et PLC γ . L'effet collectif des divers facteurs de transcription activés par ces voies de transduction est d'augmenter l'expression de gènes qui permettent l'activation et la prolifération des lymphocytes T, dont l'IL-2.

La capacité des lymphocytes T à proliférer rapidement suite à une stimulation antigénique est d'une importance cruciale dans la défense de l'hôte contre les corps étrangers. L'activation des cellules T est dépendante d'une bonne présentation antigénique par les cellules présentatrices d'Ag. Ces cellules, dépendamment de leur état de maturation, peuvent induire différentes réponses des lymphocytes T comme une activation complète de ceux-ci suivie de développement de cellules mémoires, ou encore l'induction de la tolérance. La durée de stimulation a une influence directe sur le programme d'activation des lymphocytes T. *In vivo*, une stimulation antigénique de 4h n'est pas suffisante pour induire la prolifération clonale des cellules T naïves et leur différenciation en cellules T effectrices. Une stimulation de 20h ou plus est absolument requise pour optimiser la réception du signal de prolifération qu'est l'IL-2, un facteur sécrété par les lymphocytes T activés eux-mêmes⁵⁰. En effet, il a été montré que l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2, CD25, diminue considérablement sur les cellules T naïves quelques heures avant d'entrer en prolifération lorsque celles-ci sont stimulées pendant 4h seulement. D'un autre côté, les lymphocytes T CD8⁺ stimulés pendant 20h maintiennent une expression élevée de CD25 au cours du temps, produisent plus d'IL-2 et présentent une fonction tueuse accrue. Ces résultats suggèrent donc qu'une stimulation soutenue est requise pour la prolifération clonale et l'activation efficace des lymphocytes T CD8⁺.

1.3.4 Phase de contraction et développement des T_m

Suite à l'élimination de l'agent pathogène par les lymphocytes T effecteurs, l'organisme ne bénéficie plus de la présence massive de ces cellules T activées. En effet, la persistance de ces cellules dans le système aurait sans doute des effets très néfastes à cause de leur capacité à sécréter des cytokines cytotoxiques. De plus, l'espace qu'elles occupent devient désormais indisponible pour l'arrivée de nouvelles cellules T naïves du thymus. Le maintien d'un nombre exhaustif de T_e augmente alors la compétition pour les facteurs de croissance et de survie, compromettant ainsi la survie des autres cellules T naïves et, par conséquent, la réponse aux nouveaux Ag. Pour ces raisons, la majorité des

lymphocytes T ayant participé à la réponse contre l'Ag meurent par apoptose tandis que 1-10% d'entre eux se différencient en T_m qui protègent l'organisme à long terme contre le pathogène ayant fait l'objet de l'infection⁵¹⁻⁵³. La phase de contraction sert donc à rétablir l'homéostasie dans les organes lymphoïdes en permettant de préserver la flexibilité de la réponse des lymphocytes T aux nouvelles infections, tout en maintenant des lymphocytes T mémoires spécifiques aux pathogènes déjà rencontrés.

Dans plusieurs modèles, l'initiation de la phase de contraction est associée avec l'élimination du pathogène. Cette observation suggère que les T_e peuvent sentir la fin de l'infection et la diminution de la disponibilité des cytokines de survie dans l'organisme. Cela pourrait alors provoquer l'enclenchement des mécanismes de mort de la phase de contraction. Toutefois, il a été montré que peu importe l'expansion et la durée de l'infection, la cinétique de la contraction demeure semblable^{54,55}. Ces résultats suggèrent que la phase de contraction menant à une population de T_m est un processus programmé très tôt suivant l'infection par le pathogène.

Sachant que des souris déficientes pour l'IFN- γ ne présentent pas de phase de contraction suite à une immunisation, il a été proposé que l'inflammation causée au début d'une réponse immunitaire pourrait être à l'origine de l'initiation de la contraction. En pré-traitant des souris avec un antibiotique puis en les immunisant par la suite avec la bactérie *Listeria monocytogenes* atténuée, Badovinac *et al* sont arrivés à montrer que lorsque l'inflammation au début de la réponse était moindre ou même nulle, il n'y avait plus d'enclenchement de la phase de contraction⁵⁵.

1.3.5 Différenciation des lymphocytes T effecteurs en mémoires

Un des aspects encore mal caractérisé de la réponse immunitaire est la façon par laquelle les T_m sont générés à partir des T_n. Différents modèles expliquant la différenciation des T_n en T_m ont été proposés. Jusqu'à présent, le modèle le plus accepté suggère que les T_m dérivent directement des T_e ayant

survécu lors de la phase de contraction de la réponse immunitaire^{53,56-59} (fig. 4). Effectivement, nous savons entre autres que le transfert de Te générés *in vitro* dans des hôtes naïfs permet la génération de Tm spécifiques pour l'Ag combattu⁵⁸.

Si ce modèle est vrai, cela signifie que 1-10% des lymphocytes T effecteurs trouvent un moyen d'échapper à l'apoptose de la phase de contraction et de subir un processus de différenciation additionnel pour devenir des Tm. Nous savons que l'IL-7 joue un rôle majeur dans la génération des cellules T mémoires en permettant chez celles-ci d'augmenter l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2⁶⁰. En effet, une expérience de compétition consistant en un transfert conjoint de cellules T CD8⁺ OT-1 IL-7R⁺ et IL-7R⁻ dans une souris suivie de son immunisation avec le virus de la vaccine codant pour l'ovalbumine a provoqué un développement efficace de Tm. Il a par la suite été démontré que ces cellules mémoires CD8⁺ provenaient à 90% des cellules naïves OT-1 qui exprimaient le récepteur de l'IL-7 à leur surface (IL-7R⁺)⁶⁰. L'IL-7 serait donc impliquée dans la survie des Te lors de la phase de contraction et le développement des Tm.

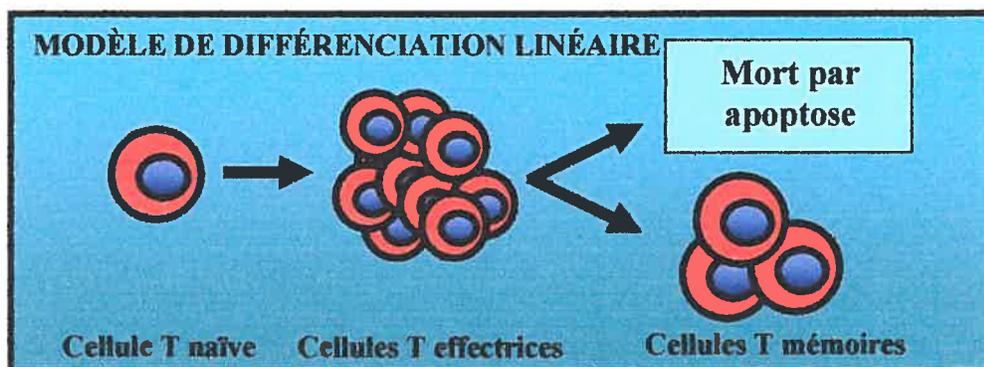


Figure 4. Modèle de différenciation linéaire des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T mémoires. Suite à l'activation d'un Tn et à sa différenciation en plusieurs Te, il y a formation de Tm. Le modèle de différenciation linéaire stipule que certains Te échappent à l'apoptose de la phase de contraction et deviennent des Tm.

Malgré l'apoptose massive que subit la majorité des Te, certaines cellules effectrices, par un mécanisme inconnu, échappent à la mort et subissent un processus additionnel de différenciation en Tm. Kaech *et al* ont récemment

proposé un modèle d'identification des Te précurseurs des Tm CD8⁺ ⁶¹. Les cellules effectrices qui survivent lors de la phase de contraction maintiendrait un niveau élevé de la chaîne α du récepteur de l'IL-7 (IL-7R) comparativement à celles qui succombent à l'apoptose. Cette observation a été bien acceptée entre autres parce que l'IL-7 avait déjà été caractérisée comme étant une cytokine nécessaire pour le développement des cellules T mémoires CD8⁺ ⁶⁰. L'acheminement d'un signal via le IL-7R provoque une augmentation de l'expression du facteur de survie Bcl-2 dans la cellule. En maintenant des taux élevés de IL-7R à leur surface, les Te précurseurs des Tm pourraient ainsi échapper à l'apoptose massive observée lors de la phase de contraction. Dans un même ordre d'idées, il a été montré que l'absence de contraction était associée à une forte expression de l'IL-7R α chez les Te, et ce même au pic de la réponse immunitaire⁵⁵. Enfin, d'autres études sont nécessaires pour confirmer que cette observation s'applique à tous les modèles d'immunisation.

Chez les lymphocytes T CD8⁺, il a récemment été montré que l'expression de l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ serait induite de façon transitoire sur un sous-type de cellules T CD8 $\alpha\beta$ suite à une stimulation antigénique. Ces molécules CD8 $\alpha\alpha$ permettraient la survie et la différenciation des lymphocytes T ainsi activés en Tm CD8⁺ ⁶². Les Te précurseurs des Tm CD8⁺ pourraient donc être identifiés à l'aide de ce nouveau marqueur.

Finalement, un autre facteur récemment identifié, Spi2A (serine protease inhibitor 2A), participe au développement des Tm. Le gène de Spi2A a d'abord été découvert par la technologie d'hybridation d'ARNm de cellules effectrices et mémoires sur une banque de gènes de souris (gene array). La protéine Spi2A, dont l'expression est accrue chez les lymphocytes Te et Tm CD8⁺, agit lors de la phase de contraction en inhibant les protéases lysosomales et la mort cellulaire programmée. Ce nouveau facteur de survie fait partie d'une nouvelle classe de molécules endogènes qui induisent la formation des Tm CD8⁺ ⁶³.

1.3.5.1 Le rôle de l'aide CD4⁺

En 2002-2003, plusieurs articles publiés de façon consécutive ont apporté une nouvelle vision de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ en proposant l'idée qu'une aide des lymphocytes T CD4⁺ est absolument requise pour la génération de Tm CD8⁺ capables de répondre efficacement à un second défi antigénique. Ce phénomène a d'ailleurs été établi dans plusieurs modèles de réponses immunitaires dont la réponse monoclonale de cellules T CD8⁺ spécifiques pour l'Ag mâle HY^{64,65}, la réponse polyclonale à une infection virale contre LCMV⁶⁶, la réponse au virus de la vaccine exprimant la glycoprotéine GP-33 de LCMV⁶⁷ ainsi que la réponse à la bactérie *Listeria monocytogenes* encodant la protéine recombinante de l'ovalbumine⁶⁸. De plus, diverses stratégies de déplétion des lymphocytes T CD4⁺ ont été employées telles que l'utilisation de souris déficientes en CD4 ou en molécules du CMH-II essentielles au maintien des CD4⁺, ou encore l'injection d'Ac anti-CD4⁺. Dans tous les cas, la réponse primaire suivant l'immunisation semblait normale puisqu'il y avait bien expansion de cellules T CD8⁺ spécifiques à l'Ag, sécrétion d'IFN- γ et activité cytotoxique de celles-ci. Toutefois, les auteurs ont noté une forte diminution de la prolifération obtenue suite à une réponse secondaire dirigée contre le même Ag chez les souris chez lesquelles les cellules mémoires CD8⁺ s'étaient développées en absence de cellules CD4⁺⁶⁴⁻⁶⁸. De plus, le niveau de sécrétion de cytokines de ces Tm CD8⁺ ressemblait davantage à celui de Tn, suggérant que la fonctionnalité Tm CD8⁺ générés sans cellules T CD4⁺ était compromise.

Deux mécanismes basés sur l'interaction entre les molécules de co-stimulation CD40 et CD40L ont été proposés pour expliquer le phénomène de l'aide des cellules CD4⁺ dans la génération de cellules T mémoires CD8⁺. Nous savons que des déficiences en CD40 ou en CD40L diminue l'efficacité des réponses des cellules T CD8⁺^{69,70}. Normalement, l'activation de lymphocytes T CD4⁺ provoque l'expression de CD40L à leur surface, leur permettant ainsi d'activer les cellules présentatrices d'Ag qui expriment CD40. Cette activation ou maturation les rend alors aptes à activer les lymphocytes T CD8⁺ en leur fournissant un signal complet d'activation (Ag et co-stimulation via CD28). L'activation des cellules présentatrices d'Ag est un mécanisme essentiel à la

génération de cellules T mémoires CD8⁺ fonctionnelles. Dans ce cas, les Ag capables d'induire l'activation des cellules présentatrices d'Ag sans stimuler les cellules T CD4⁺ pourraient donc permettre le développement de Tm CD8⁺ fonctionnels sans aide CD4⁺, ce qui n'est pas le cas⁶⁸. Toutefois, les expériences de Bourgeois *C. et al* et de Lu *Z. et al* montrent que l'aide CD4⁺ se produit même lorsque les cellules présentatrices d'Ag sont dépourvues de CD40^{65,71}. Bourgeois *C. et al* proposent plutôt une interaction directe entre les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ grâce à une expression transitoire du CD40 par les cellules T CD8⁺ activées⁶⁵.

Pourtant, les derniers articles sur le sujet ont bien montré, à l'aide de souris déficientes en CD40, que l'aide CD4⁺ ne dépendait pas de l'interaction entre CD40 et CD40L. En effet, lors d'infections avec *Listeria monocytogenes* ou le virus LCMV, les Tm CD8⁺ générés sans CD40 présentaient une fonctionnalité comparable à ceux produits dans des souris exprimant CD40. Donc, il semble que l'aide CD4 puisse être fournie par des cellules T CD4⁺ n'exprimant pas le CD40L^{72,73}.

1.4 LES LYMPHOCYTES T MEMOIRES

1.4.1 Caractéristiques

1.4.1.1 Rapidité et cinétique

Les Tm possèdent plusieurs caractéristiques qui les différencient des cellules T naïves. Tout d'abord, lors d'une seconde infection par un pathogène ayant déjà été combattu par l'organisme, les Tm peuvent répondre beaucoup plus rapidement et ainsi subir une phase d'expansion en quelques heures seulement^{74,75}. Elles ont même la capacité de réagir à des doses d'Ag plus faibles que les Tn de la même spécificité, ce qui rend leur réponse beaucoup plus sensible⁷⁶. De plus, contrairement aux Tn, certains Tm entrent en contact rapidement avec les pathogènes grâce à leur capacité à s'installer dans les muqueuses ou autres tissus périphériques⁷⁷⁻⁸⁰. Ceci est possible grâce à l'expression de molécules d'adhésion aux tissus et de certains récepteurs de chémokines. Cette aptitude à demeurer en périphérie confère à certains Tm un avantage important lors d'une infection puisqu'ils peuvent migrer rapidement aux sites d'infection.

Deuxièmement, la réponse des Tm contre les pathogènes est beaucoup plus efficace que celle des Tn. Ceci est en partie dû au fait que la fréquence de cellules T mémoires spécifiques à un épitope antigénique est plus grande que celle des Tn, ce qui confère aux Tm un avantage cinétique important lors d'une ré-infection par un pathogène. En effet, contrairement à la réponse primaire, la réponse secondaire ne requiert que quelques divisions cellulaires pour générer un grand nombre de cellules effectrices⁸¹.

1.4.1.2 Marqueurs

Plusieurs marqueurs ont été identifiés pour distinguer les Tm des cellules T naïves ou effectrices. La plupart d'entre eux consistent en des molécules d'adhésion. Le marqueur de Tm dont l'expression à long terme est la plus stable est CD44. Chez les Tm CD8⁺, l'expression importante de CD44 peut être maintenue indéfiniment, tandis que les Tn ne l'expriment pas^{82,83}. Toutefois, chez les Tm CD4⁺, le niveau d'expression de CD44 semble moins stable, ce qui en fait un marqueur moins bien approprié mais tout de même assez représentatif⁸⁴.

Un autre marqueur communément utilisé pour distinguer les Tm des Tn est la molécule CD45⁸⁵. Différentes isoformes (A,B ou C) de cette molécule peuvent être exprimées sur les lymphocytes T naïfs et mémoires. En général, le phénotype des cellules T peut être déterminé en fonction de l'expression différentielle de ces isoformes à leur surface. Par exemple, chez la souris, il a été montré que les Tm CD4⁺ maintiennent un niveau d'expression de CD45RB plus faible que les Tn, et ce longtemps après l'élimination de l'Ag⁸⁶.

Enfin, chez les Tm CD8⁺, les deux changements phénotypiques qui semblent les plus stables sont une expression accrue de Ly6C et de CD122. Ly6C est une protéine de surface de faible poids moléculaire sans ligand connu et dont la fonction *in vivo* n'a pas encore été élucidée. CD122 (IL-2R β) est une composante des récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15⁸⁷. Puisque l'IL-15 est connue pour avoir un rôle dans la formation des Tm CD8⁺ et leur maintien, l'expression de son récepteur sur ces derniers pourrait avoir une fonction significative.

1.4.1.4 Auto-renouvellement et survie

Le taux de division des lymphocytes T naïfs et mémoires a été étudié chez différentes espèces dont la souris par incorporation de bromodeoxyuridine (BrdU) dans l'ADN ⁸⁸. Les résultats de ces expériences montrent que les cellules présentant un phénotype mémoire se divisent plus rapidement que les lymphocytes T ayant un phénotype naïf. Chez l'humain, la demi-vie des T_m dans le sang a été estimée entre 22 et 79 jours tandis que celle des T_n se trouve entre 116 et 365 jours ⁸⁹. Les données obtenues chez les autres espèces sont semblables.

Ces études ont démontré que les T_m persistent dans l'organisme grâce à des divisions assez fréquentes tandis que les cellules T naïves demeurent plutôt quiescentes. Grâce à cette capacité d'auto-renouvellement, les T_m ont donc la possibilité d'être maintenues pour de longues périodes voire des années. Les différents facteurs régulant la survie des T_m seront présentés en détails à la section 1.5.3.

1.4.2 Sous-types

Il existe deux sous-types de T_m, les cellules T mémoires centrales (T_{mc}) et les cellules T mémoires effectrices (T_{me}) ^{77,90-94}. Ces deux types de T_m se distinguent par l'expression du récepteur de surface CCR7 dont les ligands sont les chémokines CCL19 et CCL21 et de la L-sélectine CD62L ⁷⁷. Les cellules T_{mc} expriment CCR7 ainsi que la L-sélectine, ce qui leur permet d'entrer dans les organes lymphoïdes par les HEV qui expriment les ligands de ces molécules (voir section 1.2.2.4) et d'attendre un signal antigénique pour s'activer. Les cellules T_{me}, quant à elles, n'expriment pas les molécules d'adhésion aux organes lymphoïdes CCR7 et CD62L, ce qui leur permet de circuler constamment dans l'organisme et d'être à la recherche active de corps étrangers. Des cellules T_{mc} et T_{me} ont été observées à la fois dans les populations de T_m CD4⁺ et CD8⁺. Les T_{mc} CD4⁺ produisent de l'IL-2 et de l'IL-10 et se divisent rapidement suite à une re-stimulation ^{77,93}. Les T_{mc} CD8⁺, elles, sécrètent de l'IL-2 de façon constitutive mais ont besoin d'être activées à nouveau par un Ag pour produire de l'IFN-γ ou

pour regagner leur fonction effectrice de production de perforine⁹². Contrairement aux Tmc, les Tme arrivent à produire des cytokines beaucoup plus rapidement. Les Tme CD4⁺, dès qu'ils sont re-stimulés par l'Ag, produisent de l'IFN- γ et de l'IL-4 tandis que les Tme CD8⁺, eux, maintiennent leur fonction effectrice de production de perforine^{77,92,93}. En bref, les Tme conservent leurs fonctions effectrices et sont prêtes à réagir dans le cas d'une ré-infection tandis que les Tmc résident dans les organes lymphoïdes où ils peuvent rapidement se diviser pour ensuite migrer aux sites d'infection en périphérie^{77,92,93}.

1.5 HOMEOSTASIE DES POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T

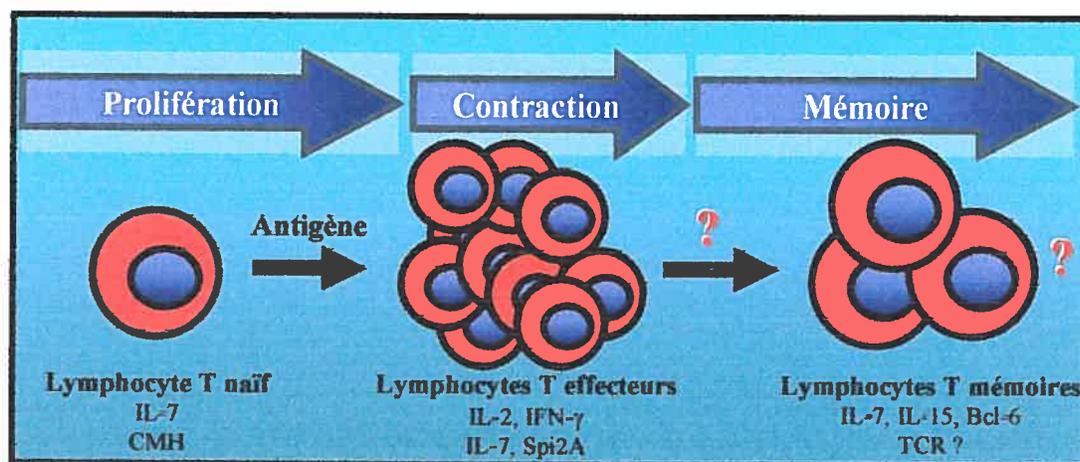


Figure 5. Facteurs homéostatiques régulant les phases de la réponse immunitaire. Le maintien des lymphocytes T à l'état naïf nécessite la présence d'IL-7 ainsi que de signaux fournis par l'interaction entre les RCT de ces cellules avec les complexes CMH-peptide de l'organisme. L'activation des Tn par un Ag provoque leur prolifération grâce à la sécrétion d'IL-2. Durant cette phase, les Tn deviennent des Te ayant une courte durée de vie. L'IL-2 et l'IFN- γ , au pic de la réponse immunitaire, induisent l'apoptose des Te. Durant la phase de contraction, l'IL-7 et le gène Spi2A constituent des facteurs protecteurs qui permettent à quelques Te de survivre et de se différencier en Tm. Ces cellules ont une longévité prolongée dans l'organisme grâce à l'IL-7 pour les Tm CD4⁺ et à l'IL-15 et au facteur de transcription Bcl-6 pour les Tm CD8⁺.

1.5.1 Homéostasie des lymphocytes T naïfs

Le maintien constant des différentes populations de lymphocytes T dans l'organisme est un défi de taille. Puisque le thymus produit 10^6 nouvelles cellules T à chaque jour, environ 5% de l'ensemble des cellules T naïves doit mourir pour conserver un nombre constant d'environ 20×10^6 cellules⁹⁵. Les cellules T naïves demeurent en interphase 77-88 jours et leur renouvellement dépend de la production de nouveaux lymphocytes T matures dans le thymus et l'exportation de ceux-ci vers l'organisme. Leur faible taux de division (moins de 20% des Tn se divisent dans une période de 5 semaines)⁸⁸ et le fait que suite à une thymectomie chez une souris adulte, le déclin de ces cellules est assez lent^{88,96-98} témoignent de cette durée de vie relativement longue.

Pour survivre, les Tn nécessitent une interaction constante de leur RCT avec les molécules du CMH présentant les peptides du soi dans l'organisme (fig.5). Ce phénomène a été démontré autant chez les cellules T naïves $CD4^+$ ⁹⁹⁻¹⁰⁵ que $CD8^+$ ¹⁰⁶ à l'aide de différents modèles expérimentaux dont une expression des molécules du CMH restreinte au thymus, des greffes de thymus foetaux dans des hôtes déficients en molécules du CMH ou encore le transfert de cellules T naïves dans des hôtes déficients en molécules du CMH. Cependant, une vaste gamme de demi-vies ont été rapportées lors de ces expériences privant les cellules T naïves de contacts avec les complexes CMH-peptides de l'organisme, avec une moyenne se situant autour de 3-4 semaines. D'autres essais impliquant cette fois une ablation de l'expression du RCT sur les Tn plutôt qu'une absence de CMH ont permis de confirmer les résultats précédents^{107,108}. La demi-vie de ces cellules T naïves dépourvues de l'expression du RCT a aussi été estimée à 3-4 semaines, comparativement à 11-12 semaines pour des cellules T naïves capables d'interagir avec le CMH^{107,108}. Enfin, Seddon *et al* ont proposé que l'acheminement de ce signal de survie délivré lors de l'interaction du RCT des Tn avec les molécules du CMH serait dépendant des kinases de la famille Src dont font partie lck et fyn¹⁰⁹.

En ce qui concerne les cytokines, il a clairement été démontré que l'IL-7 est requise pour le maintien des Tn¹¹⁰⁻¹¹³ (fig. 5). L'IL-7 soutient la survie des cellules T naïves en permettant un meilleur maintien de leur taille cellulaire et de

leurs fonctions métaboliques^{111,112}. Effectivement, il a été démontré qu'en présence d'IL-7, les Tn métabolisent activement le glucose et expriment les transporteurs de glucose à leur surface¹¹². L'IL-7 fait partie de la famille des cytokines de type I qui transmettent leur signal via un récepteur composé d'une chaîne commune γ (γ c). Au niveau moléculaire, nous savons qu'il existe un lien direct entre l'acheminement d'un signal via la chaîne γ c et l'expression de protéines pro- et anti-apoptiques de la famille Bcl-2^{114,115}. Il a entre autres été montré que l'IL-7 provoquait une augmentation de l'expression intracellulaire de Bcl-2, une molécule de survie, ce qui pourrait expliquer son rôle dans le maintien des cellules T naïves¹¹⁴.

1.5.2 Homéostasie des lymphocytes T effecteurs

L'homéostasie des Te se traduit par l'étude des facteurs régulant leur apoptose ou leur survie lors de la phase de contraction. Leur vie, relativement courte, est effectivement écourtée suite à l'élimination de l'agent infectieux qui attaque l'organisme. Suite à une reconnaissance antigénique par les lymphocytes T, l'activation des cellules spécifiques à l'Ag provoque une production importante d'IL-2 qui promeut leur amplification clonale (fig. 5). Une fois l'agent pathogène éliminé, il y a enclenchement d'un phénomène d'apoptose massive encouragée par l'IL-2 et l'IFN- γ ¹¹⁶⁻¹¹⁹ (fig. 5). En effet, l'IL-2 possède un rôle critique dans l'initiation de la mort cellulaire induite par un Ag (AICD)^{120,121}. De plus, il a été montré que chez des souris déficientes pour l'IFN- γ , la phase de contraction était fortement ralentie et presque inexistante¹¹⁷⁻¹¹⁹.

