

Université de Montréal

**Rôle de la voie de signalisation Notch dans la réponse
lymphocytaire T CD8 suite à une infection aiguë ou
chronique**

par Duval Frédéric

Département microbiologie, infectiologie et immunologie Faculté de Médecine
Université de Montréal

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Ph.D. en microbiologie et immunologie à la
Faculté des Études Supérieures

Décembre, 2017

© Frédéric Duval, 2017

Résumé

Lors d'une infection, les lymphocytes T (LT) CD8 naïfs entre dans une phase de prolifération rapide durant laquelle ils se différencient en LT effecteurs (LTe) capables d'éliminer l'agent infectieux par activité cytolytique directe ou par la production de cytokines. Au pic de la réponse, il existe deux sous-populations de LT effecteurs : d'une part, les SLEC pour « short lived effector cells » ($CD127^{faible}KLRG1^{fort}T-bet^{fort}EOMES^{faible}$) qui meurent par apoptose suite à l'élimination du pathogène et d'autre part, les MPEC pour « memory precursor effector cells » ($CD127^{fort}KLRG1^{faible}T-bet^{faible}EOMES^{fort}$) dont certains survivent et se différencient au cours du temps en LT CD8 mémoires (LTm) qui nous protège alors contre une seconde infection par le même pathogène. Toutefois, les mécanismes moléculaires permettant l'établissement d'une mémoire immunitaire fonctionnelle à long terme sont encore méconnus.

De plus, dans le cas d'infection chronique ou de cancer, la persistance de l'antigène (Ag) et de l'inflammation conduisent à un gain d'expression de récepteurs inhibiteurs (RI) (PD-1, Lag-3, 2B4, etc.) à la surface des LTe provoquant une perte progressive de leur fonctionnalité (production de cytokines et cytotoxicité), les empêchant ainsi de se différencier en LT CD8 mémoires. Toutefois, il est possible de les revigorer par un traitement inhibant l'interaction entre les RI et leurs ligands. Lors d'une infection chronique, il existe deux sous-populations de LT CD8 épuisés, les progéniteurs ($PD-1^{int}T-Bet^{fort}$) qui ont gardé certaines fonctions effectrices et qui peuvent donner naissance, en se divisant, aux LT CD8 épuisés de façon terminale ($PD-1^{fort}T-Bet^{faible}$). Seules les cellules exprimant un niveau intermédiaire de PD-1 peuvent être revigorées.

Ainsi, mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la différenciation des LT CD8 à la suite d'une réponse immunitaire aiguë ou chronique pourrait permettre 1) d'améliorer les stratégies de vaccinations actuelles pour générer plus de LTm CD8 fonctionnels à longue durée de vie, et 2) empêcher ou diminuer l'état d'épuisement des LT dans le cas d'infection chronique ou de cancer.

Nous avons émis l'hypothèse que la voie de signalisation Notch contrôle la différenciation des LT CD8 suite à une infection aiguë ou lors d'une infection chronique. Des souris sauvages ou déficientes pour Notch ont été soit vaccinées, soit infectées avec la bactérie intracellulaire *Listeria monocytogenes* (Lm-OVA) ou encore infectée avec la souche clone13 du virus de la chorioméningite lymphocytaire qui établit une infection chronique chez la souris.

Suite à une réponse lymphocytaire CD8 aiguë, l'absence de la voie de signalisation Notch provoque une baisse de la production de cytokines, une diminution de la génération des SLEC associée à une plus faible expression de CD25 sans toutefois affecter la génération des LTm. De plus, la diminution de la génération de SLEC n'est pas le résultat d'un défaut d'expression des facteurs de transcription T-bet, EOMES ou Blimp-1. Enfin, la surexpression de la molécule CD25 dans les LTe déficients pour Notch ne permet pas de restaurer la génération de SLEC. Tous ces résultats suggèrent que la voie de signalisation Notch contrôle la génération de SLEC par la régulation de l'expression d'un régulateur transcriptionnel essentiel à la génération des SLEC encore inconnu. Une autre explication pourrait être que cette voie collabore au promoteur de gènes cibles avec les facteurs de transcription connus pour être essentiels à la génération de SLEC.

Suite à une infection chronique, nous avons démontré que l'absence de la voie de signalisation Notch corrèle avec une augmentation des niveaux d'expression de récepteurs inhibiteurs PD-1 et Lag-3. Ce phénotype est associé à une diminution de l'expression de cytokines 15 et 30 jours post-infection. De plus, les LT CD8 épuisés déficients pour Notch se différencient préférentiellement de façon terminale, ce qui conduit à une augmentation de la charge virale 30 jours post-infection. En conséquence, les LT CD8 déficients pour la voie de signalisation Notch ne peuvent être revigorés par un traitement bloquant la voie de PD-1.

En conclusion, nous avons découvert que la voie de signalisation Notch est un acteur essentiel à la différenciation des LT CD8 que cela soit à la suite d'une infection aiguë ou d'une infection chronique. Cette voie permet la différenciation terminale en SLEC des LT CD8 suite à une infection aiguë alors qu'elle protège les LT CD8 lors d'infection chronique.

Mots-clés : : Lymphocyte T CD8, voie de signalisation Notch, infection aiguë/chronique, épuisement.

Abstract

Following an infection, naïve CD8 T cells expand and differentiate into effectors able to eliminate the pathogen by direct cytolysis or by cytokine production. At the peak of the response, two populations of effectors are distinguishable: short-lived effector cells (SLECs) ($CD127^{low}KLRG1^{high}T\text{-bet}^{high}EOMES^{low}$) meant to die by apoptosis and memory precursor effector cells (MPECs) ($CD127^{high}KLRG1^{low}T\text{-bet}^{low}EOMES^{high}$) destined to survive as memory cells that will confer long-term protection. Thus, following activation, the CD8 T cell faces a binary cell fate decision.

Furthermore, following cancer or chronic infection, persistence of antigen and sustained inflammation direct the effector to differentiate into an exhausted state. As the chronic infection progresses, CD8 T cells gain expression of inhibitory receptors leading to a progressive loss of their functionality and fail to differentiate into memory CD8 T cells. In-vivo blockade of the inhibitory receptors PD-1 during chronic infection or during cancer lead to gain of function of CD8 T cells and decreased viral load or tumor burden revealing a crucial role for this receptor in CD8 T cell exhaustion. Two subpopulations of exhausted CD8 T cells exist: the progenitor subset, which expresses low level of PD1, those cells maintain residual proliferative capacity and are still able to produce some cytokines such as IFN-gamma and TNF-alpha. The other subset corresponds to the terminally differentiated subset that coexpresses PD-1 along with another IR like CD160 and Lag-3. However, PD-1/PDL1 blockade will only reinvigorate cells expressing intermediate level of PD-1 ($PD-1^{int}$).

Thereby, a better understanding of the molecular mechanism by which CD8 T cell differentiates following acute or chronic infection will allow to 1) improve actual and future vaccination strategies to generate large numbers of highly functional memory CD8 T cells and 2) to counteract the exhausted phenotype of CD8 T cells following chronic infection or cancer.

In CD8 T cell, it was known that Notch directly controls the expression of cytokines as interferon-*gamma* (IFN- γ) and effector molecules as granzyme B (GrzmB) but also controls the expression of the transcription factors T-bet and EOMES. However, those transcription factors are known to be important for SLEC/MPEC differentiation. Indeed, T-bet is essential for SLEC generations while EOMES is highly expressed in MPEC. Moreover, T-bet expression support

the differentiation of progenitors while EOMES defines terminally differentiated CD8 T cell following chronic infection.

We hypothesized that the Notch signaling pathway controls CD8 T cell differentiation following acute or chronic infection. Thereby, we used mice in which only mature CD8 T cells are deficient for Notch1 and Notch2. As, Notch3 and Notch4 are not expressed in CD8 T cells, this allows us to study the role of this pathway. Those mice were either vaccinated with OVA-pulsed dendritic cells or were acutely infected with *Listeria monocytogenes* expressing OVA (Lm-OVA) or were chronically infected with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMVcl13).

Following infection with *Listeria monocytogenes* (Lm) or vaccination with antigen-pulsed dendritic cells, Notch deficiency induced a decrease in cytokines production but also a decreased SLEC generation along with a weaker expression of CD25, the high affinity chain of the IL-2 receptor without impairing memory generations. This defective SLEC generation is not due to a decreased expression of the transcription factors T-bet, EOMES or BLIMP-1. However, restoration of CD25 in Notch deficient T cells did not correct SLEC differentiation. These results suggest either that Notch regulates the expression of new players involved in SLEC differentiation or Notch signalling collaborates with already known actors of SLEC differentiation such as T-bet or Blimp-1.

Following a chronic infection with LCMVcl13, Notch-deficient virus-specific CD8 T cells express higher levels of IRs and produce less cytokines and granzyme B when compared to Notch-sufficient CD8 T cells at days 15 and 30 post-infection. Moreover, Notch-deficient effectors preferentially differentiate into the terminal-progeny subset at the expense of the progenitor subset. As of consequence, Notch-deficient exhausted CD8 T cells cannot be reinvigorated following PD-1/PDL-1 blockade and cannot properly control viral load.

In conclusion, we uncover a new role for the Notch signaling pathway controlling CD8 T cell differentiation following acute or chronic infection. This pathway controls SLEC generation following vaccination or acute infection while protecting CD8 T cell from exhaustion following a chronic infection.