In vitro, il a été montré que les cellules T activées étaient susceptibles à une grande variété de signaux de mort cellulaire tels que Fas, le TNF- α et l'IL-2. De plus, il se produit une accumulation de lymphocytes T activés dans des souris déficientes pour plusieurs molécules différentes comme CTLA-4^{122,123}, l'IL-2¹¹⁶, CD25 (chaîne α du récepteur de l'IL-2)¹²⁴, Fas¹²⁵, le ligand de Fas¹²⁵, CD122 (chaîne β du récepteur de l'IL-2)¹²⁶ et le TGF- β ¹²⁷.

1.5.3 Homéostasie des lymphocytes T mémoires

1.5.3.1 La longévité de la mémoire immunologique

L'apport en cellules T mémoires dans l'organisme est le résultat de la différenciation de cellules T naïves suivant une réponse immunitaire. La présence des T_m ne prévient pas une réinfection par un pathogène déjà rencontré mais permet une réponse plus rapide et plus efficace que celle des T_n. Il reste encore beaucoup à apprendre sur les facteurs régulant l'homéostasie, c'est-à-dire le maintien, de ces cellules protectrices.

Les cellules mémoires sont capables, même sans stimulation antigénique, de survivre plusieurs mois voire des années dans l'organisme grâce à un mécanisme d'auto-renouvellement. La première observation relatant cette protection prolongée d'individus remonte à 1846, lorsque Panum, un médecin danois, nota que des gens ayant été infectés par le virus de la rougeole en 1781 étaient protégés contre l'épidémie de rougeole qui ravagea les Îles Faeroe 65 ans plus tard ¹²⁸. La mémoire immunologique, développée suite à une première rencontre avec un agent infectieux, peut donc protéger un individu contre celui-ci pour la vie. Bien que la mémoire développée contre le virus de la rougeole implique surtout l'immunité humorale et la production d'Ac, des évidences montrent que la mémoire des lymphocytes T peut aussi protéger à long terme. Le meilleur exemple est sans doute la démonstration qu'il est possible de détecter des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au virus de la vaccine chez des individus ayant été vaccinés 50 ans plus tôt contre le virus de la petite vérole (pour lequel on note une réactivité croisée avec le virus de la vaccine)¹²⁹. Le maintien à long terme d'une population de cellules T mémoires fonctionnelles est le principe à la base du succès de la vaccination.

1.5.3.2 La vaccination

La vaccination, dont le but premier est d'induire le développement de la mémoire immunologique à long terme contre un pathogène donné, existe depuis des dizaines d'années. En effet, dès la fin du 18^{ème} siècle, Jenner, considéré

comme le père de la vaccination, vaccinait les gens avec le virus de la vérole bovine, ce qui les protégeait contre le virus de la petite vérole sans les rendre malades¹²⁸. Le succès de ce traitement fût tel que cette maladie est, depuis 1981, éradiquée de la population. Depuis ce temps, divers vaccins ont permis de contrôler plusieurs autres grandes maladies dont la diphtérie, le tétanos, la fièvre jaune, la polio, la rougeole, les oreillons, la rubéole, etc. Aujourd'hui, de nouveaux vaccins continuent de valoriser les bienfaits de la mémoire immunologique en diminuant les effets secondaires qu'auraient pu causer certaines infections. Par exemple, il est maintenant démontré que le vaccin contre le virus de l'hépatite B a beaucoup diminué l'incidence de cancers du foie dans la population¹³⁰.

Les vaccins ayant eu le plus de succès jusqu'à présent font surtout appel à l'activation de l'immunité humorale, donc des lymphocytes B et au maintien de hauts titres d'Ac spécifiques au pathogène combattu suivant le traitement. Toutefois, la génération d'Ac d'une grande spécificité contre un pathogène limite l'efficacité des vaccins dans les cas où celui-ci subit des mutations. De plus, les Ac solubles sécrétés par les plasmocytes sont connus pour réagir contre des molécules étrangères solubles dans l'environnement extracellulaire. Ils n'envahissent jamais les tissus. Donc, malgré leur immense polyvalence, les Ac fournissent une immunité partielle et s'avèrent désarmés devant les microorganismes infectieux comme le bacille de la tuberculose qui s'intègre rapidement dans les cellules pour s'y multiplier. Dans de tels cas où l'agent infectieux reste peu de temps dans l'environnement extracellulaire ou subit des mutations, c'est la réaction immunitaire à médiation cellulaire et ses acteurs, les lymphocytes T, qui doivent intervenir.

Outre les maladies infectieuses, le cancer constitue un second fléau actuel que les scientifiques tentent de comprendre et de traiter. De plus en plus d'évidences suggèrent que les cellules du système immunitaire jouent un rôle important dans le contrôle de l'oncogenèse puisqu'il est possible d'observer chez des patients l'accumulation de ces cellules aux sites tumoraux¹³¹. La réponse anti-tumorale idéale qui devrait être générée débute par l'activation des cellules présentatrices d'Ag via des signaux de danger. Ces signaux peuvent être fournis

par les tumeurs en progression qui causent un stress important aux cellules transformées. Une fois matures, les cellules présentatrices d'Ag captent et appréhendent les Ag tumoraux et migrent aux ganglions afin d'activer les acteurs de l'immunité acquise. Les lymphocytes T et B se dirigent ensuite au site de la tumeur. L'activation des lymphocytes T résulte en une production de cytokines telles que l'IFN- γ et le TNF- α qui peuvent contribuer à l'arrêt de la prolifération des cellules malignes et de l'angiogénèse¹³². De plus, les cellules T CD8⁺ activées peuvent, à l'aide de perforine ou de la voie Fas/FasL, provoquer la lyse des cellules tumorales. Malheureusement, les tumeurs en progression utilisent de multiples stratégies pour s'évader du système immunitaire. Par exemple, il n'est pas rare d'observer une diminution de l'expression des molécules du CMH matures et des molécules de co-stimulation sur les cellules tumorales, provoquant ainsi une réponse d'anergie de la part des lymphocytes T¹³³. De plus, certaines tumeurs préviennent le déclenchement d'une réponse inflammatoire en bloquant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et interfèrent ainsi avec l'activation des cellules dendritiques¹³⁴. Il est donc essentiel de développer des traitements qui permettront d'optimiser la réponse immunitaire pouvant être générée contre les tumeurs.

Les connaissances acquises récemment sur l'immunité anti-tumorale ont permis de préciser les anomalies à corriger pour atteindre une réponse immunitaire efficace. Ce que l'on attend de l'immunothérapie des cancers est l'éradication des cellules néoplasiques sans affecter les cellules normales. Le concept de base de la thérapie anti-tumorale est d'amplifier sur le plan qualitatif et quantitatif les effecteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les stratégies thérapeutiques sont variées. Elles ont toutes pour objectif de lever l'anergie des cellules potentiellement réactives en les stimulant dans des conditions optimisées. Les vaccins impliquant l'immunité cellulaire et les lymphocytes T ont apporté jusqu'à présent des résultats encourageants. L'identification de plusieurs Ag tumoraux ont permis entre autres la production de vaccins de cellules dendritiques activées présentant ces Ag. Plus directement encore, il est possible d'injecter des lymphocytes T activés produits *in vitro* et dirigés contre ces Ag tumoraux. Ces vaccins ont montré une régression des tumeurs dans plusieurs modèles expérimentaux. Toutefois, dans de nombreux cas, les cellules effectrices injectées

ne persistent pas assez longtemps dans l'hôte pour permettre une élimination complète de la tumeur¹³⁵.

Il est clair que les vaccins faisant appel à la réponse des lymphocytes T laissent encore place à beaucoup d'améliorations puisque encore aujourd'hui, des pathogènes infectant l'organisme de façon chronique telles que le VIH, le HCV et la malaria ou encore les cancers demeurent sans traitement efficace. La compréhension des mécanismes de développement et de survie ainsi que des caractéristiques des Tm permettra sans doute d'instaurer de nouveaux vaccins plus efficaces.

1.5.3.3 Facteurs impliqués dans le maintien des lymphocytes T mémoires

Le maintien des populations de Tm CD4⁺ et CD8⁺ est régulé entre autres par différentes cytokines (fig. 5). Au niveau moléculaire, cette survie prolongée se traduit entre autre par une expression plus importante du facteur anti-apoptotique Bcl-2 chez les cellules T mémoires CD8⁺ comparativement aux T naïves¹³⁶. Des études chez la souris ont suggéré que les cytokines pouvaient influencer le taux de division des lymphocytes T naïfs et mémoires. Ce taux de division est beaucoup plus rapide chez les Tm comparativement aux Tn⁸⁸. Nous savons que le renouvellement continu des Tm CD8⁺ requiert l'IL-15 et est inhibé par l'IL-2¹³⁷. De plus, des études faites chez des souris déficientes pour l'IL-15R α ou l'IL-15 ont montré que l'IL-15 est requise pour la survie à long terme des Tm CD8⁺^{87,138,139}. Le rôle des cytokines dans l'homéostasie des Tm CD4⁺ était plus nébuleux jusqu'à ce que l'on démontre que l'IL-7 est nécessaire pour la survie de ces cellules^{140,141}. Toutefois, l'IL-7 est aussi requise pour la survie des Tn, autant CD4⁺ que CD8⁺^{110,111,113,142}. Cette observation soulève la possibilité qu'un autre facteur de survie, exclusif aux Tm CD4⁺, existe. Dans un même ordre d'idées, les travaux de Seddon *et al* en 2002 ont permis de proposer un rôle de la signalisation du RCT, plus précisément des kinases lck et fyn, dans la survie de ces Tm CD4⁺¹⁴¹. Il a aussi été démontré par transfert de cellules Tm CD4⁺ ou CD8⁺ dans des hôtes déficients en molécules du CMH que les interactions des Tm avec le CMH

né sont pas nécessaires à leur survie^{53,83,106}. Toutefois, chez les Tn, ces interactions sont absolument requises^{99-106,143}.

De plus, suite à un article de Fukuda *et al* paru en 1997 et démontrant l'importance du facteur de transcription Bcl-6 dans la formation des centres germinaux et des lymphocytes B mémoires¹⁴⁴, Ichii *et al* se sont questionnés sur le rôle de ce facteur dans le développement des Tm. Les auteurs ont observé chez des souris déficientes en Bcl-6 qu'autant la génération que la survie des Tm CD8⁺ spécifiques pour le peptide de l'ovalbumine SIINFEKL étaient compromises¹⁴⁵.

Enfin, un récent article de Sun *et al* montre que le transfert de Tc CD8⁺ (8 jours post-immunisation) dans des souris dépourvues de cellules T CD4⁺ provoque non seulement une diminution de la fonctionnalité des Tm CD8⁺ ainsi générées mais aussi une diminution de leur survie¹⁴⁶. Cette expérience amène donc un nouveau concept proposant un rôle de l'aide CD4⁺ à la fin de la réponse immunitaire, c'est-à-dire dans le maintien d'une population stable de Tm.

Jusqu'à présent, nos connaissances des facteurs régulant l'homéostasie des Tm sont encore prématurées. Étant donné le rôle majeur de ces cellules dans la protection à long terme de l'organisme contre les agents infectieux, nos études se sont portées sur leur développement et leur survie.

1.6 PROBLEMATIQUE

Deux aspects de la mémoire des lymphocytes T ont été analysés dans cette étude :

- 1) Nous avons tenté de *déterminer comment certains lymphocytes T effecteurs arrivent à survivre lors de la phase de contraction de la réponse immunitaire* quand la majorité, soit 90-99% d'entre eux, succombent au même moment à l'apoptose.
- 2) Nous avons *examiné le rôle de possibles signaux constitutifs émis par le RCT dans le maintien à long terme des lymphocytes T mémoires.*

1.6.1 Survie des lymphocytes T effecteurs qui se différencient en T mémoires

Comment sont générés les T_m à partir des T_n ? Il s'agit là d'une question dont les réponses sont encore très controversées. De plus en plus d'évidences en faveur du modèle de différenciation linéaire nous permettent de croire que les T_m proviennent directement de la différenciation des T_e^{53,56-59}. Toutefois, le mécanisme déterminant quelles cellules effectrices survivent lors de la phase de contraction pour devenir des cellules T mémoires n'est pas encore complètement élucidé. Il a été établi que l'IL-7 est nécessaire pour le développement des T_m^{52,113} et que l'IL-15 permet la survie des T_m CD8⁺^{52,87,138,147}. De plus, l'IL-2 peut induire l'apoptose des lymphocytes T activés et pourrait donc provoquer la mort des T_e lors de la phase de contraction¹²¹. Les cytokines joueraient donc un rôle majeur dans les processus menant à la mémoire immunologique et à son maintien.

Il est possible que l'efficacité du développement des T_m soit dépendante de la quantité de signaux transmis par le RCT suite à sa stimulation par un Ag. Les lymphocytes T se différenciant en T_m seraient donc ceux qui auraient reçu un niveau de signal plus élevé lors de la reconnaissance antigénique. Sachant que l'homéostasie des populations de lymphocytes T peut être régulée par différentes cytokines aussi impliquées dans la génération de la mémoire immunologique et son maintien, nous supposons que le niveau d'engagement du RCT des cellules T lors d'une activation de celles-ci est en lien direct avec l'expression des récepteurs de ces cytokines. Une activation plus intense de certains RCT serait donc reliée à une

expression plus forte des récepteurs de l'IL-15 et de l'IL-7 et à une réduction de l'expression du récepteur de l'IL-2. Dans ce cas, une corrélation pourrait être établie entre le phénotype des Te et la production des cellules Tm.

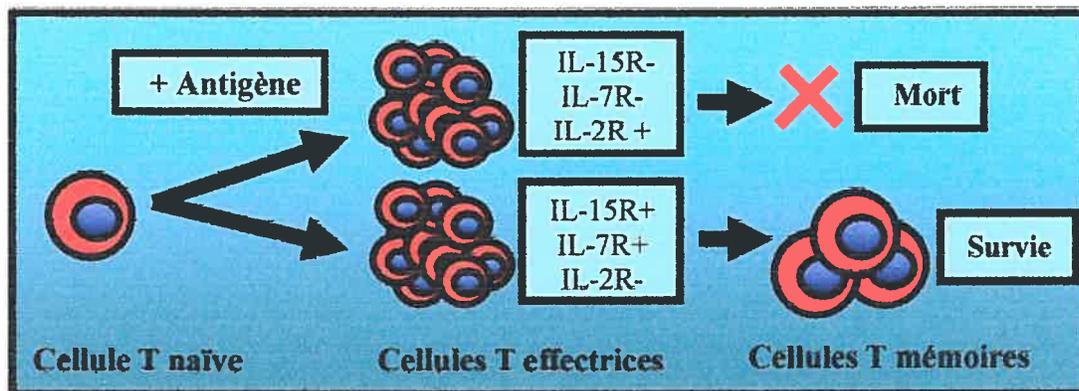


Figure 6. Rôle des cytokines dans le développement des lymphocytes T mémoires. Les cytokines régulent la prolifération, la différenciation et la survie des lymphocytes T (fig. 5). L'IL-7 est nécessaire au développement des Te en Tm, l'IL-2 provoque la mort des Te par apoptose et l'IL-15 est impliquée dans la survie à long terme des Tm CD8⁺. Les Te précurseurs des Tm pourraient avoir modifié l'expression des récepteurs de certaines cytokines afin d'optimiser la réception de signaux de survie lors de la phase de contraction, comme augmenter l'expression des IL-7R et IL-15R et diminué l'expression du IL-2R.

Nous avons voulu vérifier si le niveau d'expression du IL-7R était différent chez les Te précurseurs des Tm comparativement aux Te qui entrent en apoptose lors de la phase de contraction de la réponse immunitaire. Précédemment, nous avons démontré que suite à une immunisation avec un peptide antigénique émulsifié en adjuvant complet de Freund, les précurseurs de Tm CD8⁺ maintenaient un niveau d'IL-7R semblable aux lymphocytes T CD8⁺ totaux de la souris ainsi qu'aux Te CD8⁺ entrant en apoptose durant la phase de contraction. Nous avons voulu valider nos résultats à l'aide d'un second modèle d'immunisation, soit l'injection de cellules dendritiques matures chargées avec ce même peptide antigénique.

1.6.2 Rôle du RCT dans la survie des lymphocytes T mémoires

Le fait que les cellules T_m n'aient pas besoin d'interactions de leur RCT avec les complexes CMH-peptide présentés dans l'organisme pour survivre n'exclut pas la possibilité d'un rôle de signalisation basale du RCT dans ce maintien à long terme. Nous croyons que des signaux intrinsèques émis par le RCT des T_m, et ce indépendamment d'interactions avec le CMH, sont à l'origine de la survie de ceux-ci. Dans un même ordre d'idées, nous savons que la survie des lymphocytes B est totalement dépendante de l'expression du récepteur des cellules B (RCB), et ce même en absence de ligand spécifique¹⁴⁸. De plus, la simple mutation des motifs ITAMS de la queue cytoplasmique d'Igα qui transmet les signaux dans les cellules B provoque la disparition de ces cellules, ce qui suggère que le RCB délivre constamment des signaux de survie aux cellules B¹⁴⁹. Il a aussi été démontré que la ségrégation des pré-RCT et pré-RCB dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique des cellules pré-T et pré-B sont à l'origine de signaux de survie pour ces cellules. Cette relocalisation des récepteurs au niveau des domaines enrichis en lipides et en molécules de signalisation serait suffisante pour initier une signalisation basale des pré-RCT et pré-RCB¹⁵⁰⁻¹⁵².

La réponse des T_m contre les pathogènes est plus rapide et plus sensible que celle des T naïfs qui n'ont jamais rencontré leur Ag spécifique. En effet, lorsqu'on stimule des T_n et T_m spécifiques à un même Ag avec une dose égale de peptide antigénique, le temps requis pour éliminer le pathogène est beaucoup diminué chez ces derniers⁷⁶. Ainsi, les T_m sont capables de répondre de façon agressive à de faibles doses d'Ag, ce qui permet un meilleur contrôle de l'infection. Cette augmentation de l'avidité des T_m pour leur Ag est probablement le résultat d'une réorganisation de la machinerie de signalisation intracellulaire du RCT ayant été décrite à la section 1.3.3. Il a d'ailleurs été démontré que la tyrosine kinase Ick qui est impliquée dans l'activation précoce des lymphocytes T est relocalisée à proximité du RCT des cellules T_m¹⁵³. De plus, nous savons maintenant que lors d'une re-stimulation des T_m CD8⁺ avec leur Ag spécifique, on observe une phosphorylation plus efficace de l'adaptateur LAT impliqué dans la transmission des signaux délivrés via le RCT ainsi qu'une hyperphosphorylation des MAP kinases ERK, JNK et p38¹⁵⁴. Enfin, il a

récemment été montré que la tyrosine phosphatase CD45 impliquée dans la transduction des signaux chez les lymphocytes T est relocalisée à proximité du RCT dans les Tm CD4⁺ comparativement aux Tn¹⁵⁵. Cette co-localisation induirait la déphosphorylation de la tyrosine carboxy-terminale inhibitrice de lck, permettant ainsi une activité accrue de la src kinase. Toutes ces restructurations du complexe de signalisation des Tm pourraient non seulement contribuer à leur meilleur fonctionnement lors d'une rencontre antigénique mais aussi à leur maintien à long terme dans l'organisme, et ce en permettant la transmission de signaux basaux initiés par le RCT à l'intérieur de ces cellules (fig. 7). Nous souhaitons donc déterminer si l'expression du RCT est nécessaire à la survie des Tm et étudier les mécanismes à l'origine de la génération de signaux intrinsèques de survie chez ces cellules.

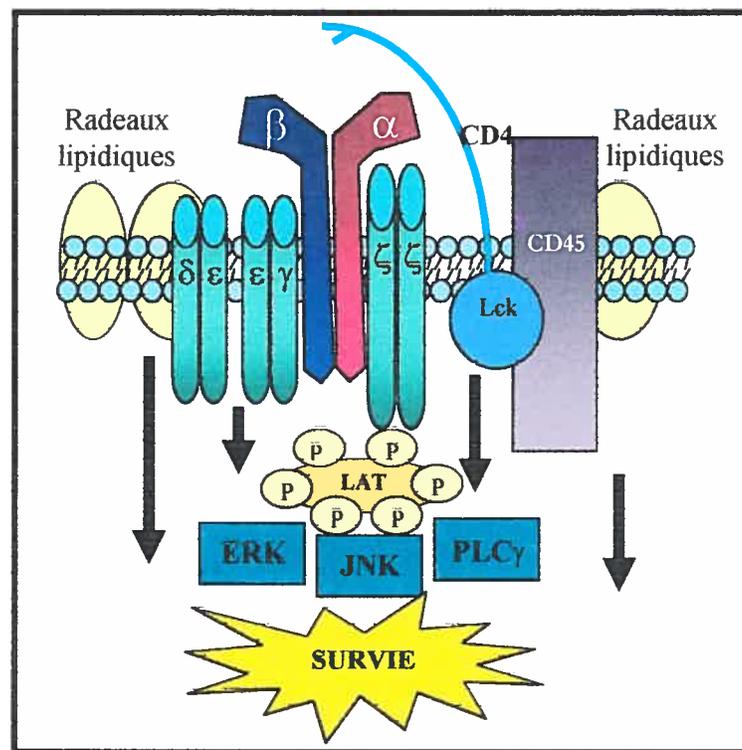


Figure 7. Modèle de signalisation constitutive chez les lymphocytes T mémoires. La machinerie de signalisation des Tm est réorganisée pour permettre une réponse secondaire plus efficace. La kinase lck et la phosphatase CD45 sont re-localisées à proximité du RCT. Il est possible que ces restructurations du complexe de signalisation soient responsables de l'émission de signaux intrinsèques chez les Tm. Ces signaux pourraient permettre la survie de ceux-ci. Il est aussi possible que le RCT des Tm soit re-localisé au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique, assurant une transmission efficace de ces signaux de survie.

2. METHODES

2.2 ÉTUDE DES LYMPHOCYTES T MEMOIRES CD8⁺

2.2.1 Souris 2C

Les souris 2C utilisées dans nos expériences sur le développement de la mémoire immunologique sont sur un fond C57BL/6. Les lymphocytes T CD8⁺ des souris 2C expriment tous un RCT transgénique spécifique pour un peptide synthétique, SYRGL (SIYRYYGL), restreint au CMH-I K^b.

2.2.2 Souris Vβ5LTAO : RCT OT-1 inductible à la tétracycline

Pour l'étude des T_m, il a d'abord fallu développer un protocole d'immunisation de souris menant à la génération d'une population de cellules mémoires. Les souris Vβ5LTAOα^{-/-} utilisées possèdent un RCT OT-1 transgénique spécifique pour le peptide de l'ovalbumine SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) restreint au CMH-I K^b et qui permet donc la génération d'une réponse des lymphocytes T CD8⁺ ¹⁰⁸. La particularité de ce modèle de souris réside dans la possibilité de réguler l'expression de leur RCT par l'administration de tétracycline (TET). Ces souris intègrent 3 transgènes différents (fig. 8). Dans le premier transgène (LTH), le promoteur *lck* actif dans les lymphocytes T dirige l'expression d'un transactivateur (tTA). Ce transactivateur peut alors se lier aux motifs Tet-O du second transgène (TAO), qui code pour la chaîne α du RCT spécifique pour l'OVA₂₅₇₋₂₆₄, et promouvoir son expression. Lorsque ces deux transgènes sont présents dans le génome d'une souris, il y a expression de la chaîne α OT-1 qui est une chaîne Vα2. Le troisième transgène de la souris Vβ5LTAO est une chaîne Vβ5 réarrangée et exprimée de façon constitutive grâce au promoteur de la chaîne β du RCT. Étant donné que contrairement aux chaînes β, les réarrangements des chaînes α du RCT ne sont pas suivis d'un processus d'exclusion allélique, il est possible que certaines chaînes α endogènes soient aussi exprimées. Pour éviter ce problème, les souris Vβ5LTAO sont croisées sur un fond Cα^{-/-} (Vβ5LTAOα^{-/-}). Ces souris sont déficientes pour la région constante de la chaîne α du RCT, ce qui empêche l'expression du RCT chez

celles-ci dès leur développement thymique¹⁵⁶. Par conséquent, les souris $C\alpha^{-/-}$ ne possèdent aucun lymphocyte T mature en périphérie.

Les souris $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$, en plus d'exprimer un RCT transgénique dont on connaît la spécificité antigénique, présentent une seconde caractéristique utile à nos études. Le niveau d'expression de leur RCT peut être contrôlé *in vivo* de façon quantitative par l'administration de TET aux souris. La TET exerce son rôle en empêchant le transactivateur de se lier au second transgène, ce qui provoque l'arrêt d'expression de la chaîne $V\alpha 2$ du RCT. La TET est administrée de façon continue par voie orale, dans l'eau que boit la souris. Une concentration de $400\mu\text{g/ml}$ de TET permet un arrêt complet de l'expression du RCT.

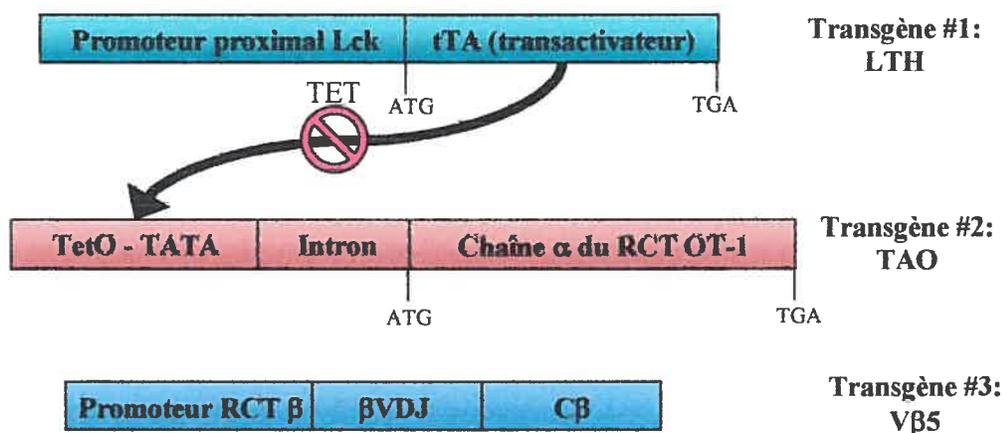


Figure 8. Modèle de souris $V\beta 5LTAO$. L'expression du 1^{er} transgène qui code pour le transactivateur tTA est dirigée par le promoteur proximal lck. Le 2^{ème} transgène code pour la chaîne α du RCT OT-1 (restreint à K^b et spécifique à l'OVA₂₅₇₋₂₆₄). Son expression n'est possible que lorsque le tTA se lie aux séquences TetO qui précède la séquence du RCT α OT-1. L'administration de TET empêche la liaison du tTA aux séquences TetO, abolissant l'expression du RCT. Le 3^{ème} transgène code pour la chaîne β réarrangée du RCT OT-1 et son expression est constitutive et dirigée par le promoteur β .