Keywords : CD8 T cell, Notch signaling pathway, acute/chronic infection, T cell exhaustion.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux.....	xi
Liste des abréviations	xii
Remerciements.....	xv
Introduction	1
1. La réponse lymphocytaire CD8 suite à une infection aiguë	2
1.1. Cinétique de la réponse immunitaire	2
1.2. La phase d'expansion.....	4
1.2.1 La reconnaissance antigénique	4
1.2.2 La costimulation	7
1.2.3 Signal 3 : Les médiateurs solubles.....	10
1.2.4 Les propriétés et phénotypes des LT CD8 effecteurs	13
1.3 La phase de contraction	17
1.4 La phase mémoire.....	18
1.4.2 Phénotypes et propriétés des lymphocytes T mémoires	19
1.4.3 Les sous-populations de lymphocytes T mémoires	21
1.4.4 L'homéostasie des lymphocytes T mémoires.....	23
1.4.5 Les modèles de différenciation des lymphocytes T CD8 mémoires.....	24
1.5 Les facteurs de transcription contrôlant la réponse lymphocytaire CD8.....	29
1.5.2 T-bet, EOMES et RUNX3.....	29
1.5.3 Blimp-1 et Bcl-6	30
1.5.4 Id2 et Id3	31
1.6 Les facteurs influençant la réponse des lymphocytes T CD8	31
1.6.2 Signal 1 : la reconnaissance antigénique.....	32

1.6.3	La costimulation	33
1.6.4	Signal 3 : Les médiateurs solubles.....	34
1.2	La réponse lymphocytaire CD8 suite à une infection chronique	37
1.2.1	La persistance de l'antigène	39
1.2.2	Les récepteurs inhibiteurs.....	39
1.2.3	Les médiateurs solubles	45
1.2.4	Facteurs de transcription et programme transcriptionnel des lymphocytes T épuisés	48
1.2.5	Programme transcriptionnel des lymphocytes T épuisés	50
1.2.6	Les sous-populations de lymphocytes T épuisés	50
1.2.7	Épuisement, anergie et sénescence des lymphocytes T CD8.....	53
1.2.8	Traitements thérapeutiques de l'épuisement des lymphocytes T CD8.....	53
1.3	La voie de signalisation Notch	58
1.3.1	Biologie des récepteurs et des ligands	59
1.3.2	Biogénèse et maturation des récepteurs Notch.....	60
1.3.3	Mécanismes généraux de la voie de signalisation Notch.....	61
1.3.4	Diversité de réponse suite à l'activation de la voie de signalisation Notch	66
1.3.5	Notch dans le système immunitaire	68
1.3.6	Notch dans les lymphocytes T CD4.....	71
1.3.7	La voie Notch et les lymphocytes T CD8	73
	Raisonnement et hypothèse	81
	Résultats	84
	Article I. The Notch Signaling Pathway Controls Short-Lived Effector CD8+ T Cell Differentiation but Is Dispensable for Memory Generation.....	85
	Abstract	87
	Introduction	87
	Matériels et méthodes.....	90
	Résultats	93
	Discussion.....	99

Remerciements.....	103
Références	103
2. Études du rôle de la voie de signalisation Notch suite à une infection chronique.....	123
2.2 Matériels et méthodes	123
2.2.1 Souris et infection	123
2.2.2 Chimères hématopoïétiques.....	124
2.2.3 Cytométrie	124
2.2.4 Injection des anticorps bloquants.....	125
2.2.5 Restimulation des cellules de rate in vitro.....	125
2.2.6 Quantification de la charge virale.....	126
2.2.7 Statistiques.....	127
2.3 L'absence des récepteurs Notch1/2 corrèle avec une expansion clonale plus importante des LT CD8 lors d'une infection chronique.....	128
2.4 Les LT CD8 déficients pour les récepteurs Notch1 et Notch2 expriment plus fortement les récepteurs inhibiteurs PD-1 et Lag-3	129
2.5 Les LT CD8 déficients pour la voie de signalisation Notch sont fonctionnellement plus épuisés.....	132
2.6 La voie de signalisation Notch est continuellement requise dans les LT CD8 suite à une infection chronique	134
2.7 La voie de signalisation Notch contrôle la différenciation des LT CD8 épuisés	137
2.8 Le rôle de la voie de signalisation Notch est intrinsèque aux lymphocytes T CD8	140
2.9 La délétion génétique des récepteurs Notch1 et Notch2 ne permet pas de restaurer la fonctionnalité des LT CD8 suite à un traitement bloquant la voie PD-1, mais l'activation de la voie Notch n'est pas requise simultanément au traitement.....	142
Discussion.....	145
3. Rôle de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 lors d'une réponse aiguë	146
3.1 La voie de signalisation Notch dans la réponse effectrice des LT CD8.....	147
3.1.1 Choix de différenciation SLEC/MPEC.....	147
3.1.2 Notch contrôle les fonctions effectrices des LT CD8.....	151

3.1.3	Notch et la génération de LT mémoires.....	152
3.1.4	Modèle du rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation SLEC/MPEC.....	155
3.1.5	Perspectives	157
3.2	Rôle de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 lors d'une infection chronique	160
3.2.1	La voie de signalisation Notch, l'expansion clonale des LT CD8 et la structure de la rate	161
3.2.2	La voie de signalisation Notch et l'expression des récepteurs inhibiteurs.....	163
3.2.3	La fonctionnalité des LT CD8 et la voie de signalisation Notch.....	164
3.2.4	Notch contrôle la différenciation des LT CD8 épuisés.....	165
3.2.5	La délétion génétique des récepteurs Notch ne permet pas de restaurer la fonctionnalité des LT CD8 suite à une immunothérapie bloquant la voie PD-1	169
3.2.6	La voie de signalisation Notch et son implication dans l'épuisement des LT CD8 lors d'un cancer.....	170
3.2.7	Modèle du rôle de la voie Notch dans l'épuisement des LT CD8.....	170
3.2.8	Perspectives	171
3.2.9	Inter-relation entre les rôles de la voie Notch suite à une infection aiguë ou chronique.....	175
3.3	Applications thérapeutiques chez l'humain	176
3.3.1	Contexte d'une réponse immunitaire aiguë.....	176
3.3.2	Contexte d'une réponse immunitaire chronique.....	178
	Conclusion.....	179
	Bibliographie	i

Liste des figures

Figure 1.	Les sous-populations de LT CD8 au cours d'une infection.....	3
Figure 2.	Représentation schématique de la synapse immunologique et des molécules qui la composent.....	7
Figure 3.	Les molécules de costimulation et leurs ligands.	8
Figure 4.	Transition métabolique au cours de la réponse lymphocytaire CD8.....	17
Figure 5.	Les quatre modèles de différenciation des LTm.	28
Figure 6.	Expression relative des facteurs de transcription lors de la réponse lymphocytaire CD8.....	29
Figure 7.	Différenciation des LT CD8 en LTm suite à une infection aiguë ou en LT CD8 épuisés lors d'une infection chronique.....	38
Figure 8.	Les récepteurs inhibiteurs associés à l'épuisement des LT CD8.....	40
Figure 9.	Les sous-populations de LT CD8 épuisés identifiées par l'équipe du Dr E. John Wherry.....	51
Figure 10.	Schéma des récepteurs et ligands de la voie de signalisation Notch chez la drosophile.....	60
Figure 11.	La voie de signalisation Notch. Pour être fonctionnels les récepteurs Notch transiter par l'appareil de Golgi où subiront plusieurs étapes de maturation.....	62
Figure 12.	Shéma représentant l'implication de la voie de signalisation Notch dans les étapes de maturations et de développement des cellules du système immunitaire.....	78
Figure 13.	L'absence de Notch corrèle avec une plus forte expansion clonale des LT CD8 lors d'une infection chronique.	129
Figure 14.	Les LT CD8 déficients pour les récepteurs Notch1 et Notch2 expriment plus fortement les RI PD-1 et Lag-3.....	131
Figure 15.	L'absence de la voie de signalisation Notch induit un épuisement fonctionnel plus sévère des LT CD8.	134
Figure 16.	La voie de signalisation Notch est continuellement requise dans les LT CD8 répondant à une infection chronique.....	136
Figure 17.	La voie de signalisation Notch contrôle la différenciation des LT CD8 épuisés suite à une infection chronique.....	139

Figure 18. La voie de signalisation Notch affecte l'épuisement des LT CD8 de façon intrinsèque aux LT CD8.....	141
Figure 19. La délétion génétique des récepteurs Notch1 et Notch2 empêche de restaurer la fonctionnalité des LT CD8 suite à un traitement bloquant la voie de signalisation PD-1 mais n'est pas requise durant le traitement.....	143
Figure 20. Modèle hypothétique de la régulation de la voie de signalisation Notch par Bcl-6 et IKAROS dans les LT CD8 en cours d'activation.	154
Figure 21. Schématisation du rôle de la voie de signalisation Notch dans la génération des SLEC suite à une infection aiguë.....	156
Figure 22. Modélisation du rôle de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 épuisés.	168

Liste des tableaux

Table 1. Représentation des gènes cibles de la voie de signalisation Notch et de leurs rôles dans le développement et la maturation des des LT et durant l'activation des LT CD4 et CD8 matures.

.....79

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
APC : Antigen presenting cell / cellules présentatrices d'antigènes
ARN : acide ribonucléique
Bcl-6 : B-cell lymphoma 6 protein
BMDC : Bone marrow derived DC
CCL : C-C chemokine ligand
CCR : C-C chemokine receptor
CD : Clusters de différenciation
CM : Lymphocyte T mémoire centraux
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC : Dendritic cell / cellule dendritique
DLL1 : Delta like 1
DLL2 : Delta like 2
DLL4 : Delta like 4
EEC : Early effector cell
EM : Lymphocyte T mémoire effecteurs
EOMES : Eomesodermin
FasL : Fas ligand
FT : Facteur de transcription
GLD : Ganglion lymphatic drainant
GVHD : Graft-versus-host disease / Maladie du greffon contre l'hôte
Id2 : Inhibitor Of DNA Binding 2
Id3 : Inhibitor Of DNA Binding 3
IFN-g : Interféron gamma
IL- : Interleukine
ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
ITSM : immunoreceptor tyrosine-based switch motif

Lag-3 : Lymphocyte-activation gene 3
LCMV : Virus de la chorioméningite lymphocytaire
Lm-OVA: Listeria monocytogenes exprimant OVA
Lm: Listeria monocytogenes
LT : Lymphocyte T
LTe : lymphocyte T effecteur
LTm : lymphocyte T mémoire
LTn : lymphocyte T naïfs
MAML: Mastermind-like
MAPK : Map-kinase
MPEC : « memory precursor effector cell »
mTOR : Mammalian target of rapamycin
NICD: Domaine intracellulaire de Notch
NK : Natural killer cell
OLS : Organe lymphoïde secondaire
PD-1 : program death-1
PI3K : Phosphoinositide 3 kinase
RCT : Récepteur des cellules T
RDC : Régions déterminantes complémentaires
RI : Récepteur inhibiteur
RM : Lymphocyte T mémoire résident
SLEC : « short lived effector cell »
Tim-3 : T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TNF-a : Tumor necrosis factor alpha
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

*« À cœur vaillant, rien d'impossible »,
Jaques Cœur (1395 – 1456)*

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier ma directrice de recherche, le Dr Nathalie Labrecque pour m'avoir accueilli dans son laboratoire afin de travailler sur un projet stimulant. Je te remercie aussi Nathalie pour tout le temps que tu m'as consacré, que ce soit pour les discussions dynamiques à propos des résultats obtenus, pour corriger mes posters ou présentations, mais aussi pour avoir su me pousser pour réaliser jusqu'au bout ce projet ambitieux qu'est le doctorat.

Je souhaite aussi remercier mes chers collègues de travail : Mélissa Mathieu qui a pris le temps de me former lors de mon arrivée dans le laboratoire ; Jean-François Daudelin dont l'aide précieuse m'a permis de gagner d'incalculables heures de sommeil en m'aidant lors des journées particulièrement chargées ; Livia Odagiu pour toutes les discussions intéressantes et sa générosité ; Dave De Sousa pour m'avoir tant aidé dans la partie chronique du projet et Cindy Audiger pour m'avoir soutenu. À Dave et à Livia, je vous souhaite tout le succès que vous méritez dans vos études comme sur le plan personnel bien qu'à ce sujet, je n'ai aucune crainte tant vous êtes brillants tous les deux. Je remercie aussi Marion Sarrias pour sa bonne humeur constante, son humour et sa générosité remarquable. Je te souhaite plein de succès. Enfin, je souhaiterais remercier le Dr Salix Boulet, une personne pour qui j'ai énormément d'admiration tant pour ses qualités humaines que scientifiques. J'ai appris énormément grâce à toi, et je ne parle pas simplement de connaissances, mais plutôt et surtout pour m'avoir aidé à affûter mon raisonnement scientifique, mon esprit critique, ect...

Je remercie le Dr Hélène Decaluwe ainsi que le Dr Étienne Gagnon pour avoir fait partie de mon jury lors de mon examen prédoctoral et lors des mes comités de suivi.

Je remercie aussi notre collaborateur, le Dr Ivan Maillard et son équipe pour toutes les discussions intéressantes que nous avons eues ensemble, mais aussi pour toute l'aide qu'il nous a apportée.

Je remercie les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer et de corriger le travail que j'ai effectué au cours de ces 5 années.

Le doctorat pour moi, ça a aussi été une aventure humaine. J'ai certes quitté mes amis de (presque) toujours en France pour 5 ans, mais j'ai aussi rencontré des personnes incroyables ici au Québec. C'est pourquoi je souhaite remercier mes amis « de France » pour le soutien sans faille tout au long de ces 5 années malgré la distance. Évidemment, je remercie aussi tous mes nouveaux amis que j'ai rencontrés au Canada pour tous ces bons moments que l'on a vécus et que l'on vivra ensemble.

Enfin je remercie ma famille, ma mère et mon père ainsi que ma sœur et mon frère. Sans vous, je ne serais jamais arrivé jusque là.

Introduction

1. La réponse lymphocytaire CD8 suite à une infection aiguë

1.1. Cinétique de la réponse immunitaire

Le système immunitaire (SI) se définit par l'ensemble des éléments qui composent la défense d'un organisme contre les infections transmises par des microorganismes. Il peut être divisé en deux branches intriquées qui travaillent conjointement pour assurer la défense de l'organisme. Dans les premiers jours suivant une infection, l'immunité innée, composée principalement de macrophages, de cellules « natural Killer » (cellules NK), de neutrophiles ainsi que des cellules dendritiques permet la détection du pathogène, l'établissement d'une réponse aspécifique à son encontre limitant ainsi sa dissémination et initie la mise en place de l'immunité adaptative. Cette dernière permet l'établissement d'une réponse spécifique à l'agent infectieux conduisant non seulement à son élimination, mais aussi à la mise en place d'une mémoire immunitaire protégeant ainsi l'organisme d'une réinfection. L'immunité adaptative est composée des lymphocytes T (LT) CD4 et CD8 responsables de la réponse cellulaire ainsi que les lymphocytes B (LB) qui mettent en place la réponse humorale. Suite à leur activation, les LT CD8 entrent dans une phase de prolifération massive durant laquelle ils différencient en LT effecteurs (LTe) (Figure 1). Suite à cette phase de prolifération, les LTe sont non seulement en suffisamment grand nombre, mais ils sont aussi hautement fonctionnels. Leur fonction consiste à détecter et éliminer toutes cellules de l'hôte ayant été infectées par un pathogène. Au pic de la réponse, deux sous-populations existent parmi les LTe : d'une part, les SLEC, pour « Short lived effector cells », expriment fortement KLRG1 et faiblement CD127 (KLRG1^{fort}CD127^{faible}) et meurent rapidement durant la phase de contraction et, d'autre part, les MPEC expriment faiblement KLRG1 et fortement CD127 (KLRG1^{faible}CD127^{fort}), survivent à long terme et se différencient en lymphocytes T CD8 mémoires (LTm) (Figure 1). Ces LTm sont capables de nous protéger lors d'une réinfection par le même pathogène. Les LTm sont divisés en plusieurs sous-populations différenciées sur la base d'expression de marqueurs spécifiques, de leur localisation et de leur fonctionnalité (Figure 1). Les LTm dits centraux (CM) expriment

fortement le récepteur aux chimiokines CCR7 et la L-selectine CD62L ce qui favorise une localisation préférentielle dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Au contraire, les LTm effecteurs (EM) n'expriment pas ces deux marqueurs et se retrouvent majoritairement dans le sang et dans les organes non lymphoïdes où ils patrouillent. Enfin, les LTm résidents (RM) sont confinés dans les organes ayant subi une précédente infection, ils ne recirculent jamais et constituent la première ligne de défense en cas de réinfection. Ces trois principales sous-populations de LTm ont des caractéristiques spécifiques qui permettent, ensemble, de protéger l'organisme à long terme. Cependant, les mécanismes moléculaires contrôlant ces choix de différenciation ne sont pas encore bien compris.

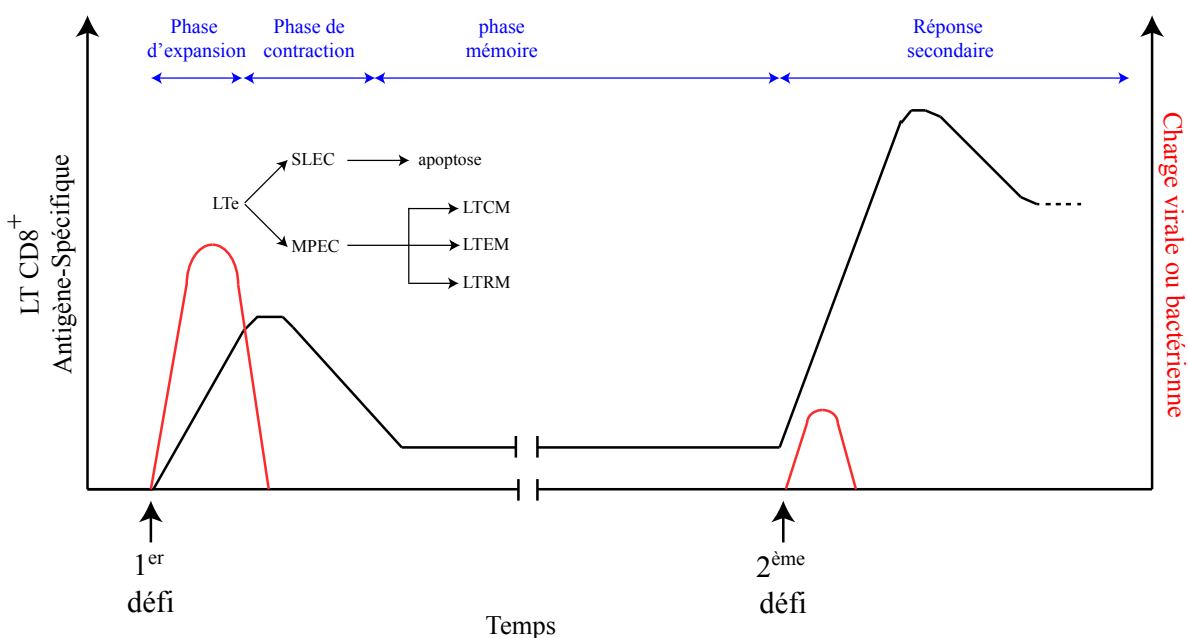


Figure 1. Les sous-populations de LT CD8 au cours d'une infection. Lors d'une infection, le pathogène prolifère rapidement (courbe rouge). Les LT CD8 capables de reconnaître l'agent infectieux s'activent alors et entrent dans une phase de prolifération massive durant laquelle ils se différencient en LTe fonctionnels capables d'éliminer l'agent infectieux. Au pic de la réponse, deux sous-populations de LTe existent : les SLEC destinés à mourir par apoptose lors de la phase de contraction et les MPEC dont certains survivront et se différencieront au cours du temps en LTm. Parmi les LTm, il existe plusieurs sous-populations : les lymphocytes T mémoires centraux (LTCM), les lymphocytes T mémoires effecteurs (LTEM) et les lymphocytes T mémoires résidents (LTRM).