2.2.3 Immunisation et génération de lymphocytes T mémoires

Pour générer des $T_m CD8^+$, nous procédons d'abord au transfert adoptif de cellules T $CD8^+$ provenant d'une souris $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$ (CD45.2) ou 2C (1B2⁺)

dans une souris B6.SJL (CD45.1). Le transfert adoptif de 10^6 cellules spécifiques à un Ag donné dans une souris hôte, suivi de l'immunisation de ces souris avec l'Ag en question, permet de produire assez de cellules mémoires pour que celles-ci puissent être identifiées à l'aide d'Ac monoclonaux. De plus, la réponse immunitaire générée à l'aide de cette méthode est plus représentative de la réalité que si, par exemple, on immunisait directement les souris $V\beta 5LTAOC\alpha^{-/-}$ avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. En effet, dans ce cas, la totalité des lymphocytes T deviendraient activés, ce qui provoquerait une inflammation massive chez la souris. Nous savons que ce genre de réponse empêche la formation de Tm¹⁵⁷.

Deux jours suivant le transfert adoptif, les souris sont immunisées avec des cellules dendritiques produites *in vitro* à partir de moelle osseuse cultivée en présence de GM-CSF et d'IL-4^{158,159}. La maturation de ces cellules dendritiques est induite à l'aide de lipopolysaccharide (LPS) et au 7^{ème} jour de culture, les cellules sont chargées avec un peptide antigénique, soit l'OVA₂₅₇₋₂₆₄ ou le peptide SYRGL. Une fois récoltées, 5×10^5 cellules dendritiques sont injectées aux souris transférées. Puisque l'aide CD4⁺ est essentielle à la génération de Tm CD8⁺ fonctionnels et pouvant survivre à long terme (voir section 1.3.5.1), nous l'avons introduite dans notre modèle. Pour ce faire, nous avons choisi d'immuniser des souris femelles avec des cellules dendritiques mâles, ce qui provoque l'activation de cellules T CD4⁺ contre l'Ag mâle et parallèlement, l'activation de cellules T CD8⁺ contre notre peptide antigénique OVA₂₅₇₋₂₆₄ ou SYRGL. Les Tm CD8⁺ spécifiques au peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ produits dans ce modèle peuvent être repérés à l'aide du marqueur allotypique CD45.2. Les Tm CD8⁺ spécifiques au peptide SYRGL peuvent être identifiés à l'aide d'un Ac dirigé contre le RCT des cellules 2C, soit un anti-1B2. Dans les deux cas, les cellules T mémoires CD8⁺ générées possèdent toutes les caractéristiques de bonnes cellules T mémoires (voir figure 3, article #1 et figure 1, article #2).

2.2 ÉTUDE DES LYMPHOCYTES T MEMOIRES CD4⁺

2.3.1 Souris LTAO

Les souris LTAO possèdent les deux premiers transgènes présentés ci-haut (LTH et TAO). Cela implique que les lymphocytes T de ces souris expriment un RCT composé de la chaîne V α 2 couplée à n'importe quelle chaîne V β provenant des réarrangements endogènes de celles-ci. Les souris LTAO possèdent donc un répertoire de lymphocytes T polyclonal, capable de répondre à une multitude d'Ag différents. Les souris LTAO utilisées dans nos expériences sont croisées sur un fond C α ^{-/-} (LTAOC α ^{-/-}), donc toutes leurs cellules T sans exception expriment la chaîne V α 2. L'expression de la chaîne V α 2 provoque chez ces souris une différenciation préférentielle des lymphocytes T vers la lignée CD4⁺ ¹⁶⁰. Cela en fait donc un très bon modèle pour l'étude des Tm CD4⁺.

2.3.2 Lymphocytes T mémoires CD4⁺

Puisque les souris LTAOC α ^{-/-} sont capables de répondre à une multitude d'Ag différents, nous avons pris en considération que ces souris avaient rencontré des Ag de l'environnement au cours de leur vie et avaient donc produit des Tm CD4⁺ contre ces Ag. Les cellules mémoires sont identifiées à l'aide des marqueurs suivants : CD4⁺, CD45RB^{lo}, CD62L^{lo} et CD44^{hi} ⁸¹.

3. ARTICLES

AVANT-PROPOS

Deux articles sont présentés dans ce mémoire. Dr Nathalie Labrecque a élaboré les problématiques de recherche et collaboré grandement à la planification des manipulations de ces deux articles. Julie Rooney a fourni une aide technique importante lors de la réalisation des expériences présentées dans ces deux articles.

Le but de ces articles est de mieux comprendre la survie des lymphocytes T au cours des différentes phases de la réponse immunitaire, plus particulièrement la sélection de certains lymphocytes T effecteurs durant la phase de contraction ainsi que la différenciation et le maintien de ceux-ci en tant que lymphocytes T mémoires.

Le premier article constitue une réponse à la première question de la problématique et traite du développement des lymphocytes T mémoires à partir des lymphocytes T effecteurs. La majorité des travaux publiés dans cet article sont le fruit des travaux de maîtrise de Marie-Hélène Lacombe qui a terminé sa maîtrise en septembre 2003 dans le laboratoire de Dr Nathalie Labrecque. La contribution de Marie-Pierre Hardy a d'abord été de mettre au point le modèle de transfert adoptif et d'immunisation avec les cellules dendritiques chargées d'un peptide antigénique (figures 3 et 4). Elle a aussi étudié l'expression du récepteur de l'IL-7 sur les cellules T effectrices lors de la phase de contraction à l'aide du modèle d'immunisation avec les cellules dendritiques chez les souris 2C et V β 5LTAO et évalué la fonctionnalité des lymphocytes T mémoires produits dans ces expériences (figures 3 et 4).

Le second article porte sur un autre aspect de la réponse immunitaire, soit la survie des lymphocytes T mémoires et particulièrement du rôle du récepteur des cellules T dans ce processus. Dans cet article, Marie-Pierre Hardy a réalisé toutes les expériences présentées.

**Interleukin-7 receptor expression levels do not identify
CD8⁺ memory T lymphocyte precursors¹**

**Marie-Hélène Lacombe*, Marie-Pierre Hardy*, Julie Rooney* and Nathalie
Labrecque*²**

*Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Department
of Medicine, University of Montreal.

Running title: Cytokine receptor expression by effector T cells during the
contraction phase

Keywords: T lymphocytes, cytokine receptors, memory T cell development

Corresponding author: Nathalie Labrecque

Phone: 1-514-252-3552

Fax: 1-514-252-3569

[REDACTED]

Abstract

Identification of the mechanisms underlying the survival of effector T cells and their differentiation into memory T lymphocytes is critically important to understand memory development. Since cytokines regulate proliferation, differentiation and survival of T lymphocytes, we hypothesized that cytokine signalling dictates the fate of effector T cells. To follow cytokine receptor expression during the T cell response, we transferred murine TCR transgenic T cells into naive recipients followed by immunization with peptide emulsified in adjuvant or pulsed on dendritic cells. Our findings did not correlate IL-7 receptor α and IL-2 receptor β chains expression on effector CD8⁺ cells with the generation of memory T lymphocytes. However, we correlated the extent of IL-7R α expression down-regulation on effector T cells with the level of inflammation generated by the immunization. Furthermore, our findings showed that the maintenance of a high level of IL-7 receptor expression by effector T cells at the peak of the response does not prevent their death. This suggests that maintenance of IL-7 receptor expression is not sufficient to prevent T cell contraction. Thus, our results indicate that expression of the IL-7 receptor is not always a good marker for identifying precursors of memory T cells amongst effectors and that selective expression of the IL-7 receptor by effector T cells should not be used to predict the success of vaccination.

Introduction

Following Ag encounter, T lymphocytes undergo massive clonal proliferation and differentiation into effector cells. After elimination of the pathogen, most effector T cells die by apoptosis. A few differentiate into memory T cells that are responsible for long term protection of the organism against re-infection. According to the dominant paradigm, memory T lymphocytes directly derive from effector T cells that survived the contraction phase (1-5). However, we still do not understand how effector T cell fate is determined during the contraction phase of the immune response.

Identification of the mechanism determining which effector T cells survive and become memory T lymphocytes is critically important to understand memory T cell development. Since cytokines regulate the proliferation, differentiation and survival of T lymphocytes, we hypothesized that cytokine signaling dictates the fate of effector T cells. We postulated that memory T cells emerge from effector T cells that have modified the expression of cytokine receptors involved in the apoptosis of CD8⁺ effector T cells (IL-2 receptor, IL-2R^β) or in the generation (IL-7R) and survival (IL-15R) of CD8⁺ memory T cells (6-15). To follow cytokine receptor expression during T cell response to Ag, we adoptively transferred TCR transgenic T cells into naive hosts and immunized recipients with the antigenic peptide emulsified in adjuvant or pulsed on dendritic cells (DCs). In these models, we were unable to correlate the expression of IL-7R with the generation of long-lived functional memory T cells. Moreover, the levels of expression of IL-7R α were similar on live and apoptotic effector T cells after immunization with antigen emulsified in adjuvant. Furthermore, IL-7R α expression was maintained at a high level on effector T cells at the peak of the response following immunization with peptide pulsed DCs and without influencing the extent of T cell contraction. Recently, Kaech and collaborators suggested that increased expression of the IL-7R identifies the effector CD8⁺ T cells that differentiate into memory T cells (16). In line with this, Badonovic and collaborators (17) have observed that the absence of T cell contraction correlated with the maintenance of IL-7R α expression by effector T cells at the peak of the immune response. In contrast, our results indicate that IL-7R expression cannot

reliably identify precursors of memory T cells amongst effectors. Therefore, the selective expression of IL-7R α by effector T lymphocytes cannot be used to predict the extent of T cell contraction and the success of vaccination.

Material and Methods

Mice

C57BL/6, 2C mice and B6.SJL mice were bred at the Guy-Bernier Research Center. Mice expressing a tetracycline inducible TCR specific for the OVA peptide SIINFEKL in the context of K^b (18) were bred to C α deficient mice (V β 5LTAOC α ^{-/-}).

Antibodies and peptides

Supernatants of hybridomas were used: H129 (anti-CD4), M5/114 (anti-MHC class II), RA3-6B2 (anti-B220) and 1B2 (anti-2C TCR). The following Abs were used: anti-CD8 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), anti-CD44 (Caltag), anti-Ly6C (BD Biosciences, Mississauga, ON), anti-CD122 (anti-IL-2R β , BD Biosciences), anti-CD127 (anti-IL-7R α , A7R34, eBioscience, San Diego, CA), anti-IFN- γ (Caltag), rat anti-mouse IgG₁ (BD Biosciences), goat F(ab')₂ anti-rat IgG (H+L) (Caltag), anti-CD45.2 (BD Biosciences). Streptavidin-PE or -PerCP (BD Biosciences) was used to detect biotinylated Abs. The OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) and the SYRGL (SIYRYYGL) peptides were synthesized at the peptide core facility, Laval University (Quebec, QC, Canada).

Adoptive transfer and immunization

Lymph node cells from 2C mice were stained with anti-CD4, anti-class II and anti-B220 Abs. Stained cells were depleted by cell sorting to obtain purified 2C CD8⁺ T cells. 5 x 10⁵ 2C T cells were injected i.v. in C57BL/6 mice. Recipients were immunized 3 days later either by s.c. injection of 75 μ g SYRGL peptide (SIYRYYGL) emulsified in CFA (Sigma-Aldrich) at the base of the tail or by i.v. injection of 5 x 10⁵ mature DCs pulsed with 2 μ g/ml of SYRGL peptide. 10⁶ lymph node CD8⁺ T cells from female V β 5LTAOC α ^{-/-} (CD45.2⁺) mice were injected i.v. in female B6.SJL (CD45.1⁺) hosts. Two days later, mice were immunized i.v. with 5 x 10⁵ male B6.SJL mature DCs loaded with 2 μ g/ml of OVA peptide (OVA₂₅₇₋₂₆₄).

Preparation of peptide-pulsed DCs

Bone marrow cells (2×10^5 cells per ml) were plated onto 6-well plates in complete RPMI (supplemented with 10% FCS, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non essential amino acids, 10 mM Hepes, 10 μ M β -mercaptoethanol and penicillin-streptomycin). GM-CSF (500 U/ml) and IL-4 (250 U/ml) were added on days 0, 2, 3 and 6 of culture. To induce maturation of DCs, 1 μ g/ml of LPS was added on day 6. On day 7, cells were pulsed for 4 h with 2 μ g/ml of OVA₂₅₇₋₂₆₄ or SYRGL peptide. Cultures were underlaid on 14.7% nycodenz (Sigma) and centrifuged at 1200 x g for 20 min. DCs were collected from the interface and washed three times in PBS before injection (19).

AnnexinV staining

Cells were incubated with 5 μ l AnnexinV (AnV, Biosource, Camarillo, CA) and 5 μ g/ml propidium iodide (PI) in 50 μ l AnnexinV binding buffer (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) for 15 min at room temperature.

Intracellular IFN- γ staining

Splenocytes were stimulated with 1 μ g/ml of peptide in complete RPMI for 6 h at 37°C. For the last 2 h, 10 μ g of brefeldin A (Sigma-Aldrich) per ml of cells was added. Cells were fixed in 2% formaldehyde in PBS 1.2 X for 20 min at room temperature. 10^6 cells were stained with anti-IFN- γ Abs diluted in 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature. Cells were washed twice without saponin before cell surface staining.

Results

Memory T cell development from effector 2C T cells

To study memory T cell development, we transferred 2C TCR transgenic CD8⁺ T cells into C57BL/6 mice. Three days later, we immunized with the specific antigenic peptide SYRGL (20, 21) emulsified in CFA. Five days after immunization, 2C T cells (CD8⁺1B2⁺) represented 1–2% of lymph node cells in immunized recipients while no 2C cells were detected in control mice (Fig. 1A). The kinetics of the immune response was established to determine the onset of the contraction phase in our model. The peak of the response occurred at day 5 post-immunization followed by the contraction phase of the response up to day 10 (Fig. 1B). Finally, one month after immunization, 2C cells were CD44^{high} Ly6C^{high}, as expected for genuine CD8⁺ memory T cells (Fig. 1C). Moreover, these cells produced IFN- γ *ex vivo* when stimulated for 6 h with Ag (Fig. 1C). These 2C cells were long-lived functional memory T cells since they were still detectable three months after immunization and were able to rapidly produce IFN- γ (not shown). Altogether, our model leads to the generation of a population of functional CD8⁺ memory T cells that allows us to monitor the expression of cytokine receptors on effector cells during an immune response.

Expression of cytokine receptors on T cells during an immune response

It is well established that IL-7 is required for the generation of CD8⁺ memory T cells (8), that IL-15 promotes the survival of CD8⁺ memory T lymphocytes (9–13, 15) and that IL-2 signals can induce cell death (6, 7). Thus, we postulated that those effector T cells that survive the contraction phase and become memory T cells are the ones that have altered the expression profile of IL-2R, IL-7R and IL-15R in order to receive optimal differentiation and survival signals. To verify this hypothesis, the surface expression of IL-7R α and IL-2R β (component of the IL-2R and IL-15R) on 2C cells was assessed during T cell response to Ag. Fig. 2A shows the expression of these receptors on 2C cells (CD8⁺1B2⁺) from inguinal lymph nodes relative to recipient CD8⁺ T cells (CD8⁺1B2⁻) that do not respond to Ag. The expression of IL-2R β increased at day 5 post-immunization on 2C cells relative to recipient CD8⁺ T cells (Fig. 2A). This up-regulation persisted during

the contraction phase of the immune response albeit to lower levels than on day 5. In contrast, IL-7R α expression decreased on 2C cells following immunization. Between days 7–20, the expression of the latter was down-regulated on most of the 2C cells while a small proportion of TCR transgenic T cells maintained levels of expression comparable to naive CD8⁺ T cells. Importantly, all 2C T cells present at the peak of the response and during the contraction phase have seen their Ag since they all have up-regulated the expression level of IL-2R β (Fig. 2A) and CD44 (data not shown). Thus, this rules out the possibility that some of the cells expressing high levels of IL-7R α represent cells that were not activated following immunization. Moreover, the lower levels of IL-7R α expression on most of the activated 2C cells cannot be attributed to reduced levels of expression of this receptor on naive 2C T cells, because the latter expressed similar levels of IL-7R α as polyclonal CD8⁺ T cells from C57BL/6 mice (not shown). To take into account the variations in staining intensities on recipient cells from one day to another, we normalized the results obtained in Fig. 2A by dividing the mean fluorescence intensity (MFI) of receptor expression on 2C cells by the MFI on recipient CD8⁺ T cells. A ratio superior to one demonstrates increased expression of the receptor on 2C cells while a ratio lower than one represents down regulation of the receptor. As shown in Fig. 2B, the IL-7R α ratios are always less than one. This means that the expression of this receptor is reduced after immunization. The down regulation becomes more important over time and stabilizes around day 15. These results show a modulation of IL-7R α expression during the immune response but unlike previous reports (16, 22), we did not observe increased IL-7R α expression on effector cells during the contraction phase of the T cell response.

Although these data show no correlation between IL-7R α expression on effector T cells during the contraction phase and memory T cell generation, they do not rule out the possibility that IL-7R α down-regulation through the contraction phase results from sustained antigenic stimulation of effector cells due to persistence of Ag when mice are immunized with CFA emulsion. Thus, we have evaluated IL-7R α expression on effector 2C T cells during the contraction phase in a model where Ag does not persist. To do so, we adoptively transferred

purified 2C CD8⁺ T cells into female C57BL/6 mice as previously described with the exception that instead of immunizing with peptide emulsified in CFA, we used peptide-pulsed mature bone marrow derived DCs. Two days after adoptive transfer, mice were immunized by i.v. injection of 5×10^5 male DCs pulsed with 2 $\mu\text{g/ml}$ of the SYRGL peptide. We chose to immunize female mice with male DCs in order to provide CD4 help, which is necessary for proper development of functional and long-lived memory CD8⁺ T cells (23-26). Importantly, 2C T cells are not cross-reactive to the male antigen as shown by their lack of expansion after immunization with male DCs that were not pulsed with SYRGL peptide (Fig. 3A, right panels). However, immunization with peptide-pulsed mature DCs leads to the expansion of 2C T cells (CD8⁺1B2⁺) and to the development of long-lived memory T cells (Ly6C^{high}) as shown in Fig. 3A. Moreover, these memory T cells are functional since they rapidly, within 6 h, produced IFN- γ *ex vivo* following peptide stimulation (Fig.3A). Since this model leads to the generation of a population of functional CD8⁺ memory T cells, we further monitored the expression of the IL-7R α on effector cells during the contraction phase of the immune response. As shown in Fig.3B, IL-7R α expression was maintained at high level on effector 2C T cells at the peak (day 5) of the antigenic response and during all the contraction phase (from day 5 to 14). To correct for variation in IL-7R α staining intensity that occurs from one day to another, we always compared IL-7R α expression on 2C effector T cells (CD8⁺1B2⁺) with the recipient naive CD8⁺ T cells (CD8⁺1B2⁻) from the same mouse. Importantly, the expression of IL-7R α on recipient cells was unaffected by the immunization (data not shown). Although IL-7R α expression was maintained at high level on effector 2C T cells, it was interesting that we still observed a normal contraction of the T cell response (Fig. 3C), suggesting that IL-7 signals alone are not sufficient for the survival of effector T cells. This does not exclude the possibility that IL-7R α expression is necessary for CD8⁺ effector T cell survival during the contraction phase. Thus, the maintenance of high levels of IL-7R α at the surface of effector T cells does not, in our models, allow for the identification of memory T cell precursor within the CD8⁺ effector pool and does not prevent contraction of the T cell response.

Since we did not observe any enrichment for cells selectively expressing the IL-7R during the contraction phase, we have further investigated cytokine receptor expression levels in another model. We transferred V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ T cells (18), specific for the OVA peptide 257-264 in the context of K^b, into B6.SJL female recipients followed by immunization with peptide-pulsed male DCs. Again, we immunized female mice with male DCs in order to provide CD4 help. As shown in Fig. 4A, immunization with peptide-pulsed mature DCs leads to the expansion of V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ T cells (CD45.2⁺) and to the development of long-lived memory T cells (Ly6C^{high}). Moreover, our protocol leads to the generation of functional memory T cells since they make efficient recall response (data not shown). The expression of IL-7R α by V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ effector T cells was subsequently determined at the peak of the response (day 5) and during the contraction phase (days 7, 10 and 14). We did not observe a selective expression of the IL-7R by a sub-population of effector cells (Fig. 4B), thus confirming our observations in the 2C model. Interestingly, like in the 2C model, IL-7R α expression was maintained at high level in V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ effectors without affecting the contraction of the T cell response (Fig.4C). Moreover, V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ effector T cells also behave similarly to 2C cells in relation to IL-2R β expression levels during the contraction phase (not shown).

IL-7R α expression on apoptotic versus live effector T cells

To determine if the expression of IL-7R α dictates the fate of effector cells, we evaluated receptor expression levels between dying (apoptotic) effector T cells and those surviving to become memory T cells. Fig. 5 shows normalized levels of expression of IL-7R α on apoptotic (AnV⁺PI⁻) and non apoptotic (AnV⁺PI⁺) effectors. Apoptotic 2C cells express higher levels of the receptor when compared to non apoptotic cells (Fig. 5). This is not due to an increase in background staining on apoptotic cells since there was no differences in staining for other cell surface markers (CD8, TCR) on apoptotic and non apoptotic cells (data not shown). Similarly, IL-2R β expression level was also higher on apoptotic effector T cells (not shown). These results show that 2C effector T cells that survive the contraction phase and become memory cells express lower or similar levels of the IL-2R β and IL-7R α than effector cells that die at the termination of the response.

Unexpectedly, these findings demonstrate a lack of correlation between high IL-7R α expression and effector T cell survival and thus memory T cell development.

Discussion

In this report we demonstrate that 5 days after immunization IL-2R β is strongly up-regulated, preceding the contraction phase following an antigenic response. This correlates with the role of IL-2 in apoptosis of effector T cells (6, 7). Effector T cells that are destined to die during the contraction phase may require high levels of IL-2R β at the peak of the response to provide optimal death signals, mediated by IL-2. However, IL-2R β expression remains high during the course of the contraction phase relative to naive cells. This can be explained by the fact that the IL-2R β constitutes part of the IL-15R, since IL-15 is necessary for memory CD8⁺ T cell survival (9-15). Therefore, IL-2R β expression levels may be elevated on effector T cells to allow them to survive the contraction phase and differentiate into memory cells. Thus, the generated memory T cells will be able to receive the IL-15 survival signal. Unfortunately, this marker cannot be used to identify effector CD8⁺ T cells differentiating into memory cells since IL-2R β is already expressed on all effector cells at the peak of the response and maintained uniformly during the contraction phase.

IL-7R α is constitutively expressed on naive T cells but is down-regulated following T cell stimulation (8, 16, 22, 27). It is believed that this occurs due to the production of IL-2 by activated T cells that then leads to the down regulation of IL-7R α expression (27). Effector T cells have decreased levels of IL-7R at their surface, as demonstrated *in vivo* (8). IL-7 signaling is known to be required for proper development of memory T cells from effectors (8). We hypothesized that effector T cells expressing higher level of IL-7R, either by maintaining or by regaining its expression, would constitute a small population endowed with the ability to survive the contraction phase to become memory T lymphocytes. To support this, we would expect to see an enrichment of cells expressing high levels of IL-7R α during the contraction phase. However, using two different TCR transgenic models, we saw no enrichment of IL-7R α expression on effector CD8⁺ cells during the contraction phase. This is in striking contrast to the report of Kaech and collaborators (16) who have observed a selective enrichment of CD8⁺ T cells expressing IL-7R during the contraction phase of the T cell response to

LCMV. One major difference between our models and that used by Kaech *et al* is the level of down regulation of IL-7R. Our findings demonstrate that at the peak of the antigenic response, few of the effector T cells have down-regulated IL-7R α without completely losing its expression (Figs.2A, 3B and 4B), while IL-7R α expression was completely abrogated on LCMV specific CD8⁺ effector cells (16). The degree to which the IL-7R α chain differs in its down regulation in the different models is probably due to the extent of T cell expansion and thus IL-2 production. In the LCMV model used by Kaech *et al*, CD8⁺ T cell expansion is massive: reaching over 20×10^6 Ag-specific CD8⁺ T cells in the spleen (16). However, in our models of transfer of TCR transgenic CD8⁺ T cells followed by immunization with peptide emulsified in CFA or pulsed on DCs, the levels of T cell expansion are much lower (less than 10^6 cells per spleen). We believe that the massive T cell expansion that occurs during LCMV infection leads to the production of very high levels of IL-2 that is then capable of efficiently abrogating IL-7R α expression on LCMV specific effector CD8⁺ T cells at the peak of the response. To further survive and differentiate into memory T cells, these effectors must re-express IL-7R α . Only a small percentage that does so will survive the contraction phase. This explains the selective enrichment of IL-7R α ⁺ CD8⁺ T cells observed by Kaech *et al*. Since IL-7R α is only partially down-regulated by effector CD8⁺ T cells in our models, this precludes the use of IL-7R α expression in identifying memory precursors amongst CD8⁺ effector cells during the contraction phase. Indeed, our findings demonstrate that all effector T cells should be able to receive IL-7 signals to further survive and differentiate into memory cells. This indicates that other factors besides IL-7 participate actively in the fate of effector T lymphocytes or that stochastic mechanisms regulate the differentiation of effector CD8⁺ T cells into memory cells. Notably, our results also show that the maintenance of high levels of IL-7R α expression by effector T cells at the peak of the antigenic response does not prevent the contraction of the T cell response in our models. This is in contrast with the recent observation of Badovinac and collaborators (17) that correlates a lack of T cell contraction with the maintenance of high level IL-7R α expression by effector CD8⁺ T cells. Moreover, they have shown that early inflammation mediated by IFN- γ production regulates the contraction phase, perhaps by influencing IL-7R α

expression by effectors (17). Since we observed efficient T cell contraction even when effector T cells express IL-7R α at high levels, it seems unlikely that inflammation is the sole factor controlling IL-7R α expression at the peak of the T cell response. Moreover, our data suggest that other events independent of IL-7R α expression need to occur to allow effector T cell survival and their further differentiation into memory T cells. The identification of these other signals that either protect effector T cells from death or promote their survival and differentiation will bring valuable information about the mechanism by which effector T cells avoid T cell death and become memory T cells.

Intriguingly, we have observed that during the contraction phase, live effector T cells express lower levels of IL-7R α than apoptotic effector T cells (Fig. 5). This is in sharp contrast with the notion that cells expressing higher levels of IL-7R α will receive more survival signals from IL-7. In light of the recent report of Park and collaborators (28) showing that IL-7 signals down-regulate IL-7R α transcription and cell surface expression, it is tempting to speculate that the reduced expression of IL-7R α by live effector T cells compared to that undergoing apoptosis reflect the fact that the former have received IL-7 survival signals.

Interestingly, our results clearly show that abrogation of IL-7R α expression is not a prerequisite for the induction of cell death of effector CD8⁺ T lymphocytes. The induction of pro-apoptotic molecules in effector T cells, such as the selective increases in caspase-3 expression (29), FasL and TNF receptors (30, 31), is probably sufficient to induce T cell death even in the presence of a survival signal provided by IL-7.

Acknowledgements

We thank the members of the laboratory for discussions, S. Ouellet for cell sorting and L. Sabbagh for critical reading of the manuscript. We thank C. Perreault for reviewing the manuscript and for kindly providing 2C mice and the 1B2 hybridoma. We acknowledge the editorial assistance of Judith Kashul.

References

1. Opferman, J. T., B. T. Ober, and P. G. Ashton-Rickardt. 1999. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* 283:1745.
2. Swain, S. L., H. Hu, and G. Huston. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 286:1381.
3. Kaech, S. M., S. Hemby, E. Kersh, and R. Ahmed. 2002. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111:837.
4. Kaech, S. M., and R. Ahmed. 2001. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2:415.
5. 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. *Nat Immunol* 2:423.
6. 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. *Eur J Immunol* 25:2572.
7. Willerford, D. M., J. Chen, J. A. Ferry, L. Davidson, A. Ma, and F. W. Alt. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3:521.
8. 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. *Nat Immunol* 1:426.
9. Lodolce, J. P., D. L. Boone, S. Chai, R. E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669.
10. 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.
11. 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. *J Exp Med* 191:771.
12. 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* 288:675.
 13. 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. *J Exp Med* 195:1541.
 14. 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. *J Exp Med* 195:1515.
 15. 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.
 16. 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. *Nat Immunol* 4:1191.
 17. Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2004. CD8⁺ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* 5:809.
 18. 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.
 19. Son, Y. I., S. Egawa, T. Tatsumi, R. E. Redlinger, Jr., P. Kalinski, and T. Kanto. 2002. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J Immunol Methods* 262:145.
 20. Udaka, K., K. H. Wiesmuller, S. Kienle, G. Jung, and P. Walden. 1996. Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone. *J Immunol* 157:670.
 21. Cho, B. K., C. Wang, S. Sugawa, H. N. Eisen, and J. Chen. 1999. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2976.
 22. Huster, K. M., V. Busch, M. Schiemann, K. Linkemann, K. M. Kerksiek, H. Wagner, and D. H. Busch. 2004. Selective expression of IL-7 receptor on

- memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8⁺ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5610.
23. 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* 297:2060.
 24. Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath, and S. P. Schoenberger. 2003. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* 421:852.
 25. Sun, J. C., and M. J. Bevan. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300:339.
 26. Shedlock, D. J., and H. Shen. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300:337.
 27. Xue, H. H., P. E. Kovanen, C. A. Pise-Masison, M. Berg, M. F. Radovich, J. N. Brady, and W. J. Leonard. 2002. IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13759.
 28. 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.
 29. Sabbagh, L., S. M. Kaech, M. Bourbonniere, M. Woo, L. Cohen, N. Labrecque, R. Ahmed, and R. Sékaly. 2004. The selective increase in caspase-3 expression in effector but not memory T cells allows susceptibility to apoptosis. *J Immunol in press*.
 30. Smith, C. A., T. Farrah, and R. G. Goodwin. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959.
 31. Nagata, S., and P. Golstein. 1995. The Fas death factor. *Science* 267:1449.

¹ This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

NL is a New Investigator of the CIHR.

²Address correspondence and reprint requests to:

Nathalie Labrecque, Ph.D.

Guy-Bernier Research Centre,

Maisonneuve-Rosemont Hospital,

5415 boul. de l'Assomption,

Montreal, QC, Canada HIT 2M4

Phone: 1-514-252-3552

Fax: 1-514-252-3569

E-mail address: nlabrec@hmr.qc.ca

³Abbreviations used in this paper: AnV, Annexin V; DC, dendritic cell; IL-2R, IL-2 receptor; IL-7R, IL-7 receptor; IL-15R, IL-15 receptor; MFI, mean fluorescence intensity; PI, propidium iodide.

Figure Legends

FIGURE 1. Model to study memory CD8⁺ T cell development. 5×10^5 sorted 2C cells were transferred into C57BL/6 mice followed 3 days later by immunization with 75 μ g of the SYRGL peptide emulsified in CFA. (A) 5 days after immunization, expansion of 2C T cells isolated from inguinal lymph nodes was assessed by staining with anti-CD8 and anti-2C TCR (1B2) Abs. (B) Time course of 2C CD8⁺ T cell expansion. The number of CD8⁺1B2⁺ T cells in inguinal lymph nodes is shown as a function of the day post-immunization. Each dot represents a mouse. (C) Presence of functional 2C memory T cells one month after immunization. Lymph node cells were stained with anti-CD8, anti-CD44, anti-Ly6C and 1B2 Abs. Ly6C and CD44 surface expressions on the CD8⁺1B2⁺ T cells are shown (middle panel). Splenocytes were restimulated *in vitro* in the presence or absence of 1 μ g/ml of SYRGL for 6 h; IFN- γ production (left panel) was assessed by intracellular staining. The percentage of 2C T cells is shown when applicable.

FIGURE 2. Cytokine receptor expression on effector 2C CD8⁺ T cells after immunization with peptide emulsified in CFA. 5×10^5 2C cells were transferred into C57BL/6 mice followed 3 days later by immunization with 75 μ g of SYRGL peptide in CFA. At various days after immunization, lymph node cells were stained with anti-IL-2R β or anti-IL-7R α , anti-CD8, anti-CD44 and 1B2 (anti-2C TCR) Abs. (A) IL-2R β and IL-7R α expressions on CD8⁺1B2⁺ and CD8⁺1B2⁻ cells are shown relative to isotype control staining. Results are representative of three independent experiments. (B) Quantification of IL-7R α expression by 2C cells during an antigenic response. The MFI of IL-7R α expression on CD8⁺1B2⁺ T cells was normalized to the MFI of IL-7R α expression on the CD8⁺1B2⁻ T cells. The MFI ratio for each mouse is shown over time.

FIGURE 3. IL-7R α expression is maintained on effector 2C T cells during the contraction phase that occurs following immunization with peptide-pulsed mature DCs. (A) Generation of 2C CD8⁺ effector and memory T cells after immunization with peptide-pulsed DCs. 10^6 purified 2C CD8⁺ T cells (1B2⁺) were transferred

into C57BL/6 hosts (1B2⁻). Three days post-transfer, mice were immunized with 5×10^5 mature DCs loaded with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SYRGL peptide or unpulsed DCs. Days 5 and 54 after immunization, responsive CD8⁺ T cells were detected by staining lymph node cells with anti-CD8 and 1B2 Abs. Percentages and numbers of 2C CD8⁺ T cells (1B2⁺) from one lymph node are indicated on each dot plot. The histogram in the lower right corner of each dot plot shows the phenotype of effector and memory T cells. (B) IL-7R α expression on 2C effector T cells during the contraction phase. Effector T cells were generated as described in (A). At various days after immunization, lymph node cells were stained with anti-2C TCR (1B2), anti-CD8 and anti-IL-7R α Abs. IL-7R α expressions on effector T cells (CD8⁺1B2⁺) and naive C57BL/6 recipient T cells (CD8⁺1B2⁻) are shown relative to isotype control staining for two independent mice out of three. (C) Kinetics of T cell contraction. The number of Ag-specific T cells (CD8⁺1B2⁺) present in lymph nodes (mesenteric, inguinal and brachial) at different days after immunization is shown.

FIGURE 4. No selective expression of IL-7R α on V β 5LTAOC α ^{-/-} T cells during the contraction phase. (A) Generation of V β 5LTAOC α ^{-/-} CD8⁺ effector and memory T cells after immunization with peptide-pulsed DCs. 10^6 CD8⁺ (CD45.2⁺) T cells from V β 5LTAOC α ^{-/-} mice were transferred into B6.SJL hosts (CD45.1⁺). On day 2 post-transfer, mice were immunized with 5×10^5 mature DCs loaded with OVA₂₅₇₋₂₆₄ (DCs OVA₂₅₇₋₂₆₄) or unpulsed DCs. On days 5 and 60 after immunization, responsive CD8⁺ T cells were detected by staining lymph node cells with anti-CD45.2 and anti-CD8 Abs. Percentages and numbers of OVA specific CD8⁺ T cells (CD45.2⁺) from one lymph node are indicated on each dot plot. The histogram in the lower right corner of each dot plot shows the phenotype of effector and memory T cells. (B) IL-7R α expression on V β 5LTAOC α ^{-/-} effector T cells during the contraction phase. Effector T cells were generated as described in (A). At various days after immunization, lymph node cells were stained with anti-CD8, anti-CD45.2, anti-CD45.1 and anti-IL-7R α Abs. IL-7R α expressions on effector T cells (CD8⁺CD45.2⁺) and naive B6.SJL recipient T cells (CD8⁺CD45.1⁺) are shown relative to isotype control staining for two independent mice. (C) Kinetics of the T cell response. The percentages of Ag-specific

V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ T cells (CD8⁺CD45.2⁺) recovered from lymph nodes at different days after immunization are shown.

FIGURE 5. Live effector 2C T cells do not express IL-7R α at higher levels. IL-7R α expression on apoptotic (AnV⁺) versus live (AnV⁻) effector 2C CD8⁺ T cells during the immune response. At various days after immunization with peptide pulsed in CFA, lymph node cells were stained with anti-IL-7R α , anti-CD8 and 1B2 Abs and with AnV and PI to detect apoptotic cells. The MFI of IL-7R α expression on CD8⁺1B2⁺PI⁻ T cells was normalized to the MFI of the CD8⁺1B2⁻PI⁻ T cells to obtain a ratio for the AnV⁺ or AnV⁻ T cells. Each dot represents a mouse.

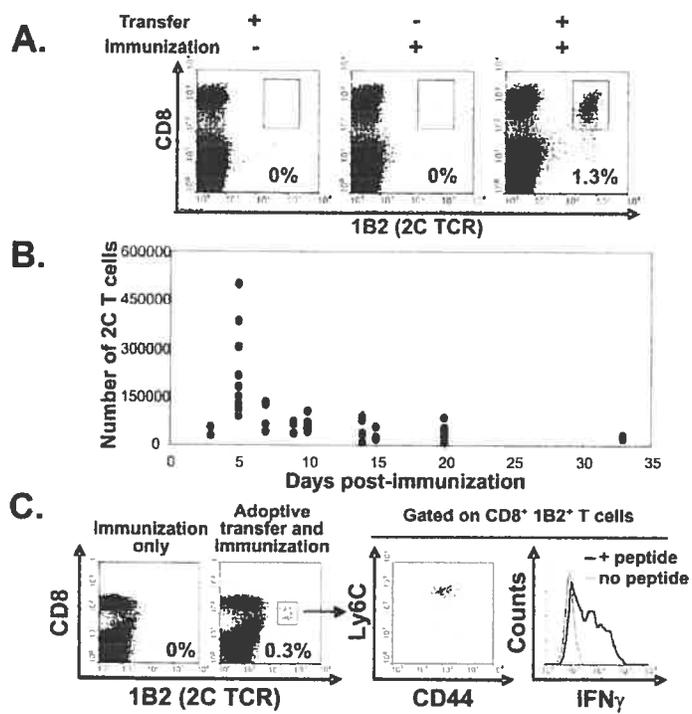


Figure 1

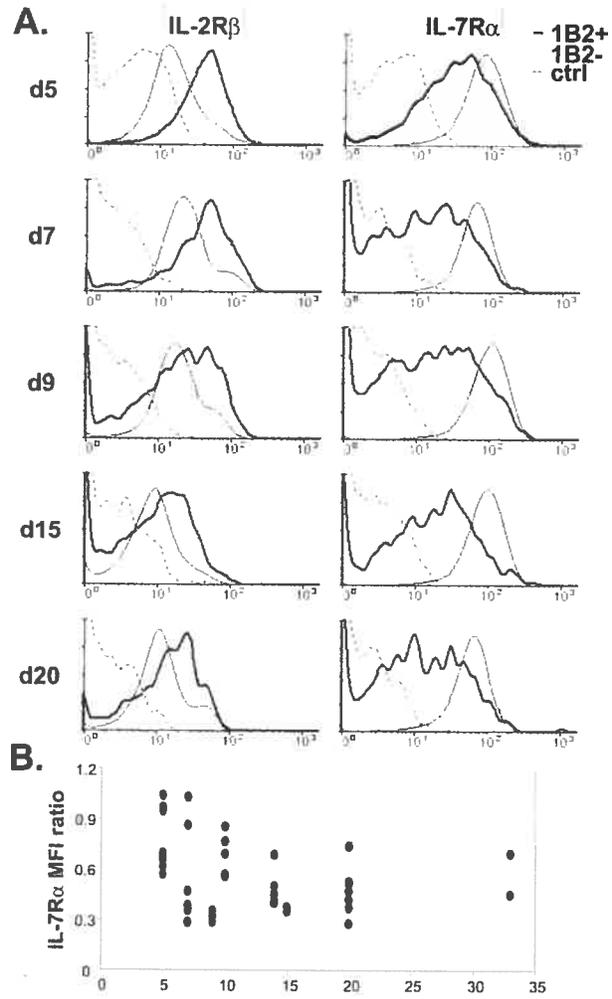


Figure 2

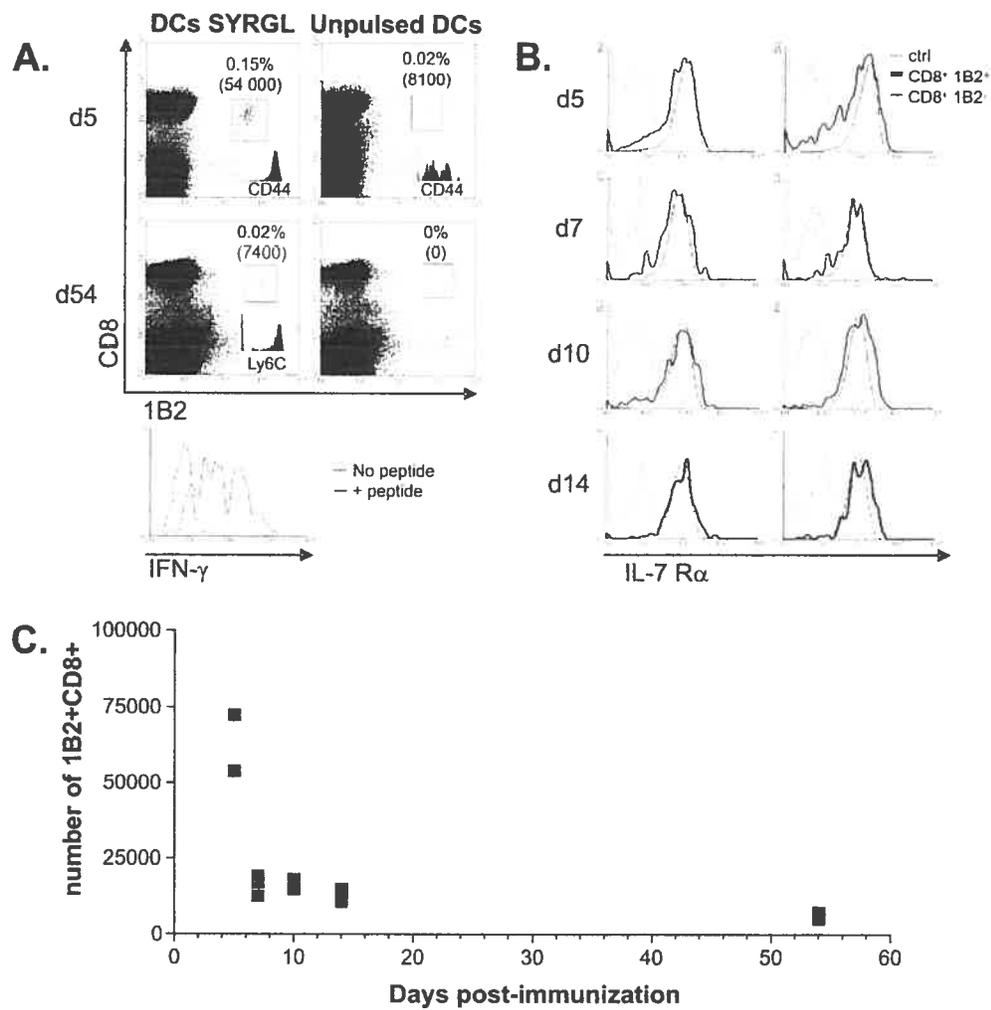


Figure 3

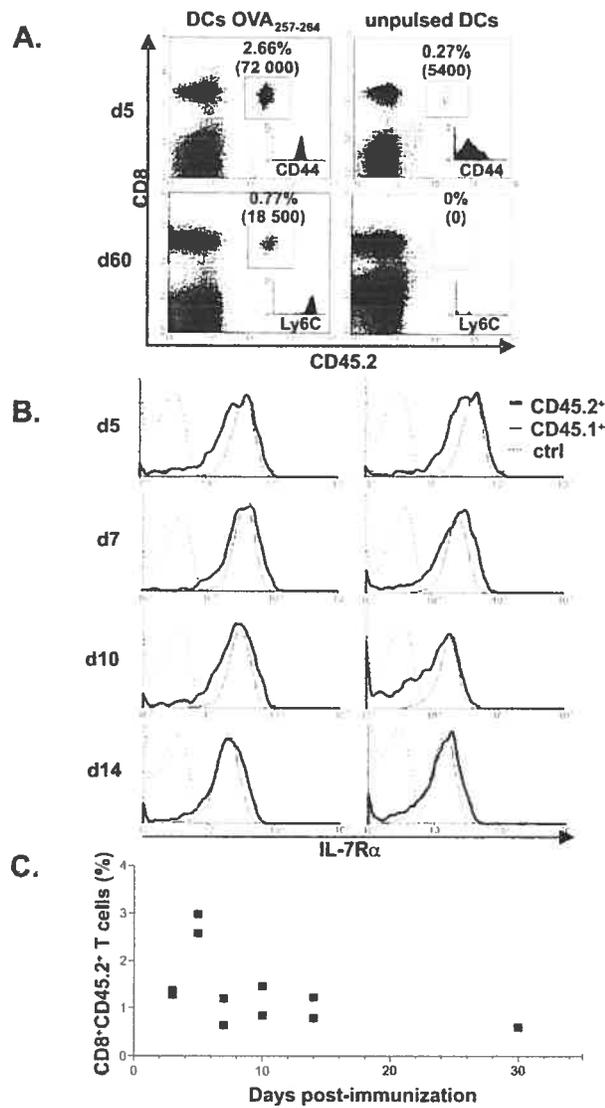


Figure 4

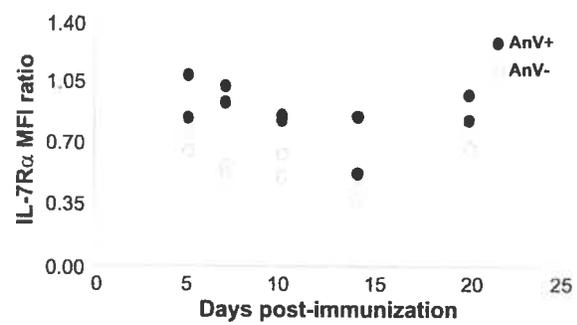


Figure 5

Loss of naive and memory T lymphocytes following TCR ablation disrupts lymphoid organ homeostasis

Marie-Pierre Hardy¹, Julie Rooney¹ and Nathalie Labrecque^{1,2}

¹Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Department of Medicine, University of Montreal.

Running title: T cell regulation of lymphoid organ homeostasis

²Address correspondence and reprint requests to:

Nathalie Labrecque, Ph.D

Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital,

5415 boul. de l'Assomption,

Montreal, Qc, Canada HIT 2M4

E-mail address: nlabrec@hmr.qc.ca

ABSTRACT

The co-existence of naive, effector and memory T lymphocytes in an immune system made of a fixed number of cells with different roles and finite life spans requires independent homeostatic regulation of the different T cell pools. Cytokines and TCR-MHC interaction contribute to the homeostasis of the different T lymphocyte pools. However, the absence of requirement for TCR-MHC interaction for memory T cell survival raises the intriguing possibility that MHC-independent TCR signals might influence the survival of memory T cells. In this study, we have tested the possibility that intrinsic constitutive signals from the TCR might allow MHC-independent survival of memory T cells. To evaluate if constitutive TCR signaling participates in the long-term survival of memory T lymphocytes, we used a unique transgenic tetracycline-inducible TCR expression system in mice. Our results show that the ablation of TCR expression following tetracycline administration did not influence the survival of antigen-specific memory CD8⁺ T cells while it leads to the rapid disappearance of CD4⁺ memory T lymphocytes. While performing the study on memory T cell survival, we have observed that the disappearance of naive and memory T cells, due to lack of TCR stimulation, leads to concomitant loss of B lymphocytes and dendritic cells in secondary lymphoid organs. These unexpected and exciting results show that T lymphocytes participate actively in the homeostasis of secondary lymphoid organs.

INTRODUCTION

The co-existence of naive, effector and memory T lymphocytes in an immune system made of a fixed number of cells with different roles and finite life spans requires independent homeostatic regulation of the different T cell pools¹⁻⁴. This is necessary to keep an optimal immune system all life long; an individual should be able to respond to new pathogens, and to recurrent infectious agents, at any time. Cytokines and TCR signals play important and distinct roles in the homeostasis of the different T lymphocyte pools. Furthermore, the generation of successful immune responses is also critically dependent on the proper maintenance of all the different cell types composing the secondary lymphoid organ. This is crucial since secondary lymphoid organ provide the necessary microenvironment for the cooperation of antigen-specific T and B lymphocytes and antigen presenting cells in order to initiate an efficient immune response. Although we start to have a good understanding of how lymphoid organ architecture is made, we do not know much on how secondary lymphoid organ homeostasis is maintained at the steady state.

The survival of CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells is regulated by different cytokines. It has been shown that CD8⁺ memory T cells require IL-15 for their long-term maintenance⁵⁻⁸ while CD4⁺ memory T lymphocyte survival was not affected in the absence of IL-15 signals^{6,8,9}. However, IL-7 seems to be essential for the long-term survival of CD4⁺ memory T cells^{10,11} but not for the maintenance of the CD8⁺ memory T cell pool¹². Although, naive and memory T lymphocytes occupy independent homeostatic niches^{3,13,14}, it is intriguing that CD4⁺ memory T cells needs IL-7 like the CD4⁺ and CD8⁺ naive T cell pools^{12,15-18}. This raises the possibility that other homeostatic signal(s) allow for the independent and non-competitive maintenance of naive and CD4⁺ memory T lymphocytes. One of these is probably a differential requirement for TCR-MHC interactions.

Unlike naive CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, which are dependent on TCR interaction with self-MHC molecules^{15,19-25}, the adoptive transfer of CD4⁺ or CD8⁺ memory T cells into MHC deficient hosts have shown that TCR-MHC interactions are not required for the long-term survival of memory T lymphocytes²⁶⁻²⁸. However, some conflicting results were reported for HY TCR transgenic T cells: the expression of MHC class I molecules was required, but a

non-restricting allele could allow their survival^{19,29}. The absence of requirement for TCR-MHC interaction for memory T cell survival raises the intriguing possibility that MHC-independent TCR signals might influence the survival of memory T cells. Indeed, it has been shown that memory T cells have re-organized their TCR machinery³⁰ and that memory T cell signaling differs from naive cells^{31,32}. This permits to suggest the existence of intrinsic constitutive signals from the TCR, which might allow MHC-independent survival of memory 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} memory phenotype T cells¹¹. Due to possible competition for IL-7 between naive and CD4⁺ memory T lymphocytes, it is possible that CD4⁺ memory T cells used constitutive TCR signaling (independent of MHC interactions) to receive survival signal allowing them to be maintained in a different homeostatic niche than naive T lymphocytes. The possible existence of MHC-independent TCR signaling would be reminiscent of what is happening in pre-T, pre-B and B cells³³⁻³⁸. The survival of B cells is totally dependent on the expression of a functional B cell receptor (BCR) and this in absence of a known ligand^{37,38}.

To evaluate if constitutive TCR signaling contributes to the long-term survival of memory T lymphocytes, we used a unique transgenic tetracycline(tet)-inducible expression system of the TCR in mice³⁹. Our results show that the ablation of TCR expression following tet administration, which abrogates any possible signaling via the TCR in T cells, did not influence the survival of antigen-specific memory CD8⁺ T cells while it leads to the rapid disappearance of CD4⁺ memory T lymphocytes. While performing the study on memory T cell survival, we have observed that the disappearance of naive and memory T cells, due to lack of TCR tickling, leads to concomitant loss of B lymphocytes and dendritic cells in secondary lymphoid organs. These unexpected and exciting results provide novel evidence that T lymphocytes participate actively in the homeostasis of secondary lymphoid organs.