1.2. La phase d'expansion

Chez l'humain comme chez la souris, le nombre de précurseurs de LT CD8 naïfs spécifique pour un antigène particulier est fixé, soit entre 80 et 3000 chez la souris et de 10 000 à 600 000 chez l'humain, ce qui est très faible compte tenu de la taille de l'organisme à protéger⁴. Cela représente chez la souris une fréquence comprise entre 1 LTn spécifique d'un antigène donné pour 164000 LT CD8 dans le cas des LTn spécifiques les plus rares et 1 LTn pour 33000 LT CD8 dans le cas des plus abondants (soit entre 6×10^{-6} et 3×10^{-5})^{Obar:2008ku}¹. Chez l'humain, la fréquence des LTn spécifiques d'un antigène est similaire à celle des souris puisqu'elle est comprise entre $0,6 \times 10^{-6}$ et $1,3 \times 10^{-4}$. Ainsi, la probabilité qu'un LT naïf rencontre l'antigène pour lequel il est spécifique en cas d'infection est faible, ce qui peut entraîner un délai important dans l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative. Cependant, la migration rapide de ces LT dans l'organisme associée à la particularité qu'ils transitent régulièrement par les OLS comme les ganglions lymphatiques drainants (GLD) permet de réduire considérablement ce délai.

1.2.1 La reconnaissance antigénique

Les LT ne peuvent reconnaître l'antigène pour lequel ils sont spécifiques que si celui-ci lui est présenté par une CPA via leurs molécules de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). En effet, les LT CD8 reconnaissent les peptides qui leur sont présentés par un CMH de classe I (CMHI) tandis que les LT CD4 reconnaissent uniquement des peptides présentés par un CMH de classe II (CMHII). Le CMHII présente généralement des peptides issus de la digestion de protéines extracellulaires dans des endosomes tandis que les CMHI présentent des peptides issus de la digestion de protéines présentes dans le cytoplasme des cellules qui les présentent.

1.2.1.1 Structure du récepteur T (RCT)

Les récepteurs T (RCT), exprimés à la surface des LT, ont une structure très similaire au fragment Fab des immunoglobulines. Ils sont composés de deux chaînes polypeptidiques α et β . Chacune de ces chaînes se structure en un domaine variable V et un autre domaine constant C. Les deux chaînes α et β forment des hétérodimères reliés entre eux par des ponts disulfures. Les deux chaînes traversent la membrane lipidique grâce à un domaine hydrophobe. Ce sont

dans les régions variables que se concentrent les polymorphismes, au niveau de boucles dites hypervariables, permettant la reconnaissance d'un grand nombre d'antigènes différents. Ainsi, les boucles hypervariables provenant des chaînes α et β forment trois régions déterminantes complémentaires (RDC) qui pourront alors reconnaître le complexe CMH-peptide.

Avant d'interagir avec le peptide antigénique, le RCT établit des contacts avec le CMH au niveau d'acides aminés conservés dans les régions variables des chaînes α et β contenus dans les boucles RDC1 et RDC2 du TCR. Cela permet d'optimiser la position des deux molécules favorisant ainsi l'interaction avec le peptide antigénique qui s'effectue au niveau des boucles RDC3 du TCR. Cependant, la partie cytoplasmique du RCT est très courte et ne dispose pas de domaine permettant la transduction du signal. De plus, la surexpression des chaînes α et β du RCT conduit directement à leur dégradation, avant même qu'elles ne soient exprimées à la surface, ce qui suggère que d'autres molécules sont requises pour 1) qu'il soit exprimé à la surface et 2) transduire le signal. En effet, le RCT forme un complexe avec les chaînes CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ et avec un homodimère de CD3 ζ formé par des liaisons covalentes. Les molécules de CD3 γ , CD3 δ et CD3 ϵ ont un domaine extracellulaire proche des immunoglobulines tandis que les CD3 ζ sont caractérisées par un petit domaine extracytoplasmique. Dans leurs domaines intracellulaires, les molécules de CD3 ont toutes des motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITAM). Les molécules CD3 γ , CD3 δ et CD3 ϵ contiennent un ITAM alors que chaque molécule de CD3 ζ en contient trois. Chaque ITAM contient deux tyrosines pouvant être phosphorylées.

1.2.1.2 La voie de signalisation du RCT

Lors de l'interaction du CMHI avec le RCT, la protéine tyrosine kinase de la famille des src-kinases telle que Lck sont recrutées sur la partie intracytoplasmique des corécepteurs CD8. Le rapprochement des corécepteurs permet la transphosphorylation des protéines Lck entre elles au niveau de leur tyrosine située en position 394 contribuant à les activer davantage. Une fois activée, Lck induit la phosphorylation des ITAM des molécules de CD3 incluant les trois motifs ITAM de CD3 ζ . La phosphorylation de ces motifs permet le recrutement de la protéine kinase Zap70 qui peut alors catalyser la phosphorylation de la protéine membranaire adaptatrice LAT. La forme phosphorylée de LAT sert de plateforme à de nombreuses protéines qui contribueront

alors à l'activation de plusieurs complexes de signalisation⁵⁻⁸. Le domaine SH2 de la phospholipase C γ 1 (PL C γ 1) interagit avec la forme phosphorylée de LAT, ce qui la séquestre au niveau de la membrane plasmique, lui permettant ainsi de catalyser la réaction d'hydrolyse du phosphatidylinositol(4,5)biphosphate [PtdIns(4,5)P2]. Cette réaction génère d'une part, l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) qui est responsable de la libération de calcium par le réticulum endoplasmique et, d'autre part, du diacylglycérol (DAG) qui permet alors l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la voie Ras. L'activation de ces différentes voies conduiront ultimement à l'activation des facteurs de transcription NFAT, AP1 et NF κ B qui permettront le programme génétique nécessaire à l'activation, la prolifération et la différenciation des LT CD8 (revue dans⁹).

1.2.1.3 Formation de la synapse immunologique

Lorsque le RCT interagit avec le CMHI présentant un peptide antigénique, il s'en suit un regroupement rapide des RCT présents à la surface du LT CD8 en cours d'activation sous forme de clusters¹⁰⁻¹³. C'est ainsi que s'initie la formation de la synapse immunologique (SI) (Figure 2). Les microclusters de RCT forment le centre de la SI, appelé cSMAC (pour « central region of the supra-molecular activation complex ») et se composent, en plus de RCT, de molécules accessoires telles que LAT, la protéine kinase PKC- θ ¹⁴⁻¹⁶. Autour du cSMAC se trouve le pSMAC (pour « peripheral SMAC ») qui se compose principalement d'intégrines telles que LFA-1 (« Lymphocyte function-associated antigen 1 »)^{16,17}. Ces molécules interagissent avec les adhésines exprimées par la CPA, ce qui permet de maintenir ces deux cellules en contact suffisamment longtemps pour que l'activation du LT CD8 soit complète. Enfin, à l'extérieur du pSMAC se trouvent différentes protéines telles que CD44, CD43 et CD45, ce qui constitue le dSMAC (« distal SMAC »)^{18,19}. Cette dernière protéine joue un rôle négatif dans l'activation de la voie de signalisation du RCT, notamment en inhibant Lck, et son action est inhibée grâce à son éloignement spatial du RCT²⁰. Ces molécules se retrouvent exclues du cSMAC à cause de leur taille encombrante. En effet, la taille de CD45 est supérieure à la distance séparant la CPA du LT estimée à environ 15 η m, ce qui correspond à la taille du RCT et du CMHI additionné²¹.

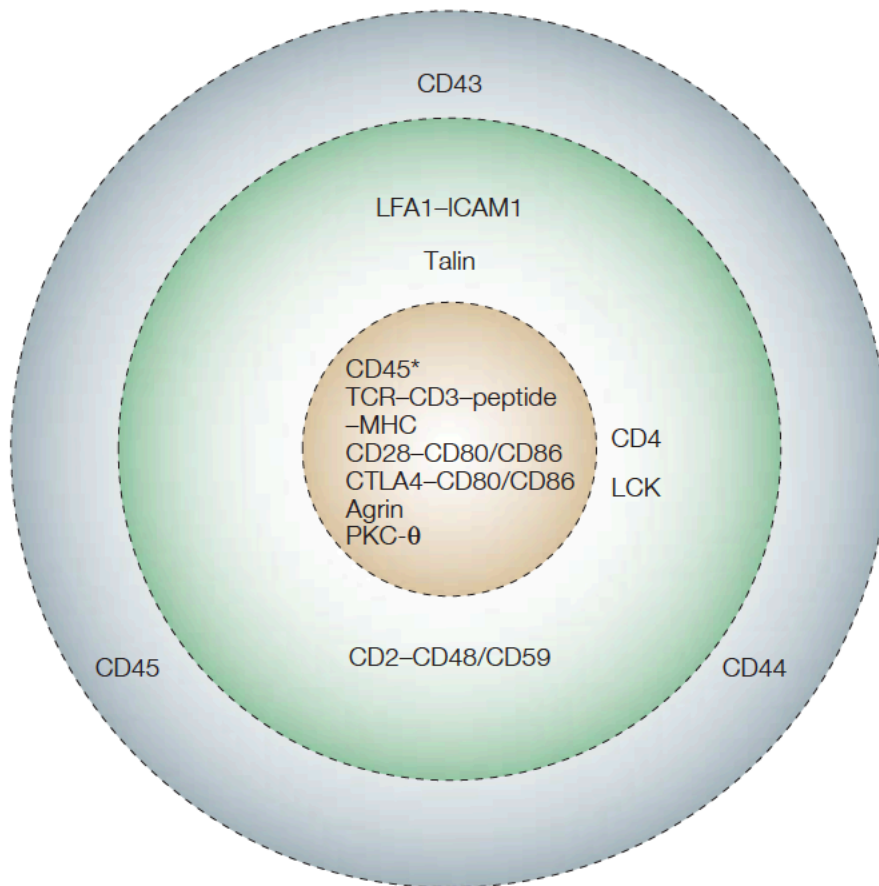


Figure 2. Représentation schématique de la synapse immunologique et des molécules qui la composent. En gris, le dSMAC, en vert, le pSMAC et en brun, le cSMAC. Adapté de ²².

1.2.2 La costimulation

Chez l'humain comme chez la souris, il est connu depuis longtemps que l'activation des LT CD8 requiert trois signaux. Le premier est induit par le RCT tandis que le second consiste en un signal de costimulation donné par la CPA lors de la reconnaissance antigénique. Enfin, le troisième signal est contrôlé par les cytokines présentes dans le milieu lors de l'activation des LT CD8 durant leur activation. Le signal de co-stimulation est essentiel puisque son absence induit l'anergie des LT CD8²³⁻²⁵. Les cascades de signalisations induites par la costimulation sont souvent les mêmes que celles induites par le TCR, ce qui permet de renforcer l'activation des LT CD8. Les cellules T expriment différents récepteurs à leurs surfaces qui, lorsqu'ils

interagissent avec les ligands pour lesquels ils sont spécifiques, pourront induire ce signal de costimulation. Or, l'expression de ces ligands est induite par la présence de signaux de dangers provenant des pathogènes à la surface des CPA. Il existe différentes familles de récepteurs participant au signal de costimulation et chacune de ces familles agit via divers mécanismes moléculaires pour soutenir l'activation des LT CD8. Les différentes molécules de co-stimulation sont présentées dans la figure 3.

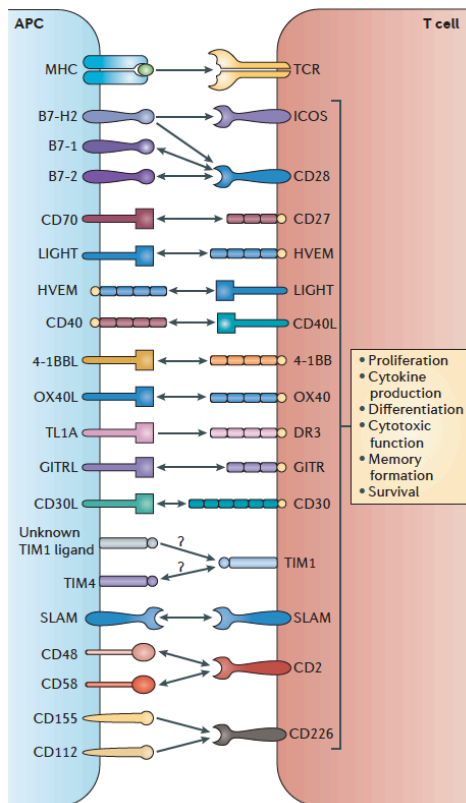


Figure 3. Les molécules de costimulation et leurs ligands. Les flèches représentent les interactions possibles entre les ligands et leurs récepteurs. Adapté de ²⁶.

1.2.2.1 La superfamille des immunoglobulines de type CD28

Cette superfamille est composée de plusieurs récepteurs ayant un rôle positif sur la réponse lymphocytaire CD8 tel que CD28 tandis que d'autres ont une action négative sur l'activation des LT CD8. Ces derniers seront discutés plus tard dans l'introduction.

1.2.2.1.1 CD28

La glycoprotéine CD28 est la première molécule de costimulation à avoir été identifiée. Son engagement est essentiel à l'activation, la survie et à la prolifération des LT CD8 en cours d'activation. Cette molécule est exprimée sur les LT CD8 naïfs, ce qui lui permet d'interagir avec ses ligands, B7-1 ou B7-2, aussitôt qu'une liaison s'établit entre le RCT et son agoniste. Cette molécule est d'ailleurs recrutée au niveau des regroupements formés par l'agrégation de RCT, au niveau du cSMAC. Sa présence dans le cSMAC permet l'accumulation rapide de radeaux lipidiques favorisant la phosphorylation des molécules essentielles à la signalisation du RCT²⁷. De plus, pour que la protéine PKC- θ soit recrutée au cSMAC dans le but d'être activée pour initier la signalisation du RCT, il faut qu'elle y soit recrutée en se fixant directement à la protéine CD28 via son domaine YMN^{28,29}. En plus de favoriser l'activation de la voie du RCT, CD28 interagit, grâce à son motif YMN, avec la phosphatidylinositol 3-kinase (Pi3K) qui activera alors la protéine Akt qui, à son tour, conduira à l'activation de NF κ B, de NFAT, de la protéine « mammalian target of rapamycin » (mTOR) et du transporteur de glucose Glut1, favorisant ainsi le changement de métabolisme nécessaire à l'activation des LT CD8³⁰. Enfin, CD28 permet le recrutement de la protéine RAS guanyl nucleotide-releasing protein (RASGRP) qui permet alors l'activation de RAS, des c-Jun N-terminal kinase (JNK) et des « extracellular signal-regulated kinases » (ERK), ce qui favorisera la survie et la prolifération cellulaire³¹. L'absence de costimulation par CD28 empêche l'activation des LT CD8 et ceux-ci deviennent anergiques²³⁻²⁵.

1.2.2.1.2 Superfamille des récepteurs au « tumor necrosis factor » (TNFR)

Cette superfamille de récepteurs, incluant 4-1BB, OX40, CD27, GITR et HVEM, promeut la survie, la prolifération ainsi que la production de cytokines en interagissant directement avec la voie de signalisation du RCT. En effet, l'interaction de ces récepteurs avec leurs ligands permet le recrutement des protéines adaptatrices « TNF receptor-associated factor (TRAF), induisant l'activation de la voie de signalisation³². Le recrutement de TRAF au niveau des TNFR induit l'activation de nombreuses voies de signalisation dont celles de NF κ B, JNK, « p38-mitogen-activated protein kinase » (MAPK) et « extracellular signal-regulated kinase »

(ERK) et conduits à l'activation des facteurs de transcription « nuclear factor of activated T-cell » (NFAT) et « activator protein » (AP1)^{26,32}.

1.2.3 Signal 3 : Les médiateurs solubles

En plus des signaux induits par la reconnaissance antigénique et par la costimulation, un troisième signal est requis pour l'activation optimale des LT CD8. Cependant, le rôle des cytokines ne se limite pas à l'activation complète des LT CD8. Au contraire, celles-ci permettent non seulement le contrôle des 2 phases, celles d'expansion et de contraction, mais contrôlent aussi les événements de différenciation des LT CD8.

Lors d'une infection par un pathogène, des molécules associées au danger sont détectées par les cellules de l'immunité innée comme les CPA. Celles-ci s'activeront et commenceront à produire et sécréter diverses cytokines, dont la qualité et les quantités relatives sont dépendantes du type de pathogène, ce qui permet d'adapter au mieux la réponse lymphocytaire à son rencontre³³. Ces cytokines sont majoritairement les interférons (IFN) de type I, l'IL-12 et l'IL-2 et sont perçues par les LT CD8 au moment de la reconnaissance antigénique lors de leurs interactions avec les CPA, ce qui améliore leur activation.

1.2.3.1 Les interférons de types I (IFN- α et IFN- β) et l'interleukine 12 (IL-12)

Ces deux types de cytokines ont un rôle redondant puisqu'elles agissent de concert avec la voie de signalisation induite par la reconnaissance antigénique ainsi qu'à la costimulation pour induire la prolifération et la différenciation des LT CD8³⁴⁻⁴⁰. La signalisation induite par ces cytokines à des temps précoces favorise la survie et permet de soutenir la prolifération des LT CD8 par le maintien de l'expression de la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2, CD25, dont l'importance sera discutée plus bas⁴¹.

Le récepteur à l'IL-12 est composé de deux chaînes, IL-12R α et IL-12R β . Il est rapidement induit suite à l'activation des LT CD8 et l'engagement de celui-ci avec son ligand

conduit à l'activation du facteur de transcription (FT) STAT4^{42,43}. L'IL-12 est produite par les cellules dendritiques (CD) et les macrophages.

Les interférons de types I sont composés de l'IFN- α et de l'IFN- β et signalent via leurs récepteurs IFNAR composés de deux sous-unités, IFNAR1 et IFNAR2. Lorsqu'il interagit avec ses ligands, ce récepteur recrute les protéines JAK1 et JAK2 qui phosphoryleront STAT1 et STAT2, lesquelles dimériseront pour migrer jusqu'au noyau où ils induiront la transcription de gènes cibles en se fixant à leurs promoteurs au niveau de la séquence ISRE (« Interferon-sensitive response element » en anglais)⁴⁴. Cette cytokine est induite par les cellules de l'immunité innée lorsqu'elles détectent des molécules de dangers (PAMP) exprimées par les virus et les bactéries⁴⁵.

1.2.3.2 L'interleukine-2 (IL-2)

Cette cytokine est produite par les CD, les mastocytes, et les cellules NK, mais est majoritairement produite par les cellules T et agit en partie de façon autocrine. La stimulation des LT_e par le TCR active l'expression de la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2, ce qui amplifie l'activation de cette voie de signalisation à des temps précoces. Par la suite, ce sont les signaux induits par l'IL-2, l'IL-12 et les IFN de type I, notamment, qui permettent le maintien de l'expression de CD25 au cours du temps. Cette voie de signalisation favorise la survie et permet de soutenir la prolifération des cellules T CD8⁴¹. En effet, le maintien de l'expression de CD25 prolonge l'expression des molécules du cycle cellulaire et augmente l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2, ce qui corrèle avec un grand nombre de divisions des LT CD8. Ce mécanisme est important puisque cela permet l'accumulation optimale de LT CD8 pour l'élimination de *Listeria monocytogenes* et du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)⁴⁶⁻⁵¹. L'importance de cette voie dans le contrôle des choix de différenciation des LT CD8 sera discutée dans le chapitre 1.5.

1.2.3.3 L'interféron-gamma (IFN- γ)

Cette cytokine est produite majoritairement par les LT CD8 activés, les LT CD4 Th1 ainsi que par les cellules NK et NKT. Cette cytokine est importante lors de la phase d'activation pour favoriser l'accumulation des LT CD8. Il a en effet été démontré que l'expansion clonale

des LT CD8 est deux fois plus faible en absence de cette cytokine dans un modèle de vaccination au LPS avec le peptide OVA dans un modèle d'infection par le virus LCMV-Arm^{52,53}.