RESULTS

Generation of OVA₂₅₇₋₂₆₄ specific CD8⁺ memory T cells

To determine if TCR expression is necessary for memory CD8⁺ T cells survival, we used a transgenic mouse model, Vβ5LTAOCα^{-/-}, that expresses the OVA-specific OT-1 TCR whose expression can be controlled by tet administration³⁹. In this transgenic model, the Vβ5 TCR chain is expressed constitutively while the expression of the Vα2 TCR chain is regulatable by tet. Tet administration to Vβ5LTAOCα^{-/-} mice will inhibit the activity of the tTA transactivator driven by the *lck* promoter, this will block TCR expression by inhibiting the tTA dependent transcription of the Vα2 TCR transgene³⁹. To generate memory CD8⁺ T cells expressing a tet-inducible TCR, we adoptively transferred 10⁶ Vβ5LTAOCα^{-/-} (CD45.2⁺) CD8⁺ T cells into congenic B6.SJL (CD45.1⁺) recipient mice. 48 hours later, recipients were immunized with 5x10⁵ bone marrow derived mature DCs pulsed or not with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (SIINFEKL). We always transfer female T cells into female hosts followed by immunization with male DCs in order to provide T cell help, which is necessary for proper development of functional and long-lived memory CD8⁺ T cells⁴⁰⁻⁴³. The peak of the response occurred 5 days post-immunization and all CD8⁺CD45.2⁺ T cells at this time were activated as shown by CD44 expression (**Fig.1A**). Memory CD8⁺ T cells were formed 30 days post-immunization but the number of memory CD8⁺ T cells was stable from day 60 to day 120 post-immunization (**Fig.1A**). The memory CD8⁺ T cells that are produced possess all the hallmarks of central memory T cells since they express high levels of Ly6C, CD62L, CCR7 and CD127 (IL-7Rα) (**Fig.1B**). Moreover, they have the capacity to rapidly respond to a secondary challenge as illustrated by their massive expansion in the spleen three days after secondary immunization with peptide-pulsed DCs (**Fig.1C**) and by their ability to produce rapidly, within 6 hours, IFN-γ when *ex vivo* stimulated with their cognate peptide (**Fig.1D**, right histogram). Thus, our protocol allows for the generation of long-lived and functional central memory T cells.

CD8⁺ memory T cells survive in the absence of TCR expression

The absence of requirement for TCR-MHC interaction for memory T cell survival^{19,26-28} does not exclude a possible role for TCR signaling in this process.

It is plausible that intrinsic constitutive signals from the TCR (independent of MHC interaction) may contribute to the survival of memory T cells. To test this possibility, we used our tet inducible TCR expression system. First, we generated OVA₂₅₇₋₂₆₄ specific memory CD8⁺ T cells expressing a tet regulatable TCR as described above. Before treating a cohort of mice with tet, we verified by removing by surgery an inguinal lymph node that memory T cells were formed 40 days after immunization with peptide-pulsed DCs, a time point when the population of memory T cells is already stable (data not shown). We chose to follow the survival of Vβ5LTAOCα^{-/-} CD8⁺ memory T cells in the same mouse over time to have a real estimate of the number of memory T cells that are present before we stop TCR expression and during the course of tet treatment. This was possible since we knew that the number of OVA specific memory T cells were equivalent in the different superficial lymph nodes (right and left inguinal, right and left brachial) that we could remove by surgery (data not shown). As shown in **Fig.2**, Vβ5LTAOCα^{-/-} CD8⁺ memory T cells (CD8⁺CD45.2⁺Ly6C^{high}) were detected in the inguinal lymph nodes of immunized mice. Mice were then administered tet (400 μg/ml, a dose known to abrogate TCR expression³⁹) in the drinking water to stop TCR expression in OVA specific memory CD8⁺ T cells. Tet was changed twice a week and administered up to the end of the experiment to insure a great TCR abrogation on OVA specific memory CD8⁺ T cells. Lymph nodes (brachial or inguinal) were removed surgically at different days after tet treatment and the survival of Vβ5LTAOCα^{-/-} memory CD8⁺ T lymphocytes was followed over time by staining lymph node cells with anti-CD8, anti-CD45.2 and anti-Ly6C antibodies. An anti-CD3 and anti-Vα2 staining was also performed to make sure that TCR expression was stopped in tet-treated mice (data not shown). OVA specific memory CD8⁺ T cells generated after transfer of naive Vβ5LTAOCα^{-/-} CD8⁺ T cells in B6.SJL mice and immunization with OVA₂₅₇₋₂₆₄ pulsed DCs were still present in similar numbers after 35 and 65 days of tet treatment (**Fig.2**, 75 and 105 days post-immunization). These results show that memory CD8⁺ T cells survive in the absence of TCR expression, which indicates that TCR signals are not necessary for the long-term maintenance of CD8⁺ memory T lymphocytes.

TCR expression is necessary for CD4⁺ memory T cell survival

The unimpaired survival of CD8⁺ memory T lymphocytes following TCR ablation does not exclude a possible role for TCR expression in the maintenance of CD4⁺ memory T 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^{high} T cells¹¹. This suggests that intrinsic constitutive signals from the TCR might contribute to the MHC-independent survival of CD4⁺ memory T cells. To determine if TCR expression was necessary for the long-term maintenance of CD4⁺ memory T cells, we used our tet-inducible TCR expression system in the absence of the transgenic OT-I TCR β chain (LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice)³⁹. In LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice, all the T cells express a tet-regulatable TCR V α 2 chain in combination with endogenous TCR β chain and almost all of the T cells are CD4⁺ (Fig.3A) due to their preferential selection into the CD4 lineage^{39,44}. Since LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice possess a polyclonal repertoire of T lymphocytes, with aging they encounter antigens from the environment, which leads to the development of a pool of CD4⁺ memory T cells with a CD44^{high}CD62L^{low}CD45RB^{low} phenotype^{45,46} (Fig.3A). LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice, older than 8 weeks, were treated with tet (400 μ g/ml) to stop TCR expression (Fig.3B) and the survival of CD4⁺ memory T cells was followed over time in the same mouse by surgical removal of superficial lymph nodes. Importantly, we took an inguinal lymph node before tet treatment to evaluate the number of CD4⁺ memory T cells at the beginning of the experiment (Fig.3C). At different times during the tet treatment, a lymph node (brachial or inguinal) was removed surgically and the number of CD4⁺ memory T cells was determined by cell staining with anti-CD4, anti-CD45RB, anti-CD62L and anti-CD44 antibodies. To normalize the results obtained from the different mice, a ratio representing the number of CD4⁺ memory T cells after versus before tet treatment was used. As shown in Fig.3C, CD4⁺ LTAOC $\alpha^{-/-}$ memory T cells with a CD44^{high}CD62L^{low}CD45RB^{low} phenotype^{45,46} disappeared over time when they did not express the TCR as illustrated by a ratio of the number of memory T cells before and after tet treatment lower than one. Very importantly, the disappearance of LTAOC $\alpha^{-/-}$ memory T cells is not due *per se* to the tet treatment but to the loss of TCR expression since we did not observe any decrease in the number of control wild-type C57BL/6 CD4⁺ memory T lymphocytes following tet

treatment (**Fig.3C**). Moreover, the decline in the number of CD4⁺ LTAOC α ^{-/-} memory T cells is really due to TCR ablation and not to a spontaneous weaning of the number of memory T cells in the LTAOC α ^{-/-} transgenic mouse model since CD4⁺ memory T cells were stably maintained over time in LTAOC α ^{-/-} mice in the absence of tet treatment (**Fig.3C**). We estimated that the half-life of CD4⁺ LTAOC α ^{-/-} memory T lymphocytes lacking TCR expression is 26 days (**Fig.3C**), which is very similar to the one reported for naive CD4⁺ T cells lacking TCR expression^{39,47} or missing interaction with self-MHC molecules^{15,20-22,24,25}. Thus, our results show that CD4⁺ memory T cells, like naive CD4⁺ T lymphocytes^{39,47} and in contrary to OVA specific CD8⁺ T cells (**Fig.2**), need TCR expression to survive. Moreover, the ability of CD4⁺ memory T cells to survive in absence of TCR-MHC interactions^{26,27} suggests that constitutive TCR signaling contribute to the maintenance of the long-lived CD4⁺ memory T cell pool.

Loss of T cell survival following TCR ablation disrupts secondary lymphoid organs homeostasis

Unexpectedly, while studying the role of TCR expression for the survival of CD4⁺ memory T lymphocytes in LTAOC α ^{-/-} transgenic mice, we noticed a decline of not only CD4⁺ naive and memory T cells but of the total cellularity of the lymph nodes, which could not be accounted only by T cell loss. As shown in **Fig.4A**, the decline in T cell number is accompanied by the concomitant decrease in total cellularity and in the number of non-T cells. Similar observations were made in V β 5LTAOC α ^{-/-} transgenic mice following TCR expression shutdown (data not shown). These results strongly suggest that T cells regulate the survival of the other lymph node cell types. Since it is well known that DCs provide survival signals to T cells^{24,48,49}, we were wondering if T cells were reciprocally giving survival signals to DCs. To evaluate this possibility, we purified DCs from secondary lymphoid organs (spleen and mesenteric lymph nodes) of LTAOC α ^{-/-} mice that had been treated with tet for 90 days, a time point when most of the T cells had disappeared. Interestingly, the decline in T cells in lymphoid organs leads to a 4-10 fold reduction in the number of DCs recovered from the spleen and lymph nodes of LTAOC α ^{-/-} mice treated with tet compared to age matched untreated LTAOC α ^{-/-} mice (**Fig. 4B**). Importantly, this decrease in DCs number in

LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice treated with tet is not due to tet mediated loss of DCs since no decrease in the number of DCs recovered from lymphoid organs of tet treated wild-type C57BL/6 mice was observed (**Fig.4B**). However, the reduction in the number of DCs recovered in tet treated LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice does not explain by itself the reduced cellularity of lymph nodes that occurs with the decline of the T cell pool. Indeed, the number of B lymphocytes decreases significantly (4-fold) in the mesenteric lymph nodes of tet treated LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice compared to untreated mice (**Fig.4C**). These results suggest that the presence of T cells in lymphoid organs is absolutely needed for the maintenance of the DC and B cell pools and thus of lymphoid organ homeostasis in the steady state.

We then asked if T cell loss following the down-regulation of TCR expression in tet treated LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice affects lymph node architecture. Interestingly, lymph node histology of LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice treated with tet for 60 days showed reduced cellular density and big empty regions in the T cell zone of the lymph node (**Fig.5**). We could also notice that compared to untreated mice, LTAOC $\alpha^{-/-}$ lymph nodes from tet treated mice were smaller and that the size of the B cell follicles was decreased (**Fig.5**). Thus, the loss of T cells did not lead to the complete disorganization of lymph node architecture since B and T cell zones were still segregated although B cell follicles were smaller in size. These results suggest that T cells are probably necessary for the survival of the different cellular subsets constituting the secondary lymphoid organs or for keeping those cells into these organs, without dictating the spatial organization of these different subsets. All together, our unexpected and exciting results suggest that T cells produce or express some factors that are involved in the maintenance of the different cell types present in lymphoid organs and contribute actively to lymphoid organs homeostasis.

DISCUSSION

In this report, we demonstrate that TCR expression is required for the survival of the CD4⁺ memory T cell pool but not for the maintenance of CD8⁺ memory T lymphocytes. These results illustrate again a differential regulation of the CD4⁺ and CD8⁺ memory T cell subsets and they suggest that CD4⁺ memory T cells are able to maintain a basal and constitutive TCR activity in absence of ligand engagement to promote their survival.

The fact that memory T cells do not require TCR-MHC interactions for their maintenance in the memory pool^{19,26-28} does not exclude a possible role for TCR signaling in this process. It is plausible that intrinsic constitutive signals from the TCR (independent of MHC interaction) contribute to the survival of memory T cells. Indeed, we have shown that CD4⁺ memory T lymphocytes require TCR expression for their long-term maintenance in the T cell pool. Thus, we believe that CD4⁺ memory T cells maintain a basal and intrinsic activity in absence of ligand engagement and that this is essential to promote their survival. The existence of a ligand independent activity of the TCR in CD4⁺ memory T lymphocytes is reminiscent of what is happening in pre-T, pre-B and B cells. The survival of B cells is totally dependent on the expression of a functional B cell receptor (BCR) and this in absence of a known ligand^{37,38}. Moreover, it was proposed that the pre-TCR and pre-BCR survival and differentiation signals (in absence of extracellular ligands) originate from the preferential segregation of these receptors into lipid rafts, which initiates signaling in an autonomous fashion³³⁻³⁶. Thus, it is possible that the TCR machinery of CD4⁺ memory T cells, but not of the CD8⁺ memory T lymphocytes has been reorganized to allow constitutive signaling in absence of ligand interaction. Moreover, the decreased survival of CD4⁺CD44^{high} T cells when lck expression was shut-off in the context of fyn deficiency¹¹ also argues in favour of the existence of a role for autonomous TCR signaling in the maintenance of the CD4⁺ memory T cell pool. Future biochemical characterization of the TCR expressed by CD4⁺ memory T cells will help to understand how this constitutive signaling occurs.

It is intriguing that CD4⁺ memory T cells need constitutive TCR signaling to be maintained in the T cell pool while CD8⁺ memory T cells do not. One

possible explanation could reside in the fact that CD8⁺ memory T cell pool is the only T cell subset for which IL-15 is a survival factor^{5-8,50-53} while both naive and CD4⁺ memory T lymphocytes are dependent on IL-7 for their maintenance in the T cell reservoir^{10-12,15-18}. CD4⁺ memory T cells have to compete for IL-7 with naive T cells and thus they might require another specific signal to be maintained efficiently in the T cell pool. Moreover, it is also possible that constitutive TCR signaling in CD4⁺ memory T cells render them receptive to IL-7 survival signals.

The death of CD4⁺ memory T cells lacking TCR expression could also occur due to the concomitant perturbation of lymphoid organ homeostasis in tetracycline treated LTAOC α ^{-/-} mice. It is possible that the disappearance of the other cellular subsets constituting secondary lymphoid organs (naive T cells, dendritic cells and B lymphocytes) affect the availability of CD4⁺ memory T cell survival factor(s). For example, IL-7 access might be reduced due to the disappearance of dendritic cells and stromal cells that occurs in our model. The adoptive transfer of LTAOC α ^{-/-} memory T lymphocytes into wild-type recipients followed by TCR expression shutdown should allow us to determine if the proper survival of CD4⁺ memory T cells requires constitutive TCR signalling or the proper maintenance of secondary lymphoid organ homeostasis.

Recently, Sun *et al.* have demonstrated that the presence of CD4⁺ T lymphocytes is required for the maintenance of a functional and long-lived CD8⁺ memory T cell pool⁵⁴. They, suggest that CD4⁺ T cells either produce a CD8⁺ memory T cell survival factor or that they influence the survival of another cell type involved in CD8⁺ memory T cells homeostasis. This raises the possibility that the decreased survival of CD4⁺ memory T cells in our model results from the concomitant loss of the CD4⁺ T cell pool. Thus, CD4⁺ T cells might be involved in the maintenance of both the CD4⁺ and CD8⁺ memory T cell pool. The identification of how CD4⁺ T cells play a central role in the homeostasis of the CD4⁺ and CD8⁺ memory T cell reservoir will bring very important informations to develop new strategies to vaccinate immuno-compromised patients.

While studying the role of TCR expression for the survival of memory T lymphocytes, we unexpectedly observed that the disappearance of the T cell pool,

due to a lack of TCR tickling, leads to the concomitant loss of B lymphocytes and dendritic cells in secondary lymphoid organs. These results present a novel evidence that T cells regulate secondary lymphoid organ homeostasis in the steady-state. The disturbance of secondary lymphoid organ homeostasis have not been seen in other systems in which T cell survival was studied probably because in these settings not all the T lymphocyte subsets were lost^{15,20,21,23-25}. However, the reported reduced number of dendritic cells in the lymph nodes of T cell deficient mice⁵⁵, such as RAG^{-/-} and SCID mice, is also in favour of the hypothesis that T cells contribute actively to the maintenance of secondary lymphoid organ homeostasis. Thus, we believe that T cells produce a factor that is involved in the maintenance of the different cell types present in secondary lymphoid organ. Since members of the TNF/TNF receptor family regulate cell survival and play crucial role in lymph nodes and spleen organogenesis⁵⁶⁻⁶³, we would like to postulate that they will also participate in secondary lymphoid organ homeostasis. The best candidates are probably lymphotoxin (LT) and TRANCE ligand-receptor pairs since the ligands are expressed by lymphocytes⁶⁴⁻⁶⁶ while the receptors are expressed by dendritic cells and stromal cells^{67,68}. Their pattern of expression suggests a possible cross-talk between lymphocytes and dendritic/stromal cells. Very interestingly, a lympho-epithelial cross-talk in the adult thymus, mediated by LT/LT β receptor is required for the maintenance of the steady-state numbers of medullary epithelial cells⁶⁹. The identification of the mechanism by which T cells regulate secondary lymphoid organ homeostasis will certainly bring new therapeutic avenues to maintain an efficient immune system all life long and to restore a proper immune system in immuno-deficient patients.

METHODS

Mice. B6.SJL and C57BL/6 mice were bred under specific pathogen free conditions at the Guy-Bernier Research Centre. V β 5LTAO mice expressing a tetracycline inducible TCR specific for the OVA peptide SIINFEKL in the context of K^b (OT-1 TCR)³⁹ and LTAO mice expressing an OT-1 TCR α chain inducible by tetracycline³⁹ were bred to C α deficient mice (V β 5LTAOC α ^{-/-} and LTAOC α ^{-/-}). To stop TCR expression, tet 400 μ g/ml (Sigma) was administered in the drinking water supplemented with 2% sucrose.

Flow cytometry and antibodies. The following antibodies were used: anti-CD4 (L3/T4 or CT-CD4), anti- B220 (RA3-6B2), anti-CD62L (MEL-14), anti-IgM, anti-IA^b (28-16-8S), anti-IFN- γ (clone XMG1.2), anti-CD8 α (53-6.7), anti-CD11c (HL3), anti-CD45RB (C363.16A), anti-CD3 (145-2C11), anti-CD44 (IM7), anti-Ly6C (AL-21), anti-CD45.2 (104), anti-CD86 and anti-CD127 (A7R34). Biotinylated antibodies were detected with streptavidin-FITC, -PE, -PercP or -APC. CCR7 was detected using a fusion protein linking CCL19 sequence to Fc portion of human IgG produced in our laboratory followed by goat F(ab')₂ anti-human IgG (Fc specific) antibody staining. Antibodies and streptavidins were purchased from Caltag, Cedarlane Laboratories, BD Biosciences or eBioscience.

Cell stainings were performed on ice in FACS Wash (DMEM without phenol red supplemented with 3% heat inactivated horse serum, 0.03M HEPES and 0.1% NAN₃) and analyzed on a FACScalibur using CellQuest software (Becton Dickinson) or WinMDI software (from Joseph Trotter, Scripps Clinic, La Jolla, CA).

Generation of bone marrow derived DCs. Bone-marrow (BM) derived DCs were obtained by culturing BM cells during 7 days with GM-CSF and IL-4 according to the procedures described by Inaba et al.⁷⁰ and by Son et al.⁷¹. Briefly, BM from a male C57BL/6 mouse was flushed with complete RPMI and red blood cells were lysed with 0.83% NH₄Cl. Cells were plated at a concentration of 2x10⁵ cells per ml in complete RPMI (supplemented with 10% FBS, 1mM sodium pyruvate, 0.1mM non essential amino acids, 10mM HEPES, 10 μ M β -

mercaptoethanol and penicillin-streptomycin) in 6-well plates. Recombinant GM-CSF (500 U/ml) and IL-4 (250 U/ml) (Medicorp) were added at day 2, 3 and 6 of culture. To induce maturation of DCs, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LPS (Sigma) was added on day 6. On day 7, cells were pulsed for 4 hours with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide. 4 hours later, cells were harvested and DCs were isolated on a 14.7% Nycodenz (Sigma-Aldrich) gradient by centrifuging at 1200g for 20 minutes. DCs were collected from the interface and washed three times in PBS before injection.

Adoptive transfer and immunization. 10⁶ lymph node 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 5x10⁵ male C57BL/6 mature dendritic cells (DCs) pulsed or not with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide. At different time after immunization, superficial lymph nodes (brachial or inguinal) were removed surgically³⁹ and sequentially to follow the T cell response in the same mouse.

Recall response. Mice containing V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ memory CD8⁺ T cells (6 months after the primary immunization) were re-challenged with 5x10⁵ mature DCs pulsed or not with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide. Three days after secondary immunization, splenocytes were stained with anti-CD8 and anti-CD45.2 antibodies to detect the expansion of antigen-specific memory T lymphocytes. The activation status of the memory T cells was evaluated with anti-CD62L antibody staining.

Detection of *ex vivo* IFN- γ production. Splenocytes were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide in complete RPMI for 6h at 37°C. 10 μg of brefeldin A (Sigma-Aldrich) per ml of cells was added for the last 2h. Cells were fixed in 2% formaldehyde in PBS 1.2X for 20 minutes at room temperature. 10⁶ cells were stained with anti-IFN γ Abs diluted in 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) for 30min at room temperature. Cells were washed twice without saponin before cell surface staining.

DCs extraction from spleen and lymph nodes. DCs were extracted from lymphoid organs according to the procedure described by Henri and collaborators⁷². Briefly, organs were collected in 5ml of collagenase (100 U/ml, Sigma) diluted in PBS and were dissociated by mechanic pressure. Cells were filtered through a nylon mesh and kept on ice for the rest of the procedure. The remaining cells (stroma) on the nylon filter were further incubated in 4 ml of collagenase (400 U/ml) for 1h at 37°C in a petri dish. After incubation, cells dissociated from the stroma were then passed through the nylon filter and kept on ice. The petri dish was washed twice with PBS/2mM EDTA/FBS1% and the suspension was filtered on the nylon mesh. All the recovered cells were incubated for 5 min at room temperature on a shaker, washed twice with PBS and resuspended in 1 ml of complete RPMI. To enrich for DCs, the recovered cells were selected on a 14.7% Nycodenz (Sigma-Aldrich) gradient by centrifuging at 1200g for 20 minutes. DCs were collected from the interface and washed three times in complete RPMI. Purity was assessed by staining with anti-CD11c and anti-IA^b antibodies and was usually in the range of 50-60%.

Histology. Lymph nodes were embedded in parafilm and sections were stained with hematoxylin-eosin.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the members of the laboratory, C. Piccirillo, S. Fournier, C. Yu and N. Arbour for helpful discussions; S. Ouellet for expert FACS technical assistance; G. Dubuc for help in the construction of the CCL19-Fc fusion protein. We acknowledge the critical review of the manuscript by C. Perreault and R.-P. Sékaly. This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to N.L. The Guy-Bernier FACS facility is partially supported by a multi-user maintenance grant of the CIHR. N.L. is a New Investigator of the CIHR.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

REFERENCES

1. Tanchot, C. & Rocha, B. The organization of mature T-cell pools. *Immunol Today* **19**, 575-9 (1998).
2. Tanchot, C. & Rocha, B. Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J Exp Med* **186**, 1099-106 (1997).
3. Tanchot, C. & Rocha, B. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8⁺ T cell pools. *Eur J Immunol* **25**, 2127-36 (1995).
4. Jameson, S.C. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2**, 547-56 (2002).
5. Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F. & Sprent, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* **8**, 591-9 (1998).
6. Lodolce, J.P. et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* **9**, 669-76 (1998).
7. Ku, C.C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J. & Marrack, P. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science* **288**, 675-8 (2000).
8. Kennedy, M.K. et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 771-80 (2000).
9. Lantz, O., Grandjean, I., Matzinger, P. & Di Santo, J.P. Gamma chain required for naive CD4⁺ T cell survival but not for antigen proliferation. *Nat Immunol* **1**, 54-8 (2000).
10. Kondrack, R.M. et al. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* **198**, 1797-806 (2003).
11. Seddon, B., Tomlinson, P. & Zamoyska, R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* **4**, 680-6 (2003).
12. Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C. & Lefrancois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* **1**, 426-32 (2000).
13. Tanchot, C., Fernandes, H.V. & Rocha, B. The organization of mature T-cell pools. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 323-8 (2000).

14. Freitas, A.A. & Rocha, B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol* **18**, 83-111 (2000).
15. Boursalian, T.E. & Bottomly, K. Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J Immunol* **162**, 3795-801 (1999).
16. Vella, A., Teague, T.K., Ihle, J., Kappler, J. & Marrack, P. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med* **186**, 325-30 (1997).
17. Vivien, L., Benoist, C. & Mathis, D. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* **13**, 763-8 (2001).
18. Tan, J.T. et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8732-7 (2001).
19. Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Perarnau, B., Freitas, A.A. & Rocha, B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* **276**, 2057-62 (1997).
20. Takeda, S., Rodewald, H.R., Arakawa, H., Bluethmann, H. & Shimizu, T. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* **5**, 217-28 (1996).
21. Rooke, R., Waltzinger, C., Benoist, C. & Mathis, D. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* **7**, 123-34 (1997).
22. Kirberg, J., Berns, A. & von Boehmer, H. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* **186**, 1269-75 (1997).
23. Nestic, D. & Vukmanovic, S. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants. *J Immunol* **160**, 3705-12 (1998).
24. Brocker, T. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* **186**, 1223-32 (1997).
25. Witherden, D. et al. Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* **191**, 355-64 (2000).

26. Garcia, S., DiSanto, J. & Stockinger, B. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* **11**, 163-71 (1999).
27. Swain, S.L., Hu, H. & Huston, G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* **286**, 1381-3 (1999).
28. Murali-Krishna, K. et al. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* **286**, 1377-81 (1999).
29. Markiewicz, M.A. et al. Long-term T cell memory requires the surface expression of self-peptide/major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3065-70 (1998).
30. Bachmann, M.F. et al. Developmental regulation of Lck targeting to the CD8 coreceptor controls signaling in naive and memory T cells. *J Exp Med* **189**, 1521-30 (1999).
31. Farber, D.L., Acuto, O. & Bottomly, K. Differential T cell receptor-mediated signaling in naive and memory CD4 T cells. *Eur J Immunol* **27**, 2094-101 (1997).
32. Kersh, E.N. et al. TCR signal transduction in antigen-specific memory CD8 T cells. *J Immunol* **170**, 5455-63 (2003).
33. Saint-Ruf, C. et al. Different initiation of pre-TCR and gammadeltaTCR signalling. *Nature* **406**, 524-7 (2000).
34. Guo, B., Kato, R.M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M.I. & Rawlings, D.J. Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity* **13**, 243-53 (2000).
35. Murga, C. & Barber, D.F. Molecular mechanisms of pre-T cell receptor-induced survival. *J Biol Chem* **277**, 39156-62 (2002).
36. Bannish, G., Fuentes-Panana, E.M., Cambier, J.C., Pear, W.S. & Monroe, J.G. Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis. *J Exp Med* **194**, 1583-96 (2001).
37. Lam, K.P., Kuhn, R. & Rajewsky, K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**, 1073-83 (1997).

38. Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N. & Rajewsky, K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* **117**, 787-800 (2004).
39. Labrecque, N. et al. How much TCR does a T cell need? *Immunity* **15**, 71-82 (2001).
40. Bourgeois, C., Rocha, B. & Tanchot, C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* **297**, 2060-3 (2002).
41. Janssen, E.M. et al. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852-6 (2003).
42. Sun, J.C. & Bevan, M.J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**, 339-42 (2003).
43. Shedlock, D.J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337-9 (2003).
44. Correia-Neves, M., Waltzinger, C., Wurtz, J.M., Benoist, C. & Mathis, D. Amino acids specifying MHC class preference in TCR V alpha 2 regions. *J Immunol* **163**, 5471-7 (1999).
45. Dutton, R.W., Bradley, L.M. & Swain, S.L. T cell memory. *Annu Rev Immunol* **16**, 201-23 (1998).
46. Blander, J.M. et al. A pool of central memory-like CD4 T cells contains effector memory precursors. *J Immunol* **170**, 2940-8 (2003).
47. Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A. & Rajewsky, K. How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8744-9 (2001).
48. Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B. & Trautmann, A. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* **2**, 925-31 (2001).
49. Kondo, T. et al. Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat Immunol* **2**, 932-8 (2001).
50. Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S. & Tough, D.F. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol* **170**, 5018-26 (2003).
51. Becker, T.C. et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 1541-8 (2002).

52. Goldrath, A.W. et al. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* **195**, 1515-22 (2002).
53. Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X. & Lefrancois, L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* **168**, 4827-31 (2002).
54. Sun, J.C., Williams, M.A. & Bevan, M.J. CD4(+) T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8(+) T cells after acute infection. *Nat Immunol* **5**, 927-933 (2004).
55. Shreedhar, V. et al. Dendritic cells require T cells for functional maturation in vivo. *Immunity* **11**, 625-36 (1999).
56. De Togni, P. et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* **264**, 703-7 (1994).
57. Rennert, P.D., James, D., Mackay, F., Browning, J.L. & Hochman, P.S. Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. *Immunity* **9**, 71-9 (1998).
58. Banks, T.A. et al. Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol* **155**, 1685-93 (1995).
59. Koni, P.A. et al. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* **6**, 491-500 (1997).
60. Alimzhanov, M.B. et al. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9302-7 (1997).
61. Kong, Y.Y. et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-23 (1999).
62. Dougall, W.C. et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* **13**, 2412-24 (1999).
63. Kim, D. et al. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med* **192**, 1467-78 (2000).
64. Browning, J.L. et al. Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J Immunol* **159**, 3288-98 (1997).

65. Josien, R., Wong, B.R., Li, H.L., Steinman, R.M. & Choi, Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol* **162**, 2562-8 (1999).
66. Wong, B.R. et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* **186**, 2075-80 (1997).
67. Murphy, M. et al. Expression of the lymphotoxin beta receptor on follicular stromal cells in human lymphoid tissues. *Cell Death Differ* **5**, 497-505 (1998).
68. Gommerman, J.L. & Browning, J.L. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **3**, 642-55 (2003).
69. Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K. & Bleul, C.C. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med* **198**, 757-69 (2003).
70. Inaba, K. et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**, 1693-702 (1992).
71. Son, Y.I. et al. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J Immunol Methods* **262**, 145-57 (2002).
72. Henri, S. et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* **167**, 741-8 (2001).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Generation of functional and long-lived CD8⁺ Vβ5LTAOCα^{-/-} memory T cells after immunization with peptide-pulsed DCs. (a) Memory T cell development occurs only when mice are immunized with OVA₂₅₇₋₂₆₄ pulsed DCs. 10⁶ CD8⁺ (CD45.2⁺) cells from Vβ5LTAOCα^{-/-} mice were transferred into B6.SJL hosts (CD45.1⁺). 2 days after transfer, mice were immunized with 5x10⁵ mature DCs loaded with 2 μg/ml of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (DCs OVA) or unpulsed DCs. 5, 30, 60 and 120 days after immunization, a lymph node 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 antibodies. Percentages and total number of OVA specific CD8⁺ T cells in one lymph node 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 memory T cells (d30, 60 and 120). The profile of CD44 and Ly6C was obtained after gating on CD8⁺CD45.2⁺ cells. (b) Phenotype of OVA specific CD8⁺ memory T cells. Vβ5LTAOCα^{-/-} memory CD8⁺ T cells generated as described in (a) were stained with anti-CD127 (IL-7Rα), anti-CD122 (IL-2Rβ), anti-CD62L, anti-Ly6C antibodies or with CCL19-Fc fusion protein to detect CCR7 expression. (c) Recall response of Vβ5LTAOCα^{-/-} CD8⁺ memory T cells. Memory CD8⁺ T cells were re-stimulated *in vivo* by i.v. injection of 5x10⁵ DCs-OVA₂₅₇₋₂₆₄ or unpulsed DCs. 3 days later, splenocytes were stained with anti-CD45.2, anti-CD8 and anti-CD62L antibodies to measure the expansion and activation of OVA-specific T cells. (d) Functionality of Vβ5LTAOCα^{-/-} CD8⁺ memory T cells. IFN-γ production by Vβ5LTAO CD8⁺ memory T cells was assessed by re-stimulating splenocytes *in vitro* for 6 hours with 1μg/ml of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide followed by staining with anti-IFN-γ, anti-CD8 and anti-CD45.2 antibodies.

Figure 2 TCR expression is not required for the long-term survival of OVA specific CD8⁺ memory T lymphocytes. Memory CD8⁺ T cells specific for OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide were generated as described in Fig.1. 40 days after immunization, a lymph node was collected surgically to evaluate the number of OVA-specific memory CD8⁺ T cells (left panels). The same mouse was then

treated or not with 400 $\mu\text{g/ml}$ of tet, in the drinking water, to stop TCR expression completely and the survival of memory T cells was evaluated over time by removal of superficial lymph nodes by surgery. OVA-specific T cells were detected by staining with anti-CD45.2 and anti-CD8 antibodies and analyzed by flow cytometry. Percentages and numbers of OVA specific CD8⁺ memory T cells (CD8⁺CD45.2⁺) present in one lymph node are indicated. The upper panels show the survival of V β 5LTAOC $\alpha^{-/-}$ CD8⁺ memory T cells in the absence of tet treatment while the lower panels show the maintenance of memory T lymphocytes in the absence of TCR expression (tet treated mice). The histogram in the lower right corner of each dot plot shows the expression of Ly6C (gated on CD8⁺CD45.2⁺ cells) by OVA specific memory CD8⁺ T cells. The results for one representative mouse, out of three, that was treated or not with tet are shown.

Figure 3 TCR expression is required for the long-term maintenance of polyclonal CD4⁺ memory T lymphocytes in LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice. (a) Presence of CD4⁺ memory T cells in LTAOC $\alpha^{-/-}$ transgenic mice. Lymph node cells from LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD62L, anti-CD45RB and anti-CD44 antibodies to identify CD4⁺ memory T lymphocytes (CD4⁺, CD44^{high}, CD62L^{low} and CD45RB^{low}) by flow cytometry. (b) Tet treatment abrogates TCR expression in LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice. Lymph node cells from LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice that have been treated or not with tet (400 $\mu\text{g/ml}$ in the drinking water) for at least 14 days were stained with anti-CD3 antibodies to detect TCR expression on CD4⁺ T cells. (c) TCR ablation affects memory CD4⁺ T cell survival in LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice. Lymph nodes from 6-12 weeks old LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice, treated or not with tet, were removed sequentially by surgery over time and stained with memory CD4⁺ T cell markers as described in a. C57BL/6 mice treated with tet were included to control for possible tet effect on the survival of CD4⁺ memory T cells and LTAOC $\alpha^{-/-}$ mice that were not treated with tet were included to control for the normal maintenance of CD4⁺ memory T cells in this transgenic mouse model. The data are presented as a ratio of the total number of CD4⁺ memory cells found in one lymph node following tet treatment relative to the total number of CD4⁺ memory cells before tet treatment (relative number of CD4⁺ memory T cells). A ratio lower than one indicates reduction in the number of memory CD4⁺ T cells recovered.

Figure 4 T cell survival regulates secondary lymphoid organ homeostasis. (a) Concomitant disappearance of T lymphocytes and of other lymph node cell types in $LTAOC\alpha^{-/-}$ mice treated with tet. Superficial lymph nodes from $LTAOC\alpha^{-/-}$ mice were sequentially removed by surgery to follow cell survival after TCR expression shutdown following tet treatment (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the drinking water). The results are illustrated as a mean of the ratios of the number of cells (total, $CD4^{+}$ or non-T cells) present before tet treatment divided by the number of cells recovered after various days of tet treatment (relative cell number) obtained from five independent $LTAOC\alpha^{-/-}$ mice. (b) Loss of T cells following ablation of TCR expression leads to a strong reduction in the number of DCs recovered from the spleen and mesenteric lymph nodes of tet-treated $LTAOC\alpha^{-/-}$ mice. The number of DCs recovered from the spleen or mesenteric lymph nodes is shown for untreated $LTAOC\alpha^{-/-}$ (No TET), $LTAOC\alpha^{-/-}$ treated with tet for 90 days (+TET) and tet-treated wild-type C57BL/6 (B6) mice. DCs were enriched from lymph node and spleen by collagenase treatment followed by enrichment on a Nicodenz gradient (14.7%). Cells recovered from the gradient were then stained with anti-CD11c and anti-MHC class II Abs to identify DCs. (c) B lymphocytes survival requires the presence of T cells. The number of B cells present in the mesenteric lymph nodes of $LTAOC\alpha^{-/-}$ mice treated or not with tet for 60 days was evaluated by staining with anti-B220 and anti-IgM antibodies followed by FACS analysis.

Figure 5 T cell loss modifies lymph node histology and size. Histological analysis of lymph node from $LTAOC\alpha^{-/-}$ mice treated or not with tet (1 mg/ml) for 60 days. Lymph nodes were embedded in parafilm and sections were stained with hematoxylin-eosin. Note the presence of separated B cell area (B cell follicle), the reduced cellular density and the big empty regions in the lymph node from tet treated $LTAOC\alpha^{-/-}$ mice.

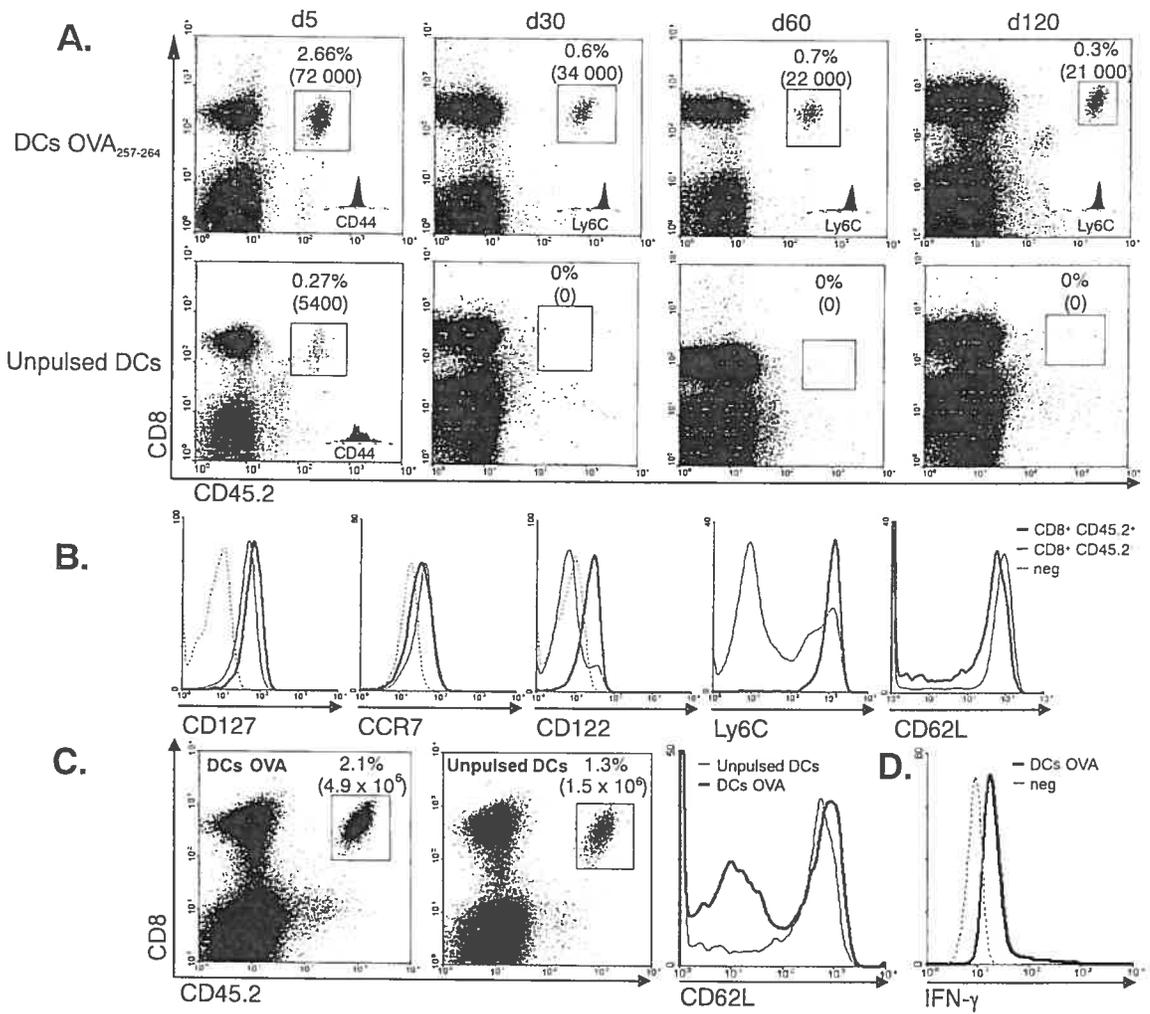


Figure 1

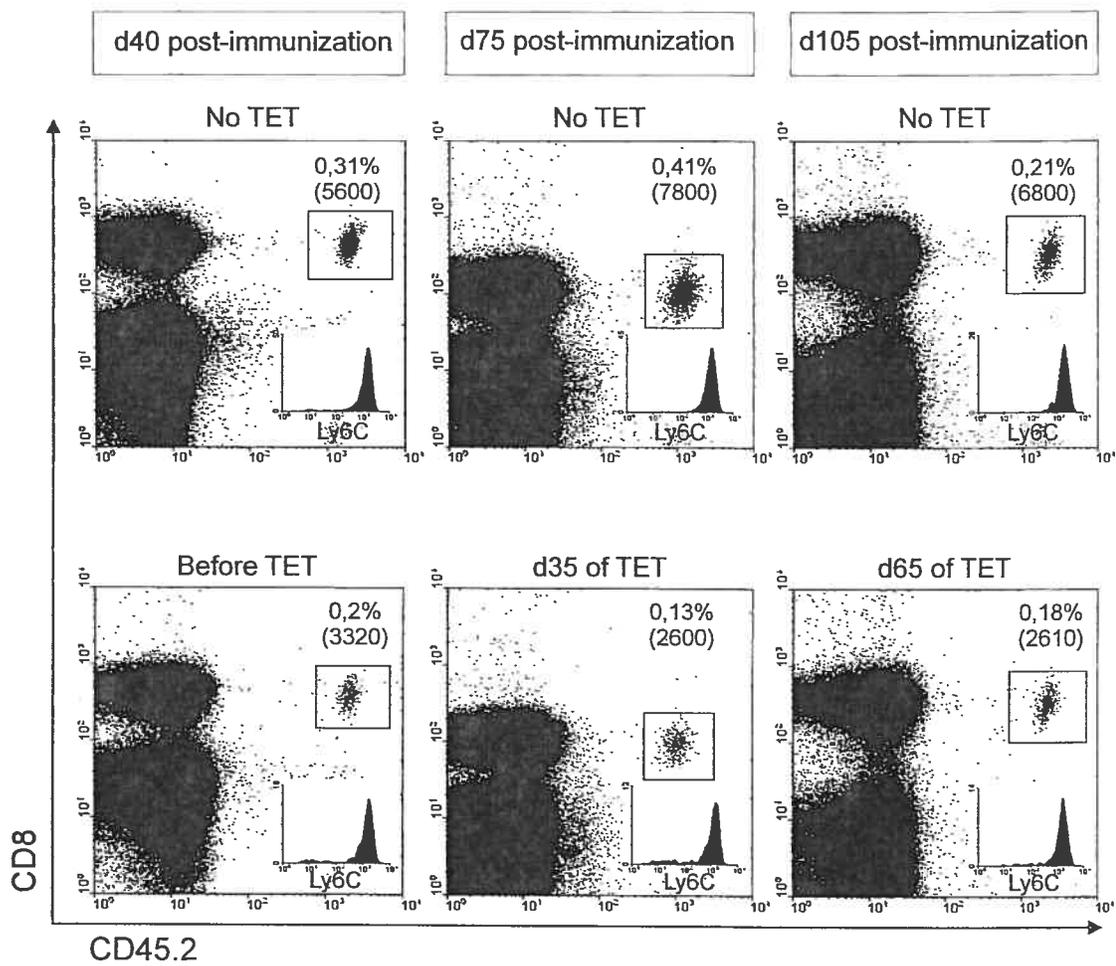


Figure 2

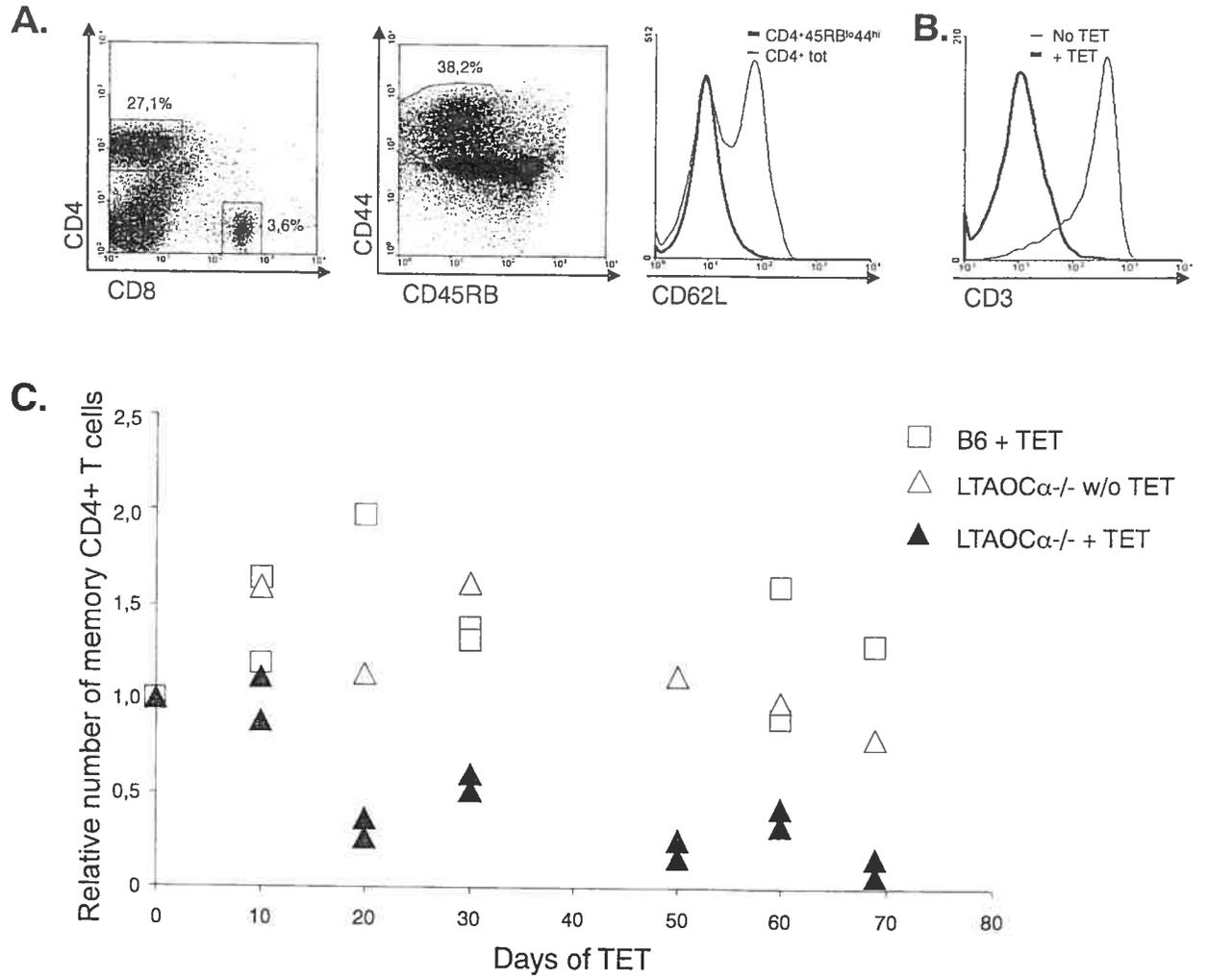


Figure 3

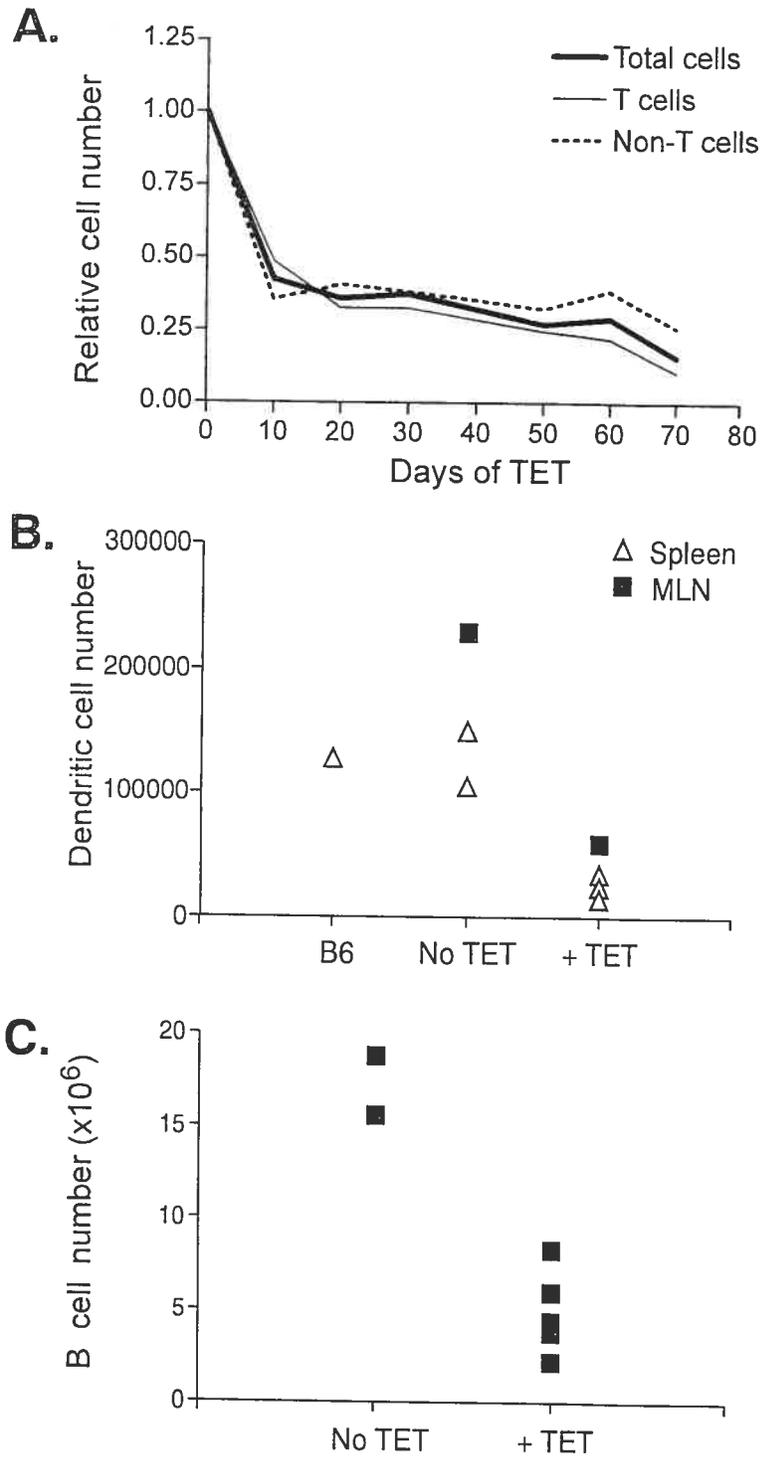


Figure 4

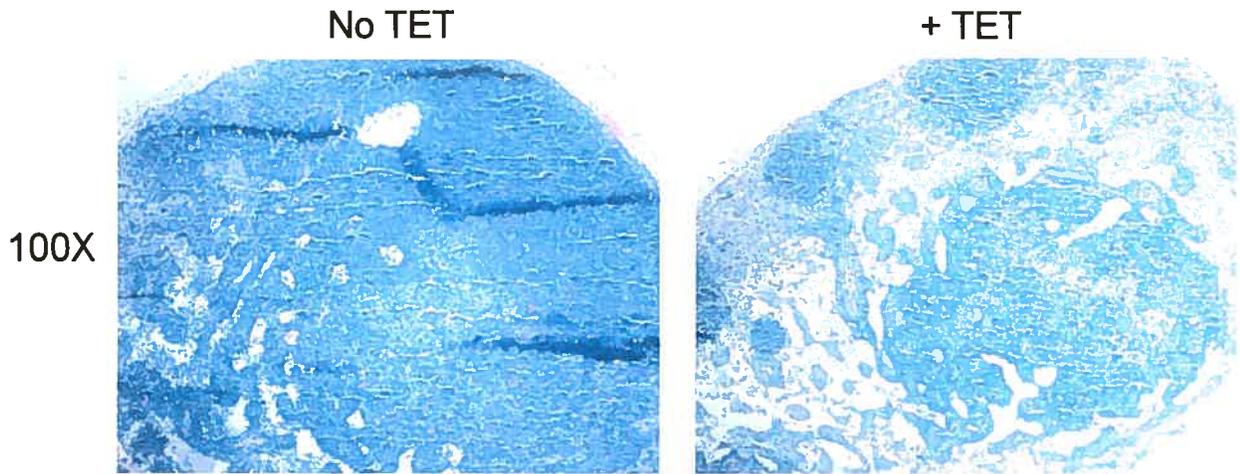


Figure 5

4.DISCUSSION

Notre étude portant sur la survie des lymphocytes T au cours de la réponse immunitaire a permis de tirer les trois conclusions suivantes :

- L'expression du IL-7R n'identifie pas les précurseurs des cellules T mémoires.
- L'expression du RCT n'est pas requise pour la survie des cellules T mémoires CD8⁺ mais l'est pour les Tm CD4⁺.
- La disparition des lymphocytes T bouleverse l'homéostasie des ganglions.