1.2.3.4 L'interleukine 15 (IL-15)

Il a été démontré chez la souris que suite à une infection par le virus de la grippe, la déplétion des CD pulmonaires conduit à une faible réponse des LT CD8 et plus faible élimination du virus⁵⁴. La réponse plus faible des LT CD8 n'est pas la conséquence d'une prolifération moins importante mais est due à une survie plus faible de ces derniers. En effet, les auteurs ont démontré que l'IL-15 présent à la surface des DC pulmonaires est présentée aux LT CD8 sous forme de complexe IL-15-IL-15R. De plus, le blocage de l'IL-15 ou du récepteur IL-15 sur les CD résulte en une augmentation de l'apoptose des LT CD8 dans le poumon. Dans une autre étude chez la souris, les auteurs démontrent que l'IL-15 et le TGF- β ont des effets opposés sur la survie des SLEC. Tandis que le TGF- β induit l'apoptose des SLEC, l'IL-15 favorise leur survie. Ce mécanisme n'implique pas la régulation négative d'une de ces deux voies par rapport à l'autre mais plutôt en régulant la balance des molécules anti- ou pro-apoptotique⁵⁵. En accord avec ces résultats, l'IL-15 produit par des CD dérivées de moelle osseuse *in vitro* conduit la encore à meilleure survie des LT CD8⁵⁶.

1.2.3.5 L'interleukine 21 (IL-21)

L'IL-21 est principalement produite par les LT CD4 et est un facteur de survie des LT CD8 chez la souris et l'humain lors d'une infection par vaccinia virus⁵⁷. Cette cytokine promeut la survie des LT CD8 par un mécanisme dépendant de l'activation de STAT1 et STAT3 conduisant à l'expression de molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-x_L. Par ailleurs, il a été démontré que cette cytokine synergise avec l'IL-2 pour augmenter la prolifération des cellules T humaines⁵⁸. En plus de son rôle dans la survie et la prolifération, l'IL-21 supporte l'acquisition des fonctions effectrices et de la cytotoxicité des LT CD8 murins *in vitro*⁵⁹. Paradoxalement, le traitement des cellules avec cette cytokine conduit à une plus faible production d'IFN- γ .

1.2.3.6 Rôle de l'aide CD4 dans l'activation des LT CD8

Pour que la réponse lymphocytaire CD8 soit optimale, il est nécessaire que les LT CD4 soient, eux aussi, activés²¹³⁻²²⁰. En effet, en absence des cellules T CD4, les LT CD8 qui se différencient n'ont pas la capacité de survivre longtemps dans l'organisme et ont une capacité proliférative diminuée suite à un second défi immunologique²²¹⁻²²⁴. En effet, les cellules T CD4 permettent la maturation fonctionnelle des CPA (« licencing » en anglais). En effet, l'interaction du ligand de CD40 (CD40L), exprimé par les LT CD4, avec son récepteur CD40, exprimé à la surface des CPA, conduit à l'augmentation de la présentation antigénique et augmente la capacité de costimulation de ces cellules bien que ce mécanisme ne soit pas toujours nécessaire^{213,225-228}. Ainsi, les LT CD8 qui rencontrent des CPA ayant été maturés par les CD4 établissent une réponse CD8 robuste. Il est à noter que le CD40L exprimé par les CD4 peut aussi interagir avec le CD40 des LT CD8, mais les conséquences de cette interaction ne sont pas encore bien connues²²². De plus, les CPA ayant été maturées commencent à sécréter les chimiokines CCL3 et CCL4 (CC-chemokine ligand) qui peuvent alors guider les LT CD8 naïfs qui expriment le récepteur aux chimiokines CCR5 dans les ganglions, augmentant ainsi fortement la probabilité pour un LT CD8 naïf de rencontrer l'antigène pour lequel il est spécifique²²⁹. Les CD ainsi maturés par les CD4 produisent de l'IL-12 et de l'IL-15, deux cytokines importantes pour la survie des LTe CD8. Par ailleurs, les LT CD4 peuvent aider directement à l'activation des LTe CD8 en produisant de l'IL-2 et de l'IL-21, deux cytokines favorisant leur survie.

1.2.4 Les propriétés et phénotypes des LT CD8 effecteurs

1.2.4.1 Caractéristiques des LT CD8 effecteurs

L'activation des LT CD8 change radicalement leurs phénotypes, leurs propriétés ainsi que leur localisation. Suite à leur activation, les LT CD8 entrent dans une phase de prolifération massive durant laquelle ils se différencient en LTe. Le programme transcriptionnel des LTe est initié très rapidement après leur activation, ce qui impacte profondément leurs phénotypes. Il a été estimé à 4000 le nombre de gènes différentiellement exprimés entre les LTn et les LTe^{60,61}.

Parmi ces gènes, on compte ceux impliqués dans la division cellulaire. En effet, les LTe peuvent se diviser jusqu'à 19 fois, ce qui peut représenter au pic de la réponse, entre 20 000 et 400 000 fois le nombre de précurseurs naïfs qui étaient présents avant l'infection⁶². En plus d'induire la prolifération de ces cellules, ce changement de programme transcriptionnel affecte la migration des LTe. Ces derniers répriment notamment l'expression de la L-selectine CD62L ainsi que celle du récepteur aux chimiokines CCR7 et induit, entre autres, l'expression de S1PR1 (« sphingosine 1-phosphate receptor type 1 ») et du récepteur de chimiokines CXCR3, ce qui favorise la sortie des OLS pour rejoindre le site d'infection⁶³⁻⁶⁶. Parmi les gènes dont l'expression est induite dans les LTe se trouvent ceux importants pour leur fonctionnalité. Ils commencent en effet à exprimer rapidement des cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-2, le TNF- α et l'IL-10, mais produisent aussi la granzyme B (GrzmB) et la perforine (perf) ainsi que le FASL, ce qui leur permet d'éliminer efficacement les cellules de l'hôte ayant été infectées^{33,67,68}.

1.2.4.2 Les sous population de LT CD8 effecteurs

Au pic de la réponse, les LT CD8 murins répondant à l'infection peuvent être divisés en 4 sous-populations distinctes identifiées sur la base d'expression des deux marqueurs CD127 et de KLRG1 (« Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1 »). En effet, suite à une infection par la souche aiguë du virus LCMV, les LTe n'expriment pas encore KLRG1 alors qu'ils ont diminué leur expression de CD127 (jour 2 et 3 post-infection). Cette sous-population, qui n'exprime aucun de ces deux marqueurs (doubles négatives), est appelée « early effector cell » (EEC) et est encore retrouvée au pic de la réponse. Ce phénotype suggère que ces cellules ont été activées récemment et qu'elles ne sont pas encore différenciées puisqu'elles gardent la capacité de se différencier soit en SLEC, soit en MPEC^{60,69}. 4 jours après l'infection par LCMV, une sous-population de LTe commence à exprimer KLRG1. Cette sous-population est appelée SLEC (KLRG1^{fort}CD127^{faible}) (pour « short-lived effector cells » en anglais). Lorsque ces cellules sont triées, à 5 jours après l'infection par le virus de la stomatite vésiculaire, puis transférées dans des souris ayant été infectées simultanément aux souris donneuses, ces cellules sont capables de proliférer pour donner des cellules KLRG1^{fort} uniquement à la suite de quoi elles meurent par apoptose. Cela révèle que cette sous-population est différenciée de façon terminale^{60,69}. En revanche, simultanément à la différenciation SLEC, à jour 5 post-infection apparaît une autre sous-population de cellules qui commence à réexprimer CD127. Cette sous-

population est appelée MPEC (pour « memory precursor effector cells ») (CD127^{fort}KLRG1^{faible}). Le transfert de cette sous-population permet la génération de SLEC ainsi que de MPEC suggérant que cette sous-population est moins différenciée que les SLEC. De plus, les MPEC générées lors d'une infection par LCMV, triées à jour 10 post-infection et transférées dans une souris naïve survivent à long terme pour se différencier en LTm fonctionnels capables d'éliminer efficacement la bactérie Lm-gp33 (*Listeria monocytogenes* exprimant l'antigène GP33, exprimé par le virus LCMV)^{69,70}. Il a par ailleurs été démontré un rôle important de CD127 dans la survie de cette sous-population puisque la signalisation de ce récepteur induit l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2⁷¹. En plus d'exprimer plus fortement Bcl-2, les MPEC expriment aussi plus faiblement la forme active de la caspase 10 jours après une infection par le virus LCMV⁷⁰. Il existe aussi une quatrième sous-population, exprimant à la fois KLRG1 et CD127, mais très peu d'études ont été faite sur ces cellules.

1.2.4.3 Adaptation métabolique des LT CD8 effecteurs

Un autre aspect essentiel de l'activation des LT CD8 est le changement de métabolisme (Figure 4). En effet, les LTn et LTm sont quiescents et n'ont pas besoin d'utiliser beaucoup d'énergie pour assurer leur fonction. C'est pourquoi ils utilisent l'énergie sous forme d'ATP issue de l'oxydation des acides gras et de la phosphorylation oxydative mitochondriale (catabolisme)⁷². Cependant, cette source d'énergie n'est plus suffisante pour assurer la phase de prolifération massive, la différenciation et l'expression des molécules effectrices des LTe en cours d'activation. C'est pourquoi les LTe doivent adapter leur métabolisme pour la glycolyse aérobie et la synthèse lipidique pour subvenir à l'important besoin énergétique (anabolisme)⁷²⁻⁷⁵. Cela est permis notamment grâce à l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR par le TCR et les signaux de costimulation et est maintenu par les signaux provenant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 et l'IL-12 par exemple (Figure 4)⁷⁶⁻⁷⁹. L'activation de cette voie permet d'induire les gènes essentiels pour le transport des nutriments à l'intérieur de la cellule, des gènes impliqués dans la traduction protéique, mais aussi des gènes impliqués dans la synthèse lipidique et dans la glycolyse aérobie. Tous ces événements permettent la mise en place du métabolisme anabolique nécessaire au LTe. Plus tard dans la réponse, l'élimination de l'antigène conduit à une plus faible inflammation associée à une diminution de la production d'IL-2 et d'IL-12, ce qui diminue l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR^{72,74}. De plus,

l'activation de la voie AMPK-FoxO1 permet d'inhiber la voie PI3K-Akt-mTOR, mais favorise aussi la transition métabolique pour un retour au métabolisme catabolique. La voie AMPK-FoxO1 est activée lors de stress cellulaire ou lorsque l'ATP devient limitante (Figure 4)^{74,75,78,80}. En accord avec cela, le traitement de souris avec la metformine, un activateur chimique d'AMPK, conduit à une plus forte génération de LTm suite à une infection par Lm⁷⁸. De la même manière, la surexpression de la carnitine palmitoyltransferase 1A, une protéine capable d'oxyder et de transporter des acides gras au niveau de la mitochondrie, augmente aussi la génération de LTm⁸⁰. Ces résultats suggèrent que le changement métabolique est important pour la différenciation des LTm.

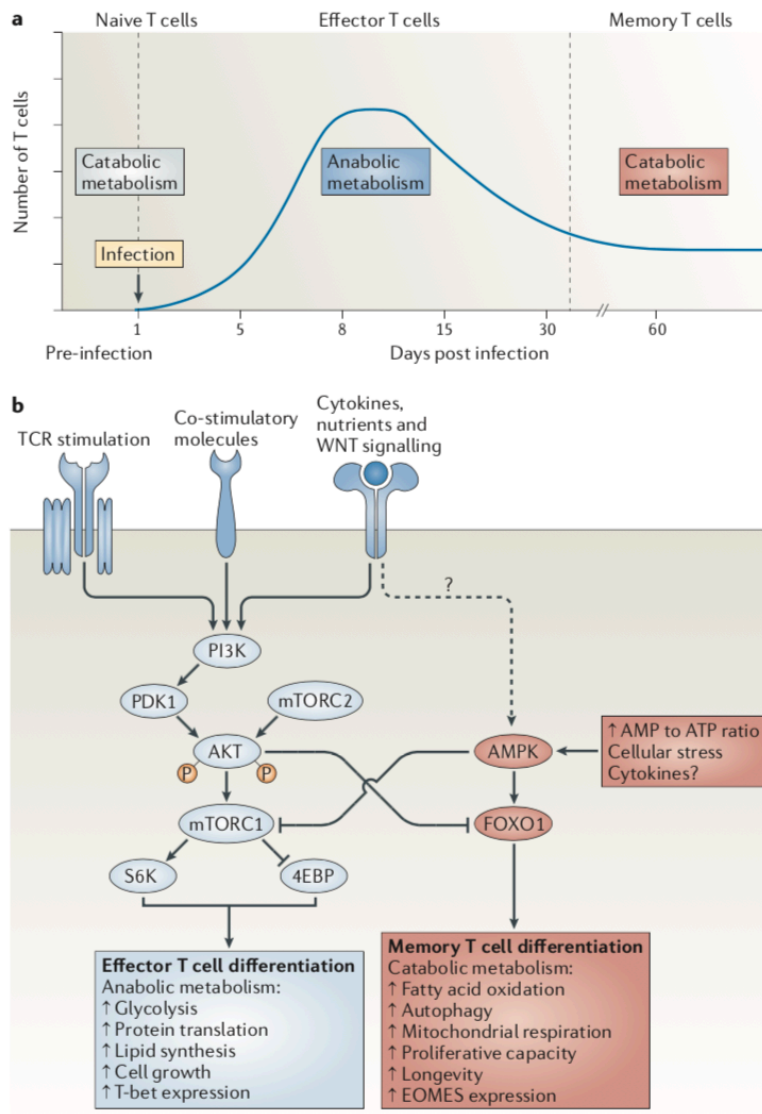


Figure 4. Transition métabolique au cours de la réponse lymphocytaire CD8. A) représentation schématique de l'adaptation métabolique des LT CD8. Les LTn et LTm ont un métabolisme catabolique tandis que les LTe acquièrent un métabolisme anabolique. B) La voie PI3K-Akt-mTOR permettant ce changement métabolique. En bleu, la voie permettant la transition vers un métabolisme anabolique suite à l'activation des LT CD8. En rouge, la voie permettant la transition d'un métabolisme anabolique vers un métabolisme catabolique lors de la transition lors de la différenciation des LTm. Adapté de ⁷².

1.3 La phase de contraction

Suite à l'élimination du pathogène, environ 90% des LTe CD8 générés meurent par apoptose, seuls 10% survivent et se différencient au cours du temps en LTm. Il a tout d'abord été suggéré que la phase de contraction était induite par l'arrêt de production des molécules stimulant la survie et la prolifération des LTe. Cependant, suite à l'injection d'IL-2, le nombre de LT CD8 augmente, mais la phase de contraction est seulement décalée dans le temps, suggérant que l'absence d'IL-2 n'est pas un facteur décisif de l'initiation de la contraction chez la souris lors d'une infection par la souche aiguë du virus LCMV. C'est finalement l'équipe du Dr. Harty qui a découvert que c'est l'inflammation précoce qui contrôle la phase de contraction⁸¹. En effet, les auteurs démontrent que, plus l'inflammation précoce est faible, plus le nombre de LTe qui survivent à la phase de contraction est important et inversement. Notamment, l'exposition précoce des LT CD8 à de l'IFN- γ diminue la capacité ou empêche des LTe à réexprimer le récepteur CD127, essentiel à la survie des MPEC pour devenir des LTm. La voie de l'IL-7 induit, entre autres, l'expression de molécule anti-apoptotique telle que Bcl-2⁸¹. La molécule pro-apoptotique Bim est impliquée dans ce mécanisme, car son absence corrèle avec une absence de contraction des LT CD8⁸².

L'apoptose des LTe murins lors de la phase de contraction peut aussi être induite par d'autres signaux extrinsèques provenant des récepteurs Fas (aussi appelé CD95), TRAILR1 et TRAILR2 et TNFR1. Leurs ligands sont FASL (CD95L), TRAIL (« TNF-related apoptosis-inducing ligand ») et le TNF respectivement. Tous ces récepteurs contiennent des domaines de mort (« death domain », DD). Lorsque Fas interagit avec son ligand FasL, il y a recrutement de la protéine adaptatrice FADD au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur. Cette dernière

recrute les pro-caspases 8 et 10⁸³⁻⁸⁶. Ce complexe, réunissant les ligands, les récepteurs, la protéine adaptatrice FADD et les pro-caspases 8 et 10 forme le complexe DISC (pour « Death-Inducing Signaling Complex »). La proximité des caspases entre elles permet leur activation par auto-protéolyse. Une fois activées, les caspases initiatrices clivent les caspases 3, 6 et 7, ce qui conduit à l'apoptose. En plus d'activer la voie extrinsèque de l'apoptose, les caspases 8 et 10 clivent la protéine BID (« BH3-interacting-domain death agonist ») pour donner tBID (« truncated BID ») qui induit le relargage du cytochrome c, permettant ainsi l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose^{83,84}. Les deux autres récepteurs TRAILR1/2 et TNFR1 agissent via des mécanismes similaires. L'induction de l'apoptose doit être régulée pour permettre aux LTe d'être générés, mais aussi pour permettre la survie des MPEC. Ceci est rendu possible par le contrôle de l'expression de ces récepteurs, mais aussi par l'induction de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xl dans les MPEC pour contre-balancer les signaux d'apoptose. De plus, la protéine cFLIP est capable d'inhiber l'activation des pro-caspases 8 et 10 pour empêcher l'apoptose. Ainsi, les cellules n'exprimant pas cFLIP sont plus sensibles à l'apoptose.

1.4 La phase mémoire

Dans les années 90, de nouvelles technologies sont apparues et ont permis de faciliter grandement l'étude de la réponse lymphocytaire mémoire. Notamment, l'utilisation de tétramères de molécules du CMHI couplés à son antigène a permis de suivre au cours du temps la réponse lymphocytaire d'un ou de plusieurs clonotypes ayant une affinité suffisante sans avoir besoin de restimuler les cellules et ainsi modifier leur état de LTm quiescent. De même, le transfert adoptif de LT CD8 génétiquement modifiés pour exprimer un RCT transgénique capable de reconnaître un unique antigène a aussi permis de mieux étudier la phase mémoire. Parmi les informations que ces innovations ont apportées, il a été rapidement démontré par des expériences de transfert adoptif de LT activés qu'il faut environ 40 jours suite à une infection pour générer des LTm fonctionnels capables de survivre à long terme dans un hôte naïf^{63,87}.

1.4.2 Phénotypes et propriétés des lymphocytes T mémoires

Les LTm ont des phénotypes différents des LTn et sont capables de répondre plus rapidement et plus efficacement que ces derniers contre l'agent infectieux. En effet, les LTm expriment de plus hauts niveaux d'expression d'intégrine α (CD29, CD49d et CD49e) et β (CD11a, CD11b et CD18) ainsi que de plus hauts niveaux d'expression de CD44 et de Ly6C, deux protéines de surface impliquées dans les interactions cellulaires⁸⁸⁻¹⁰¹. De plus, certaines des protéines à la surface des LTm sont fortement glycosylées contrairement aux LTn, ce qui peut grandement affecter la migration de ces cellules¹⁰². Tous ces éléments suggèrent que ces deux types cellulaires n'ont pas les mêmes capacités migratoires et pourraient présenter des capacités différentes pour interagir avec d'autres types cellulaires. Les LTm expriment aussi de plus hauts niveaux d'expressions de CD122, soit la chaîne β des récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15^{88,99-101}. Ceci s'explique par le fait que les LTm humains et murins sont dépendants du signal de l'IL-15 pour survivre et effectuer leur prolifération homéostatique alors qu'au sein des LTn, cette voie n'est pas requise.

1.4.2.1 Les propriétés des LTm

Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer pourquoi les LTm répondent plus efficacement et rapidement que les LTn suite à une infection et ces mécanismes sont décrits ci-dessous.

1.4.2.2 Le réservoir de LTm

Les LTm constituent un réservoir de cellules bien plus important que les LTn spécifiques pour le même antigène¹⁰³.

1.4.2.3 Les LTm ont une meilleure sensibilité à l'antigène comparé au LTn

Les LTm sont plus sensibles et ont besoin de moins d'antigènes pour être activés^{101,104-108} bien que cela n'a pas pu être vérifié dans toutes les études existantes^{104,109,110}. Il a de plus été démontré que les LTm n'ont pas besoin d'interagir longtemps avec la CPA pour être activés et sont moins dépendants des signaux de costimulation. De surcroît, contrairement au LTn, les LTm CD4 ne sont plus uniquement dépendants des DC pour être activés¹¹⁰⁻¹¹².