4.1 IDENTIFICATION DES PRECURSEURS DES LYMPHOCYTES T MEMOIRES LORS DE LA PHASE DE CONTRACTION

Nous avons d'abord démontré que l'expression du IL-7R n'est pas un marqueur approprié pour identifier les Te précurseurs des Tm au cours de la phase de contraction. Cette observation est en contradiction avec ce qu'on noté Kaech *et al* lors d'une infection avec le virus LCMV ⁶¹. En effet, ceux-ci ont pu constater qu'au pic de la réponse immunitaire, soit au jour 7 post-immunisation, l'expression du IL-7R était diminuée sur la plupart des Te tandis qu'une petite proportion d'entre eux maintenait un niveau élevé d'expression de ce récepteur. Ces cellules effectrices exprimant l'IL-7R étaient les précurseurs des Tm. Dans notre modèle d'immunisation avec les cellules dendritiques, nous n'avons pas observé cette baisse d'expression du IL-7R sur les Te lors de la phase d'expansion, nous empêchant ainsi d'identifier les précurseurs des Tm à l'aide de ce marqueur.

L'infection avec le virus LCMV est connue pour provoquer une phase de prolifération massive pouvant mener à un état où 50% des lymphocytes T totaux de l'organisme sont spécifiques au virus en question ⁴⁹. Cette activation massive conduit à une grande production d'IL-2 par les lymphocytes T. Nous savons que de fortes concentrations d'IL-2 peuvent réduire l'expression du IL-7R ¹⁶¹. Ces informations nous permettent donc de croire que la diminution d'expression du IL-7R au pic de la réponse immunitaire contre le virus LCMV est le résultat de l'inflammation massive et de l'IL-2 produite. Dans un même ordre d'idées, il a récemment été montré que dans un modèle sans inflammation, toutes les cellules

T effectrices au pic de la réponse immunitaire maintiennent un niveau élevé d'expression du IL-7R⁵⁵. Cela peut signifier que lors de réponses moins inflammatoires, comme par exemple notre modèle d'immunisation avec les cellules dendritiques, l'expression du IL-7R est maintenue sur les cellules T effectrices, empêchant l'identification des précurseurs des T_m à l'aide de ce marqueur. De plus, ce genre de réponse représente beaucoup mieux ce qui se produit dans l'organisme lors d'un processus de vaccination.

Pour vérifier si l'inflammation est bel et bien la raison de la réduction d'expression de l'IL-7R sur les T_e qui entrent en apoptose lors de la phase de contraction, nous pourrions évaluer le niveau d'expression du IL-7R lors d'une réponse créant une inflammation massive. L'immunisation d'une souris dont les lymphocytes T expriment tous un RCT spécifique pour un peptide antigénique donné avec l'Ag en question provoque une réponse inflammatoire importante. L'injection d'OVA₂₅₇₋₂₆₄ directement à nos souris Vβ5LTAOCα^{-/-} pourrait nous permettre de confirmer l'idée que l'inflammation provoque bien la baisse d'expression du IL-7R chez les cellules T effectrices au pic de la réponse immunitaire.

Si l'expression du IL-7R ne permet pas d'identifier les T_e qui survivent lors de la phase de contraction et se différencient en T_m, il faut se tourner vers d'autres hypothèses. Étant donné que l'IL-15 est une cytokine essentielle à la survie des T_m CD8⁺ et que l'IL-2 induit la mort de ceux-ci, nous avons cru que les précurseurs des T_m pouvaient avoir augmenté l'expression de l'IL-15R et diminué l'expression de l'IL-2R afin d'optimiser la réception de signaux de survie lors de la phase de contraction. Toutefois, jusqu'à présent nos expériences ne nous ont pas permis d'établir un lien entre l'expression de ces récepteurs et le développement des T_m CD8⁺ (Lacombe *et al*, non publié). Il faut cependant mentionner qu'encore maintenant, aucun Ac monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-15 n'a été développé, ce qui complique les analyses. Lorsque de meilleurs outils servant à visualiser l'expression du récepteur de l'IL-15 seront disponibles, ces expériences pourront être réalisées à nouveau.

Il se pourrait aussi que l'expression de l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ sur les Te précurseurs des Tm constitue le seul moyen d'identifier les cellules qui échappent à l'apoptose lors de la phase de contraction⁶². Cependant, même si l'on arrive à visualiser ces cellules à l'aide du marqueur de surface CD8 $\alpha\alpha$, les mécanismes qui entourent la sélection de certains Te plutôt que d'autres au pic de la réponse immunitaire sont toujours inconnus.

Nous savons que dans un modèle d'immunisation où il n'y a pas du tout d'inflammation et plus précisément d'IFN- γ , il n'y a pas enclenchement de la phase de contraction⁵⁵. Cela suggère que la présence d'IFN- γ permet l'initiation de la phase de contraction de la réponse immunitaire et par conséquent l'induction de l'apoptose chez la majorité des Te. Le pic des réponses immunitaires générées dans nos deux modèles de souris (2C et V β 5LTAO) est bien suivi d'une phase d'apoptose des Te. Nous croyons donc que notre modèle d'immunisation avec les cellules dendritiques chargées d'un peptide antigénique permet une production d'IFN- γ suffisante pour enclencher la mort des cellules T effectrices. Cette inflammation, qui proviendrait du LPS qui induit la maturation de nos cellules dendritiques *in vitro*, serait par contre trop faible pour provoquer une diminution d'expression du IL-7R sur la plupart des Te au pic de la réponse, tel qu'observé par Kaech et *al.*

Enfin, si l'IFN- γ est bien responsable de l'induction de la contraction, nous pourrions proposer que les précurseurs des Tm échappent à l'apoptose en réduisant leur expression du récepteur de l'IFN- γ ou encore en devenant insensibles aux signaux de cette cytokine. Il s'agit là d'une avenue intéressante qu'il faudra étudier plus en profondeur.

4.2 ÉTUDE DE LA SURVIE DES LYMPHOCYTES T MÉMOIRES

L'étude du rôle du RCT dans la survie des Tm nous a permis de conclure que contrairement aux Tm CD8⁺, les Tm CD4⁺ requièrent l'expression de leur RCT pour survivre à long terme dans l'organisme. Des études précédentes ont démontré que les Tm, autant CD4⁺ que CD8⁺, n'ont pas besoin d'interactions de

leurs RCT avec les molécules du CMH pour survivre. Si nous arrivons à confirmer cette observation avec les Tm CD4⁺ utilisés dans notre étude, ces résultats suggèrent que ces cellules sont capables de maintenir une activité de signalisation basale de leur RCT, et ce en absence d'engagement avec un ligand, qui leur fournirait un signal de survie.

4.2.1 Survie des cellules T mémoires CD8⁺ et CD4⁺

4.2.1.1 Modèles d'études des lymphocytes T mémoires CD4⁺ et CD8⁺

Notre modèle d'étude des lymphocytes T CD8⁺ consiste en un transfert adoptif de cellules d'une souris Vβ5LTAOCα^{-/-} dans des souris B6.SJL et l'immunisation de ces dernières avec des cellules dendritiques matures chargées du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. Ce modèle permet la formation de Tm CD8⁺ dont l'expression du RCT peut être contrôlée par l'administration de TET. Le traitement avec la TET des souris B6.SJL transférées et immunisées provoque l'arrêt d'expression du RCT seulement sur les Tm CD8⁺ spécifiques au peptide de l'ovalbumine injecté. Toutes les autres cellules T de la souris maintiennent l'expression de leur RCT car la TET n'a aucun effet sur celles-ci. Dans ce cas, l'environnement que constitue le ganglion demeure presque intact.

Notre modèle d'étude des Tm CD4⁺, quant à lui, consiste en l'administration de TET directement aux souris LTAOCα^{-/-}. Chez ces souris, tous les lymphocytes T possèdent un RCT composé de la chaîne Vα2 dont l'expression peut être contrôlée par la TET. Donc, le traitement des souris LTAOCα^{-/-} avec la TET provoque un arrêt d'expression du RCT sur tous leurs lymphocytes T.

4.2.1.2 Besoin différentiel d'expression du RCT pour la survie des lymphocytes T mémoires CD4⁺ et CD8⁺

Le maintien de lymphocytes T naïfs et mémoires dans les organes lymphoïdes est d'une importance cruciale, d'une part pour assurer une réponse

efficace contre les nouvelles infections et d'autre part pour protéger l'organisme lors d'infections récurrentes par des pathogènes déjà rencontrés. Différents facteurs qui régulent la survie de ces deux populations de lymphocytes T ont été découverts. Pour survivre, les cellules T naïves $CD4^+$ et $CD8^+$ ont besoin à la fois d'IL-7 et d'interactions de leur RCT avec les complexes CMH-peptides de l'organisme. Pour ce qui est du maintien des cellules T mémoires, nous savons que les $CD8^+$ requièrent la présence d'IL-15 et les $CD4^+$ ont besoin d'IL-7. Pour expliquer la conservation de ces deux populations de lymphocytes T, un modèle de niches homéostatiques, l'une pour les T_n et l'autre pour les T_m , a été proposé. De façon idéale, dans ce modèle, les différents facteurs impliqués dans l'homéostasie des T_n et des T_m ne doivent pas être redondants pour éviter toute compétition entre ces deux populations de cellules T dans le système. Dans nos études, nous avons découvert un facteur de survie additionnel pour les $T_m CD4^+$, soit l'expression de leur RCT. Outre l'expression du RCT, ces cellules ont aussi besoin d'IL-7 qui est une cytokine nécessaire pour la survie des T_n . Nous croyons que les signaux délivrés par le RCT chez les cellules T mémoires $CD4^+$ constituent un facteur homéostatique essentiel permettant d'éviter toute compétition pour l'IL-7 entre les cellules T mémoires $CD4^+$ et les T_n .

Nos études ont aussi montré que les $T_m CD8^+$ ne requéraient pas l'expression de leur RCT pour survivre à long terme. L'IL-15 a déjà été identifiée comme étant nécessaire au maintien de ces cellules. Du point de vue de l'homéostasie des lymphocytes T, ce facteur semble être exclusif à celles-ci. Les $T_m CD8^+$ n'ayant pas besoin de compétitionner avec les autres cellules T pour survivre, cela pourrait expliquer pourquoi l'expression du RCT sur ces cellules n'est pas un facteur essentiel à leur maintien.

La différence obtenue entre les $T_m CD4^+$ et $CD8^+$ concernant la nécessité d'exprimer le RCT pour survivre pourrait aussi provenir de la différence d'expression des CMH-I et -II. Les lymphocytes T, via leur RCT, interagissent avec les molécules du CMH qui présentent des peptides dans l'organisme. Les cellules T $CD4^+$ entrent en contact exclusivement avec le CMH-II qui est exprimé seulement par les cellules présentatrices d'Ag. Les cellules T $CD8^+$, de leur côté, se lient aux molécules du CMH-I qui sont exprimées par presque toutes les

cellules nucléées de l'organisme. Il faut se rappeler que les cellules T mémoires, autant CD4⁺ que CD8⁺, peuvent survivre dans des hôtes déficients en molécules du CMH. Toutefois, les expériences ayant montré que le maintien à long terme des Tm CD4⁺ n'était pas dépendant de contacts constants avec les molécules du CMH-II montrent un taux d'auto-renouvellement ralenti de ces cellules dans des hôtes déficients en CMH-II. De plus, selon Kassiotis *et al*, les Tm CD4⁺ peuvent survivre en absence d'interaction avec les molécules du CMH mais lorsqu'ils en sont dépourvus, ils perdent leur fonctionnalité ¹⁶². Il a effectivement été démontré dans cet article que les Tm CD4⁺ privés de tout contact avec les molécules du CMH-II perdaient leur capacité à proliférer rapidement lors d'un second défi antigénique ainsi que leur aptitude à sécréter de l'IFN- γ lors d'une re-stimulation.

Dans ce cas, il est possible que, contrairement aux croyances scientifiques, les Tm CD4⁺ requièrent des interactions avec les molécules du CMH-II pour survivre. Ainsi, le patron d'expression des molécules du CMH favoriserait une survie préférentielle des Tm CD8⁺ à cause de l'abondance du CMH-I par rapport au CMH-II dans l'organisme. Pour contrer ce problème, les Tm CD8⁺ pourraient donc se passer des interactions avec le CMH-I pour améliorer les conditions de survie des Tm CD4⁺. Cette explication devra cependant être confirmée et serait moins probable s'il s'avérait que les Tm CD4⁺ utilisés dans nos études peuvent survivre dans des hôtes déficients en CMH-II.

Une autre façon d'interpréter nos résultats serait de croire que si les Tm CD4⁺ avaient besoin d'une interaction de leurs RCT avec les molécules du CMH-II, cela créerait encore plus de compétition entre ceux-ci et les lymphocytes T naïfs. En effet, nous savons que ces deux types cellulaires ont aussi besoin d'IL-7 pour survivre. Nous pourrions proposer que les Tm CD4⁺ aient pu développer une indépendance aux contacts de leurs RCT avec les molécules du CMH afin d'assurer leur maintien plus facilement.

Enfin, il est possible que l'arrêt d'expression du RCT chez les souris LTAOC $\alpha^{-/-}$ abolisse la réception des signaux de l'IL-7 chez les Tm CD4⁺, ce qui provoquerait leur mort. En effet, nous savons que l'IL-7 est absolument requise pour la survie à long terme des Tm CD4⁺. De plus, les résultats de Seddon *et al*

montrent clairement que le maintien des Tm CD4⁺ dépend à la fois de l'IL-7 et des signaux fournis par les kinases lck et fyn¹⁴¹. L'arrêt d'expression du RCT pourrait donc induire la mort des Tm CD4⁺ en causant une réduction de l'accès de ces cellules à l'IL-7 qui est indispensable pour leur survie. Il sera alors intéressant de vérifier l'expression du IL-7R à la surface des Tm CD4⁺ dépourvus de RCT en comparaison avec des Tm CD4⁺ l'exprimant toujours.

Bref, plusieurs idées peuvent expliquer ce besoin différentiel ente les Tm CD4⁺ et CD8⁺ d'exprimer leurs RCT pour survivre. La discussion portera maintenant sur l'effet obtenu suite à l'arrêt d'expression du RCT sur chacune de ces populations cellulaires ainsi que sur les perspectives concernant cette étude.

4.2.2 *Survie des lymphocytes T mémoires CD8⁺ lors d'un arrêt d'expression du RCT*

Maintenant que nous savons que les Tm CD8⁺ spécifiques au peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ survivent sans RCT, il sera intéressant de vérifier si ces cellules demeurent tout de même fonctionnelles. Par exemple, nous pourrons étudier leur capacité à produire rapidement de l'IFN- γ lors d'une re-stimulation. Étant donné que les cellules T mémoires CD8⁺ sans RCT ne pourront pas reconnaître le peptide antigénique pour lequel elles sont spécifiques, nous pourrons les stimuler avec un agent comme la PMA-ionomycine qui active les lymphocytes T sans passer par la voie de reconnaissance du RCT. De plus, sachant que les Tm présentent un taux d'auto-renouvellement rapide comparativement aux cellules naïves, nous pourrons aussi étudier *in vivo*, par incorporation de BrdU, le niveau de prolifération de ces cellules T mémoires CD8⁺ dépourvues de RCT. En effet, il se peut que les Tm CD8⁺ dont l'expression du RCT a été arrêtée aient augmenté encore plus leur taux d'auto-renouvellement. La durée de vie de chaque cellule T mémoire CD8⁺ dépourvue de RCT serait alors diminuée, mais la population de cellules mémoires serait maintenue grâce à des divisions plus fréquentes.

4.2.3 Mort des lymphocytes T mémoires $CD4^+$ lors d'un arrêt d'expression du RCT

Puisqu'il a été montré auparavant que les cellules T naïves ont constamment besoin d'une interaction de leur RCT avec les complexes CMH-peptides de l'organisme pour survivre, nous n'avons pas été surpris d'observer la disparition des Tn dans notre modèle. Cependant, nous avons aussi pu constater dans nos expériences que, comme le stipulait notre hypothèse, les Tm $CD4^+$ mouraient lors de l'arrêt d'expression du RCT. Il sera maintenant intéressant de vérifier si le résultat demeure le même dans un environnement où seuls les RCT des Tm $CD4^+$ peuvent être modulés à l'aide de TET. Pour ce faire, nous pourrions transférer des Tm $CD4^+$ provenant d'une souris LTAOC $\alpha^{-/-}$ dans des souris B6.SJL et traiter les receveuses à la TET. Nous nous assurerons ainsi que, même quand l'intégrité de l'architecture des organes lymphoïdes est maintenue, l'ablation du RCT provoque bien la perte des Tm $CD4^+$.

En perspective, nous devons étudier la nature des signaux transmis de façon constitutive par le RCT des Tm $CD4^+$. Ces signaux devront être délivrés de façon intrinsèque, sans interaction avec le CMH ou tout autre ligand, puisqu'il a été montré que les Tm $CD4^+$ peuvent être maintenus en vie en absence de CMH-II⁵³. Cette hypothèse d'un signal constitutif du RCT est en accord avec les travaux de Seddon *et al* qui ont montré une survie réduite des cellules $CD4^+CD44^{hi}$ en absence des kinases *lck* et *fyn*¹⁴¹.

La signalisation basale maintenue chez les Tm $CD4^+$ pourrait être semblable à ce qui se produit chez les cellules pré-T et pré-B. En effet, il a été montré dans ces deux types cellulaires que les récepteurs pré-T et pré-B sont relocalisés au niveau des radeaux lipidiques, des domaines de la membrane plasmique enrichis en lipides et en molécules de signalisation¹⁵⁰⁻¹⁵². Cette ségrégation des récepteurs au niveau des domaines rafts permet l'envoi de signaux de survie et ce, indépendamment d'un engagement avec un ligand. La cholérotoxine est une molécule connue pour être ségrégée au niveau des rafts lipidiques. Il sera donc possible, par microscopie confocale, de vérifier la co-localisation de cette toxine avec le RCT chez des cellules T mémoires $CD4^+$.

Il est aussi possible que les signaux constitutifs délivrés à l'intérieur des cellules T mémoires $CD4^+$ soient le résultat des réarrangements de la machinerie de signalisation intracellulaire mentionnés plus tôt, comme une re-localisation de la kinase *lck* et de la phosphatase *CD45* à proximité du RCT. De plus, il serait intéressant de vérifier si les Tm $CD4^+$, à leur état basal, présentent une plus grande phosphorylation de certaines molécules de signalisation comme les membres de la famille des MAP kinases ou l'adaptateur *LAT* qui joue un rôle majeur dans la transmission des signaux provenant du RCT. Toutes ces analyses biochimiques nous permettront de comprendre comment peuvent être générés, s'il y a lieu, ces signaux intrinsèques responsables de la survie des cellules T mémoires $CD4^+$.

4.3 PERTURBATION DE L'HOMÉOSTASIE GANGLIONNAIRE LORS DE LA PERTE DES LYMPHOCYTES T $CD4^+$

Comme il a été mentionné plus tôt, le traitement des souris *LTAOC $\alpha^{-/-}$* à la TET provoque l'arrêt d'expression du RCT non seulement sur les cellules T mémoires de la souris mais aussi sur les naïves. Ces dernières, qui ont besoin à la fois d'*IL-7* et du contact de leur RCT avec les molécules du CMH pour survivre⁹⁹⁻¹¹³, meurent suite à l'ablation du RCT. La disparition des Tn suite à l'ablation du RCT réduit de façon importante, soit d'environ 85%, le pool de lymphocytes T qui peuplent les ganglions des souris *LTAOC $\alpha^{-/-}$* . Normalement, cela provoquerait une augmentation des concentrations d'*IL-7* disponibles pour les Tm $CD4^+$. Dans ce cas, si l'*IL-7* était le seul facteur impliqué dans le maintien des Tm $CD4^+$, de telles conditions favorisant leur survie ne devraient pas provoquer leur disparition, ce qui est tout de même le cas.

Cependant, nous avons observé que la disparition des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs et mémoires suite à l'ablation du RCT chez la souris *LTAOC $\alpha^{-/-}$* s'accompagne d'une perte concomitante des lymphocytes B et des cellules dendritiques ainsi que d'une perturbation de l'architecture ganglionnaire. La mort des Tm $CD4^+$ dépourvus de RCT pourrait survenir suite au bouleversement de l'homéostasie des ganglions qui réduirait l'accès de ces cellules à leurs facteurs de survie. Par exemple, nous savons que l'*IL-7* est produite par les cellules stromales

des organes lymphoïdes ainsi que par les cellules dendritiques^{24,25}. Il est possible que la disparition de ces cellules dans notre modèle diminue les concentrations d'IL-7 disponible dans les ganglions, ce qui provoquerait la mort des Tm CD4⁺. Nous devons donc vérifier si la disparition des cellules dendritiques et des cellules B ainsi que le bouleversement de l'architecture ganglionnaire constitue la cause ou la conséquence de la perte des Tm CD4⁺. Encore une fois, le transfert de Tm CD4⁺ isolés d'une souris LTAOC $\alpha^{-/-}$ dans une souris normale suivi du traitement des souris avec la TET permettra de voir, dans un modèle où l'homéostasie ganglionnaire est maintenue, si l'expression du RCT est bien requise pour la survie des cellules T mémoires CD4⁺.

Nous favorisons l'hypothèse que les Tm CD4⁺ ont vraiment besoin du RCT pour survivre et que leur présence permet le maintien de l'homéostasie des ganglions pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il a été montré récemment que la présence des lymphocytes T CD4⁺ était absolument requise pour la survie des Tm CD8⁺¹⁴⁶. Nous pourrions alors supposer que les lymphocytes T CD4⁺ peuvent transmettre des signaux de survie aux différents types cellulaires qui composent les organes lymphoïdes. Dans un même ordre d'idées, nous savons que chez des patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), on peut observer, suite à la déplétion en lymphocytes T CD4⁺ que cause l'infection, une détérioration de l'architecture des ganglions accompagnée d'une perturbation du réseau de cellules dendritiques folliculaires¹⁶³.

Pour vérifier si la disparition des cellules T CD4⁺ dans notre modèle de souris LTAOC $\alpha^{-/-}$ traitées avec la TET est bien à l'origine du bouleversement du microenvironnement des ganglions, il sera utile de procéder à la déplétion de ces cellules dans une souris normale à laquelle nous injecterons un Ac anti-CD4⁺ bloquant. Il sera aussi intéressant d'étudier l'architecture ganglionnaire chez des souris dépourvues de cellules T CD4⁺ dès la naissance comme par exemple, les souris déficientes en CD4⁺ ou en molécules de classe II du CMH.

Une autre évidence suggérant un rôle pour les lymphocytes T dans le maintien des autres populations cellulaires qui composent les organes lymphoïdes secondaires provient d'une étude chez des souris déficientes en lymphocytes T,

soit les souris RAG^{-/-} et SCID³⁸. Chez ces souris, il a été montré que la diminution des nombres de cellules dendritiques présentes dans les organes lymphoïdes ainsi que la perte de fonctionnalité de celles-ci pouvaient être rétablies suite à l'injection de lymphocytes T. Dans notre modèle LTAOCα^{-/-}, l'arrêt d'expression du RCT suivi de la perte des cellules T CD4⁺ illustre aussi le même genre de situation, c'est-à-dire le déclin du nombre de cellules dendritiques.

Toutes ces observations suggèrent que les lymphocytes T produisent un facteur capable de promouvoir le maintien des différents types cellulaires présents dans les organes lymphoïdes secondaires. Les membres de la famille des TNF/TNFR, grandement impliqués dans la survie cellulaire et l'organogénèse de la rate et des ganglions, pourraient être des molécules ayant un rôle à jouer dans l'homéostasie de ces organes. Parmi les membres de la famille des TNF/TNFR, les couples récepteur/ligand LTβR/Lymphotoxines (LTα₁β₂, LT) et RANK/RANKL constituent sans doute les meilleurs candidats puisque leurs ligands sont exprimés par les lymphocytes^{2,17,164} et leurs récepteurs sont présents à la surface des cellules stromales et des cellules dendritiques^{165,166}. Étant donné le patron d'expression de ces molécules, nous croyons que des interactions de type ligand-récepteur entre les lymphocytes et les cellules dendritiques et stromales pourraient jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie au niveau des ganglions et de la rate. En ce sens, il a été démontré que dans le thymus adulte, des contacts entre les lymphocytes T et les cellules épithéliales thymiques, fournis par les molécules LT/LTβR, sont nécessaires à la conservation des cellules épithéliales médullaires¹⁶⁷. Effectivement, on observe chez des souris déficientes pour le LTβR ou son ligand LTα₁β₂ un défaut dans le développement des cellules épithéliales médullaires thymiques. De plus, l'expression membranaire de la lymphotoxine LTα₁β₂ est absolument requise pour permettre la présence de cellules dendritiques au niveau des organes lymphoïdes¹².

En ce qui concerne RANK/RANKL, nous savons que les interactions entre RANKL, exprimé par les cellules T activées, et RANK, exprimé à la surface des cellules dendritiques, peut permettre la survie de ces dernières via une augmentation des niveaux de Bcl-XL intracellulaire et l'induction de l'expression

de la molécule de co-stimulation CD40^{17,164,168}. En effet, le traitement de cellules dendritiques matures chargées avec un Ag *in vitro* avec du RANK-L soluble accroît le nombre et la durée de vie de ces cellules *in vivo*. En plus de son rôle sur les cellules dendritiques, il a été démontré que des souris déficientes en RANK ou en RANKL ont des nombres inférieurs de cellules B matures autant dans la rate que dans les ganglions. Ces effets de RANKL sur les populations cellulaires des organes lymphoïdes secondaires pourraient expliquer ce qui se produit dans notre modèle de souris suite à la mort des lymphocytes T.

Les lymphocytes T produisent aussi le BAFF, un facteur essentiel à la survie des lymphocytes B immatures et qui induit leur maturation *in vitro*¹⁶⁹. BAFF fait aussi partie de la famille des TNF/TNFR. La disparition des lymphocytes T suite à l'arrêt d'expression du RCT dans notre modèle d'étude provoque sans doute une réduction de la concentration de BAFF disponible dans les organes lymphoïdes. L'arrêt de production de BAFF suivant la mort des lymphocytes T pourrait être la cause de la diminution de la taille des follicules B observée chez nos souris LTAOC $\alpha^{-/-}$ traitées à la TET.

En perspective, il sera intéressant de vérifier si les membres de la famille des TNF/TNFR mentionnés ci haut sont responsables du maintien de l'homéostasie des populations cellulaires qui composent les organes lymphoïdes secondaires. Pour ce faire, nous procéderons au blocage des interactions entre les différents facteurs produits par les lymphocytes T et leurs récepteurs en injectant des récepteurs solubles sous forme de protéines de fusion (LT β R-Fc, RANK-Fc, etc.) à des souris normales. Si ces interactions sont bien responsables de la survie des différents types cellulaires des ganglions, les ganglions des souris normales devraient subir le même sort que ceux des souris LTAOC $\alpha^{-/-}$ dépourvues de RCT. Parallèlement, il sera intéressant d'administrer les ligands de ces récepteurs aux souris LTAOC $\alpha^{-/-}$ dépourvues de RCT afin de voir si on arrive ainsi à rétablir l'architecture de leurs ganglions.

Enfin, toutes ces observations nous ont permis de développer le modèle récapitulatif suivant (fig. 9):

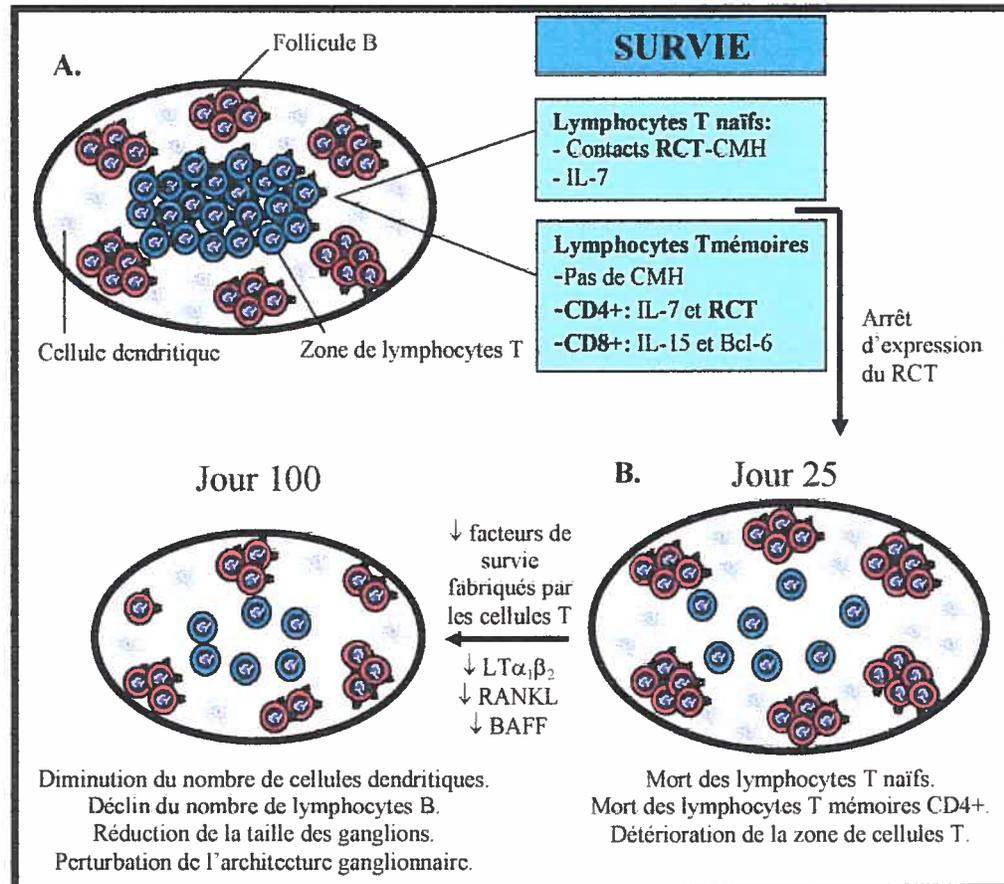


Figure 9 : *Modèle récapitulatif proposé.* A. La survie des différentes populations de lymphocytes T est régulée par différents facteurs. Nos travaux ont démontré que l'expression du RCT est nécessaire non seulement pour le maintien des lymphocytes T naifs CD4⁺ et CD8⁺ mais aussi pour les cellules T mémoires CD4⁺. B. L'arrêt d'expression du RCT provoque donc la disparition des lymphocytes T naifs et CD4⁺ mémoires au niveau des ganglions lymphatiques, ce qui cause par conséquent une détérioration de la zone de cellules T. C. La mort des lymphocytes T est accompagnée d'une perte concomitante des cellules dendritiques et des lymphocytes B ainsi que d'une réduction de la taille des ganglions. Notre modèle stipule que le déclin du nombre de lymphocytes T suivant l'ablation du RCT provoque une diminution de facteurs produits par ces cellules qui seraient essentiels au maintien de l'homéostasie des organes lymphoïdes secondaires.

4.4 CONCLUSION

Cette étude a permis de découvrir un nouveau facteur essentiel à la survie à long terme des lymphocytes T mémoires $CD4^+$, soit l'expression du RCT. L'arrêt d'expression du RCT sur les Tm $CD4^+$ de notre modèle a effectivement causé la mort de ceux-ci. La demi-vie des Tm $CD4^+$ dépourvus de RCT a été estimée à environ 25-30 jours. De plus, la perturbation de l'architecture et de la composition cellulaire des organes lymphoïdes suivant la disparition des cellules T $CD4^+$ a révélé un tout nouveau rôle pour les lymphocytes T dans le maintien de l'homéostasie des organes lymphoïdes. Cette découverte permettra sans doute d'élucider plusieurs situations dans lesquelles les nombres de lymphocytes T présents dans l'organisme sont réduits. Par exemple, nous savons que le vieillissement s'accompagne généralement d'une atrophie importante du thymus, ce qui diminue l'apport en nouveaux lymphocytes T chez les personnes âgées, les rendant plus susceptibles aux infections. De plus, il est connu que chez les patients atteints du VIH, un virus qui s'attaque aux lymphocytes T $CD4^+$, le déclin des nombres de lymphocytes s'associe à une détérioration des tissus lymphoïdes encore inexpliquée.

Enfin, la compréhension des mécanismes qui permettent la formation et la survie des Tm permettra le développement de nouveaux vaccins plus efficaces. De plus, l'identification du rôle crucial des lymphocytes T dans le maintien du microenvironnement que constituent les organes lymphoïdes aidera à améliorer les traitements des patients atteints d'une immunodéficience ainsi qu'à conserver un système immunitaire efficace tout au long de la vie.

RÉFÉRENCES

1. Browning, J.L. et al. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* **72**, 847-56 (1993).
2. Browning, J.L. et al. Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J Immunol* **159**, 3288-98 (1997).
3. Crowe, P.D. et al. A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science* **264**, 707-10 (1994).
4. Ware, C.F., VanArsdale, T.L., Crowe, P.D. & Browning, J.L. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr Top Microbiol Immunol* **198**, 175-218 (1995).
5. Banks, T.A. et al. Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol* **155**, 1685-93 (1995).
6. De Togni, P. et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* **264**, 703-7 (1994).
7. Futterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M.H. & Pfeffer, K. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* **9**, 59-70 (1998).
8. Koni, P.A. et al. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* **6**, 491-500 (1997).
9. Rennert, P.D., Browning, J.L., Mebius, R., Mackay, F. & Hochman, P.S. Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. *J Exp Med* **184**, 1999-2006 (1996).
10. Rennert, P.D., James, D., Mackay, F., Browning, J.L. & Hochman, P.S. Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. *Immunity* **9**, 71-9 (1998).
11. Ngo, V.N. et al. Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J Exp Med* **189**, 403-12 (1999).
12. Wu, Q. et al. The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues. *J Exp Med* **190**, 629-38 (1999).
13. Muller, G. & Lipp, M. Concerted action of the chemokine and lymphotoxin system in secondary lymphoid-organ development. *Curr Opin Immunol* **15**, 217-24 (2003).
14. Dougall, W.C. et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* **13**, 2412-24 (1999).
15. Fata, J.E. et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**, 41-50 (2000).
16. Williamson, E., Billsborough, J.M. & Viney, J.L. Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF-kappa B (RANK)/RANK ligand interactions: impact on tolerance induction. *J Immunol* **169**, 3606-12 (2002).
17. Wong, B.R. et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly

- expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* **186**, 2075-80 (1997).
18. Green, E.A. & Flavell, R.A. TRANCE-RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation. *J Exp Med* **189**, 1017-20 (1999).
 19. Van Vliet, E., Melis, M., Foidart, J.M. & Van Ewijk, W. Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* **34**, 883-90 (1986).
 20. Fu, Y.X. & Chaplin, D.D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* **17**, 399-433 (1999).
 21. Delgado, E. et al. Mature dendritic cells respond to SDF-1, but not to several beta-chemokines. *Immunobiology* **198**, 490-500 (1998).
 22. Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G. & Cyster, J.G. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12694-9 (2000).
 23. Legler, D.F. et al. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* **187**, 655-60 (1998).
 24. Lupton, S.D. et al. Characterization of the human and murine IL-7 genes. *J Immunol* **144**, 3592-601 (1990).
 25. Namen, A.E. et al. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* **333**, 571-3 (1988).
 26. Di Sciullo, G., Donahue, T., Schachner, M. & Bogen, S.A. L1 antibodies block lymph node fibroblastic reticular matrix remodeling in vivo. *J Exp Med* **187**, 1953-63 (1998).
 27. Paul, W.E. Chapter 15: Dendritic cells. in *Fundamental immunology* (ed. WILKINS, L.W.) (Philadelphia, 2003).
 28. Steinman, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-96 (1991).
 29. Inaba, K. et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* **180**, 1849-60 (1994).
 30. Cyster, J.G. et al. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* **176**, 181-93 (2000).
 31. Barrington, R.A., Pozdnyakova, O., Zafari, M.R., Benjamin, C.D. & Carroll, M.C. B lymphocyte memory: role of stromal cell complement and FcgammaRIIB receptors. *J Exp Med* **196**, 1189-99 (2002).
 32. Tew, J.G. et al. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev* **156**, 39-52 (1997).
 33. Crivellato, E., Vacca, A. & Ribatti, D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol* **25**, 210-7 (2004).
 34. Ford, W.L. & Gowans, J.L. The traffic of lymphocytes. *Semin Hematol* **6**, 67-83 (1969).
 35. Ngo, V.N., Tang, H.L. & Cyster, J.G. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med* **188**, 181-91 (1998).

36. Gunn, M.D. et al. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 258-63 (1998).
37. Bousso, P. & Robey, E. Dynamics of CD8⁺ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol* **4**, 579-85 (2003).
38. Shreedhar, V. et al. Dendritic cells require T cells for functional maturation in vivo. *Immunity* **11**, 625-36 (1999).
39. Goldsby, R.e.a. Chapter 9: T cell receptor. in *Immunology, 4th edition* (ed. Company, W.H.F.a.) (New York, 2000).
40. Paul, W.E. Chapter 11: T-lymphocyte activation. in *Fundamental immunology* (ed. WILKINS, L.W.) (Philadelphia, 2003).
41. Germain, R.N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**, 287-99 (1994).
42. Slavik, J.M., Hutchcroft, J.E. & Bierer, B.E. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res* **19**, 1-24 (1999).
43. Borriello, F. et al. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* **6**, 303-13 (1997).
44. Frauwirth, K.A. & Thompson, C.B. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* **109**, 295-9 (2002).
45. Shahinian, A. et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* **261**, 609-12 (1993).
46. Qian, D., Griswold-Prenner, I., Rosner, M.R. & Fitch, F.W. Multiple components of the T cell antigen receptor complex become tyrosine-phosphorylated upon activation. *J Biol Chem* **268**, 4488-93 (1993).
47. Baniyash, M., Garcia-Morales, P., Luong, E., Samelson, L.E. & Klausner, R.D. The T cell antigen receptor zeta chain is tyrosine phosphorylated upon activation. *J Biol Chem* **263**, 18225-30 (1988).
48. Blattman, J.N. et al. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 657-64 (2002).
49. Murali-Krishna, K. et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**, 177-87 (1998).
50. van Stipdonk, M.J. et al. Dynamic programming of CD8⁺ T lymphocyte responses. *Nat Immunol* **4**, 361-5 (2003).
51. Kieper, W.C. et al. Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8⁺ T cells. *J Exp Med* **195**, 1533-9 (2002).
52. Goldrath, A.W. et al. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med* **195**, 1515-22 (2002).
53. Swain, S.L., Hu, H. & Huston, G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* **286**, 1381-3 (1999).
54. Badovinac, V.P., Porter, B.B. & Harty, J.T. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* **3**, 619-26 (2002).
55. Badovinac, V.P., Porter, B.B. & Harty, J.T. CD8⁺ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* **5**, 809-17 (2004).

56. Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* **111**, 837-51 (2002).
57. Kaech, S.M. & Ahmed, R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* **2**, 415-22 (2001).
58. Opferman, J.T., Ober, B.T. & Ashton-Rickardt, P.G. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* **283**, 1745-8 (1999).
59. van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E. & Schoenberger, S.P. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* **2**, 423-9 (2001).
60. Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C. & Lefrancois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* **1**, 426-32 (2000).
61. Kaech, S.M. et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**, 1191-8 (2003).
62. Madakamutil, L.T. et al. CD8alpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science* **304**, 590-3 (2004).
63. Liu, N. et al. Serine protease inhibitor 2A is a protective factor for memory T cell development. *Nat Immunol* **5**, 919-26 (2004).
64. Bourgeois, C., Veiga-Fernandes, H., Joret, A.M., Rocha, B. & Tanchot, C. CD8 lethargy in the absence of CD4 help. *Eur J Immunol* **32**, 2199-207 (2002).
65. Bourgeois, C., Rocha, B. & Tanchot, C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* **297**, 2060-3 (2002).
66. Janssen, E.M. et al. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852-6 (2003).
67. Shedlock, D.J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337-9 (2003).
68. Sun, J.C. & Bevan, M.J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**, 339-42 (2003).
69. Thomsen, A.R., Nansen, A., Christensen, J.P., Andreasen, S.O. & Marker, O. CD40 ligand is pivotal to efficient control of virus replication in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* **161**, 4583-90 (1998).
70. Borrow, P. et al. CD40 ligand-mediated interactions are involved in the generation of memory CD8(+) cytotoxic T lymphocytes (CTL) but are not required for the maintenance of CTL memory following virus infection. *J Virol* **72**, 7440-9 (1998).
71. Lu, Z. et al. CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **191**, 541-50 (2000).
72. Sun, J.C. & Bevan, M.J. Cutting edge: long-lived CD8 memory and protective immunity in the absence of CD40 expression on CD8 T cells. *J Immunol* **172**, 3385-9 (2004).
73. Montfort, M.J., Bouwer, H.G., Wagner, C.R. & Hinrichs, D.J. The development of functional CD8 T cell memory after *Listeria*

- monocytogenes infection is not dependent on CD40. *J Immunol* **173**, 4084-90 (2004).
74. Cho, B.K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H.N. & Chen, J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2976-81 (1999).
 75. Iezzi, G., Scheidegger, D. & Lanzavecchia, A. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* **193**, 987-93 (2001).
 76. Rogers, P.R., Dubey, C. & Swain, S.L. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* **164**, 2338-46 (2000).
 77. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-12 (1999).
 78. Weninger, W., Crowley, M.A., Manjunath, N. & von Andrian, U.H. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J Exp Med* **194**, 953-66 (2001).
 79. Mackay, C.R., Marston, W.L. & Dudler, L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* **171**, 801-17 (1990).
 80. Kedl, R.M. & Mescher, M.F. Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response. *J Immunol* **161**, 674-83 (1998).
 81. Paul, W.E. Chapter 28: Immunological memory. in *Fundamental immunology* (ed. WILKINS, L.W.) (Philadelphia, 2003).
 82. Lau, L.L., Jamieson, B.D., Somasundaram, T. & Ahmed, R. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* **369**, 648-52 (1994).
 83. Murali-Krishna, K. et al. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* **286**, 1377-81 (1999).
 84. Andersen, P. & Smedegaard, B. CD4(+) T-cell subsets that mediate immunological memory to Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Infect Immun* **68**, 621-9 (2000).
 85. Thomas, M.L. The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* **7**, 339-69 (1989).
 86. Boursalian, T.E. & Bottomly, K. Stability of naive and memory phenotypes on resting CD4 T cells in vivo. *J Immunol* **162**, 9-16 (1999).
 87. Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F. & Sprent, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* **8**, 591-9 (1998).
 88. Tough, D.F. & Sprent, J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* **179**, 1127-35 (1994).
 89. McCune, J.M. et al. Factors influencing T-cell turnover in HIV-1-seropositive patients. *J Clin Invest* **105**, R1-8 (2000).
 90. Champagne, P. et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* **410**, 106-11 (2001).
 91. Campbell, J.J. et al. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* **166**, 877-84 (2001).
 92. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L. & Lefrancois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**, 2413-7 (2001).

93. Reinhardt, R.L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. & Jenkins, M.K. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**, 101-5 (2001).
94. Potsch, C., Vohringer, D. & Pircher, H. Distinct migration patterns of naive and effector CD8 T cells in the spleen: correlation with CCR7 receptor expression and chemokine reactivity. *Eur J Immunol* **29**, 3562-70 (1999).
95. Tanchot, C., Rosado, M.M., Agenes, F., Freitas, A.A. & Rocha, B. Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol* **9**, 331-7 (1997).
96. Sprent, J. & Basten, A. Circulating T and B lymphocytes of the mouse. II. Lifespan. *Cell Immunol* **7**, 40-59 (1973).
97. Miller, J.F. & Mitchell, G.F. Thymus and antigen-reactive cells. *Transplant Rev* **1**, 3-42 (1969).
98. Howard, J.C. The life-span and recirculation of marrow-derived small lymphocytes from the rat thoracic duct. *J Exp Med* **135**, 185-99 (1972).
99. Witherden, D. et al. Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* **191**, 355-64 (2000).
100. Rooke, R., Waltzinger, C., Benoist, C. & Mathis, D. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* **7**, 123-34 (1997).
101. Takeda, S., Rodewald, H.R., Arakawa, H., Bluethmann, H. & Shimizu, T. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* **5**, 217-28 (1996).
102. Clarke, S.R. & Rudensky, A.Y. Survival and homeostatic proliferation of naive peripheral CD4+ T cells in the absence of self peptide:MHC complexes. *J Immunol* **165**, 2458-64 (2000).
103. Boursalian, T.E. & Bottomly, K. Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J Immunol* **162**, 3795-801 (1999).
104. Brocker, T. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* **186**, 1223-32 (1997).
105. Kirberg, J., Berns, A. & von Boehmer, H. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* **186**, 1269-75 (1997).
106. Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Perarnau, B., Freitas, A.A. & Rocha, B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* **276**, 2057-62 (1997).
107. Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A. & Rajewsky, K. How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8744-9 (2001).
108. Labrecque, N. et al. How much TCR does a T cell need? *Immunity* **15**, 71-82 (2001).
109. Seddon, B. & Zamoyska, R. TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells. *J Immunol* **169**, 2997-3005 (2002).

110. Vivien, L., Benoist, C. & Mathis, D. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* **13**, 763-8 (2001).
111. Tan, J.T. et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 8732-7 (2001).
112. Rathmell, J.C., Farkash, E.A., Gao, W. & Thompson, C.B. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* **167**, 6869-76 (2001).
113. Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X. & Lefrancois, L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* **168**, 4827-31 (2002).
114. von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M. & Murray, R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* **7**, 147-54 (1997).
115. Khaled, A.R., Kim, K., Hofmeister, R., Muegge, K. & Durum, S.K. Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 14476-81 (1999).
116. Kneitz, B., Herrmann, T., Yonehara, S. & Schimpl, A. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* **25**, 2572-7 (1995).
117. Badovinac, V.P., Tvinnereim, A.R. & Harty, J.T. Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* **290**, 1354-8 (2000).
118. Chu, C.Q., Wittmer, S. & Dalton, D.K. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **192**, 123-8 (2000).
119. Dalton, D.K., Haynes, L., Chu, C.Q., Swain, S.L. & Wittmer, S. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med* **192**, 117-22 (2000).
120. Van Parijs, L. et al. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* **11**, 281-8 (1999).
121. Waldmann, T.A., Dubois, S. & Tagaya, Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* **14**, 105-10 (2001).
122. Waterhouse, P. et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtlA-4. *Science* **270**, 985-8 (1995).
123. Tivol, E.A. et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541-7 (1995).
124. Van Parijs, L. et al. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J Immunol* **158**, 3738-45 (1997).
125. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-65 (1997).
126. Suzuki, H. et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* **268**, 1472-6 (1995).
127. Lucas, P.J., Kim, S.J., Melby, S.J. & Gress, R.E. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative

- transforming growth factor beta II receptor. *J Exp Med* **191**, 1187-96 (2000).
128. Esser, M.T. et al. Memory T cells and vaccines. *Vaccine* **21**, 419-30 (2003).
 129. Demkowicz, W.E., Jr., Littaua, R.A., Wang, J. & Ennis, F.A. Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. *J Virol* **70**, 2627-31 (1996).
 130. Hilleman, M.R. Overview of the pathogenesis, prophylaxis and therapeutics of viral hepatitis B, with focus on reduction to practical applications. *Vaccine* **19**, 1837-48 (2001).
 131. Zhang, L. et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* **348**, 203-13 (2003).
 132. Blattman, J.N. & Greenberg, P.D. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* **305**, 200-5 (2004).
 133. Pardoll, D.M. Cancer vaccines. *Nat Med* **4**, 525-31 (1998).
 134. Chouaib, S., Asselin-Paturel, C., Mami-Chouaib, F., Caignard, A. & Blay, J.Y. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* **18**, 493-7 (1997).
 135. Catros-Quemener, V., Bouet, F. & Genetet, N. [Antitumor immunity and cellular cancer therapies]. *Med Sci (Paris)* **19**, 43-53 (2003).
 136. Homann, D., Teyton, L. & Oldstone, M.B. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat Med* **7**, 913-9 (2001).
 137. Ku, C.C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J. & Marrack, P. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* **288**, 675-8 (2000).
 138. Kennedy, M.K. et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 771-80 (2000).
 139. Lodolce, J.P. et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* **9**, 669-76 (1998).
 140. Kondrack, R.M. et al. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* **198**, 1797-806 (2003).
 141. Seddon, B., Tomlinson, P. & Zamoyska, R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* **4**, 680-6 (2003).
 142. Vella, A., Teague, T.K., Ihle, J., Kappler, J. & Marrack, P. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med* **186**, 325-30 (1997).
 143. Nestic, D. & Vukmanovic, S. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants. *J Immunol* **160**, 3705-12 (1998).
 144. Fukuda, T. et al. Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med* **186**, 439-48 (1997).
 145. Ichii, H. et al. Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* **3**, 558-63 (2002).
 146. Sun, J.C., Williams, M.A. & Bevan, M.J. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* **5**, 927-33 (2004).

147. Becker, T.C. et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 1541-8 (2002).
148. Lam, K.P., Kuhn, R. & Rajewsky, K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**, 1073-83 (1997).
149. Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N. & Rajewsky, K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalphabeta heterodimer. *Cell* **117**, 787-800 (2004).
150. Murga, C. & Barber, D.F. Molecular mechanisms of pre-T cell receptor-induced survival. *J Biol Chem* **277**, 39156-62 (2002).
151. Saint-Ruf, C. et al. Different initiation of pre-TCR and gammadeltaTCR signalling. *Nature* **406**, 524-7 (2000).
152. Guo, B., Kato, R.M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M.I. & Rawlings, D.J. Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity* **13**, 243-53 (2000).
153. Bachmann, M.F. et al. Developmental regulation of Lck targeting to the CD8 coreceptor controls signaling in naive and memory T cells. *J Exp Med* **189**, 1521-30 (1999).
154. Kersh, E.N. et al. TCR signal transduction in antigen-specific memory CD8 T cells. *J Immunol* **170**, 5455-63 (2003).
155. Watson, A.R. & Lee, W.T. Differences in signaling molecule organization between naive and memory CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* **173**, 33-41 (2004).
156. Philpott, K.L. et al. Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* **256**, 1448-52 (1992).
157. Moskophidis, D., Laine, E. & Zinkernagel, R.M. Peripheral clonal deletion of antiviral memory CD8+ T cells. *Eur J Immunol* **23**, 3306-11 (1993).
158. Son, Y.I. et al. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J Immunol Methods* **262**, 145-57 (2002).
159. Inaba, K. et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**, 1693-702 (1992).
160. Correia-Neves, M., Waltzinger, C., Wurtz, J.M., Benoist, C. & Mathis, D. Amino acids specifying MHC class preference in TCR V alpha 2 regions. *J Immunol* **163**, 5471-7 (1999).
161. Xue, H.H. et al. IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13759-64 (2002).
162. Kassiotis, G., Garcia, S., Simpson, E. & Stockinger, B. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat Immunol* **3**, 244-50 (2002).
163. Pantaleo, G., Graziosi, C. & Fauci, A.S. The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. *Semin Immunol* **5**, 157-63 (1993).
164. Josien, R., Wong, B.R., Li, H.L., Steinman, R.M. & Choi, Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol* **162**, 2562-8 (1999).

165. Gommerman, J.L. & Browning, J.L. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **3**, 642-55 (2003).
166. Murphy, M. et al. Expression of the lymphotoxin beta receptor on follicular stromal cells in human lymphoid tissues. *Cell Death Differ* **5**, 497-505 (1998).
167. Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K. & Bleul, C.C. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med* **198**, 757-69 (2003).
168. Anderson, D.M. et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**, 175-9 (1997).
169. Batten, M. et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* **192**, 1453-66 (2000).