1.4.2.4 La structure de la chromatine des LTm est différent de celle des LTn

L'activation primaire des LTn conduit à une restructuration profonde de l'état d'accessibilité de la chromatine qui persiste jusqu'au stade mémoire. Notamment, les LTm quiescents possèdent un contenu plus important d'ARN et de protéines exprimées par rapport aux LTn, suggérant que les LTm se trouvent en phase G1 contrairement aux LTn qui sont en phase G0^{113,114}. Ainsi, les LTm entrent plus rapidement en phase M. De plus, les gènes codant pour certaines cytokines continuent d'être transcrits, y compris au sein des LTm quiescents, suggérant que leur production et sécrétion sera plus rapide chez les LTm^{113,115,116}.

1.4.2.5 Les LTm sont sensibles aux signaux inflammatoires

Contrairement aux LTn, les LTm CD8 ont la capacité de répondre à des signaux inflammatoires (IL-12, IL-15, IL-18 et IFN de type I) et ce, indépendamment de la reconnaissance antigénique^{117,118}. Notamment, lors d'une infection, les monocytes Ly6C⁺ répondent à la présence d'IFN de type I en produisant de l'IL-15 et de l'IL-18, ce qui a plusieurs conséquences sur la biologie des LTm. Notamment, l'IL-15 est responsable d'induire dans les LTm CD8 murin l'expression de *Gcnt1*, une enzyme responsable d'initier la glycosylation des protéines exprimées à la surface de ces dernières. Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles puisqu'elles permettent la liaison des LTm avec les E- et P-selectines ce qui a pour conséquence le recrutement des LTm au site d'infection et ce, de façon indépendante de leur spécificité antigénique¹⁰². Le recrutement de LTm non-spécifiques pour le pathogène infectieux est important puisque ces derniers sont capables de proliférer modestement, d'exprimer le marqueur d'activation CD69 et participent à la réponse innée avec les cellules NK pour éliminer l'agent infectieux^{102,117,118}. De plus, il a été démontré *in vivo* que l'exposition préalable des LTm CD8, et non des LTn, à des cytokines pro-inflammatoires conduit à une plus forte activation de la voie proximale du RCT augmentant ainsi la sensibilité antigénique des LTm lorsque ceux-ci sont restimulés avec le peptide pour lequel ces cellules sont spécifiques¹¹⁹. De surcroît, l'exposition des LTm aux cytokines pro-inflammatoires induit aussi l'expression des gènes d'entrée dans le cycle cellulaire et ce, même en l'absence d'antigène¹²⁰. Si cela n'induit pas directement une forte prolifération des LTm en absence d'antigène, ce mécanisme à un effet

biologique important puisqu'il permet une division plus rapide des ces cellules ayant été exposés en comparaison aux LTn et aux LTm non exposés lorsque ces dernières rencontrent le peptide pour lequel elles sont spécifiques. Dans ces deux dernières études, les cytokines pro-inflammatoires sont induites par un pathogène qui n'est pas reconnu par la population de LTm étudiés. Les auteurs ont démontré que l'IL-15 seule est responsable d'induire ces mécanismes via l'activation de la voie mTORC1 et que l'expression de cette cytokine est la conséquence de la sécrétion des interférons de type I induite par l'infection¹²⁰. En accord avec cela, la stimulation de LTm *in vitro* avec de l'IL-15 et de l'IL-18 confère une meilleure activité cytolytique de ces cellules par rapport à des LTm CD8 non stimulés suite au transfert de celles-ci dans un hôte infecté par un pathogène reconnu par les LTm¹¹⁸. Tous ces éléments rapportent que l'exposition à ces cytokines contribue à l'établissement rapide de la fonctionnalité des LTm ayant de nouveau rencontré l'antigène pour lequel ils sont spécifiques.

1.4.3 Les sous-populations de lymphocytes T mémoires

À la fin des années 90, les LTm CD8 ont été divisés en deux sous catégories sur la base de marqueurs de surface spécifiques, leur capacité à proliférer, leur localisation ainsi que leur fonctionnalité^{87,121}. On discernera alors, les LTm dits centraux (CM) des LTm effecteurs (EM). Contrairement aux EM, les CM expriment fortement la sélectine CD62L et le récepteur « C-C chemokine receptor type 7 » (CCR7). L'expression de cette sélectine et de ce récepteur aux chimiokines permet de traverser la veinule à endothélium épais, ce qui favorise une localisation de ces cellules dans les ganglions lymphatiques, mais circulent aussi dans le sang¹²². Ces cellules sont dépourvues d'activité effectrice immédiate. Les EM n'expriment pas CD62L ni CCR7 et se trouvent majoritairement dans le sang aussi bien que dans les tissus tels que la rate, le foie, les intestins et les poumons¹²². En effet, parmi les EM, une partie de ces cellules expriment les molécules CXCR3 et CXCR5, ce qui leur permet de patrouiller dans les organes tertiaires¹²². Contrairement aux CM, les EM expriment la GrzmB et possèdent une forte activité cytolytique¹⁰³. En revanche, les CM produisent de grande quantité d'IL-2 et ont gardé la capacité de proliférer dans une souris naïve¹⁰³. De façon intéressante, l'activation de la voie de signalisation à l'IL-2 favorise la génération de LT CD8 EM tandis qu'à l'inverse, l'IL-15 favorise la génération de LT CD8 CM¹²³⁻¹²⁷.

Plus récemment, une troisième sous-population de LTm CD8 a été découverte et est caractérisée par sa séquestration au niveau des niveaux de tissus tertiaires (RM pour « resident memory »)¹²⁸⁻¹³¹. En effet, cette sous-population de LTm reste confinée dans les tissus durant de longues périodes et ne peut recirculer dans le sang. Ces cellules n'expriment pas CCR7 ni S1PR1, deux molécules importantes pour la sortie des tissus, mais ont été d'abord définies par les marqueurs d'expression CD69 et l'intégrine αE CD103^{130,132-135}. Or, ces deux marqueurs jouent un rôle potentiellement important dans leur localisation puisque CD69 empêche la sortie des LT CD8 du tissu en bloquant l'activité de S1PR1 tandis que CD103 peut se lier à différents substrats, dont la E-cadhérine, exprimées dans différents tissus¹³⁵⁻¹³⁷. Cependant, tous les RM n'expriment pas CD103, son expression semblant être confinée aux RM de certains tissus uniquement, tels que l'intestin et la peau, les organes lymphoïdes secondaires et le foie^{133,138,139}. Ces LT CD8 migrent continuellement au sein du tissu, ce qui permet d'augmenter la probabilité de rencontrer son antigène en cas d'infection¹⁴⁰⁻¹⁴². Ces cellules sont en première ligne pour la détection du pathogène et pour l'activation d'une réponse immunitaire lors d'une réinfection. Ces cellules ont la capacité d'éliminer directement des cellules cibles par activité cytolytique ou par production de cytokines notamment l'IFN- γ ^{143,144}. De plus, la production rapide de cytokines au site d'infection permet d'améliorer le recrutement de cellules immunitaires provenant du sang, telles que les LT CD8 effecteurs, les LTEM, les cellules NK, les LT B et des DC¹³⁸. Enfin, à la suite d'une infection dont les RM ne sont pas spécifiques, ces cellules agissent alors comme des cellules de l'immunité innée par la production de cytokines, limitant ainsi la progression de l'infection.

Ces trois sous-populations de LTm CD8 ont des rôles complémentaires. Les CM permettent une meilleure élimination de pathogène infectant les organes lymphoïdes secondaires et permettent une prolifération secondaire massive lors d'un deuxième défi immunitaire¹⁰³. Les EM patrouillent dans tous les organes, dont le sang, et peuvent être activés immédiatement après leur rencontre avec une cellule cible, contrairement aux CM. Les RM, eux, localisent directement aux sites les plus sensibles aux infections sans recirculer dans le sang. Ils ont non seulement la capacité d'éliminer une cellule infectée aussitôt qu'ils l'ont reconnue, mais améliorent aussi le recrutement d'autres acteurs importants, dont les EM, pour l'élimination d'agents infectieux. Ces cellules ont de plus un rôle dans le contrôle de pathogènes

pour lesquels ils ne sont pas spécifiques. De nombreux éléments restent à découvrir la génération de ces trois sous-populations. En particulier, il reste à découvrir quels signaux contrôlent leur différenciation, mais aussi quelles sont leurs contributions relatives à l'élimination d'agents infectieux ou de tumeurs.

1.4.4 L'homéostasie des lymphocytes T mémoires

Les LTm CD4 et CD8 ne requièrent pas la présence de l'antigène pour survivre, mais dépendent des signaux induits par les deux cytokines IL-7 et IL-15^{71,145,146}.

Les signaux induits par l'IL-7 stimulent la survie des LTm notamment en maintenant l'expression de Bcl-2. En effet, suite à une infection par VSV-OVA, les LT CD8 OT-1 déficients pour le récepteur à l'IL-7 expriment de plus faibles niveaux de Bcl-2 et meurent au cours du temps⁷¹. La surexpression de Bcl-2 dans les LT CD8 déficients suffit pour rétablir le maintien des LTm à long terme¹⁴⁷. Par ailleurs, une autre étude démontre que le déclin de la population de LTm lorsque la signalisation par l'IL-7R est défectueuse n'est pas la conséquence d'une prolifération plus faible de ces cellules suite à une infection par Lm¹⁴⁸.

La signalisation via l'IL-15R permet de stimuler la prolifération homéostatique des LTm. L'absence d'IL-15 ou la délétion génétique de la chaîne α du récepteur à l'IL-15 dans les LT CD8 n'empêche pas la génération de LTe et de LTm fonctionnels¹⁴⁶. Cependant, la population de LTm générée suite à une infection LCMV diminue progressivement due à une absence de prolifération homéostatique de celle-ci. En effet, le transfert adoptif des LTm déficients pour la chaîne α marqués au CFSE révèle une absence de la dilution de ce marqueur contrairement à ce qui est observé lors du transfert de LTm sauvages. Cela indique que la stimulation de ce récepteur permet d'induire la prolifération homéostatique des LTm.

1.4.5 Les modèles de différenciation des lymphocytes T CD8 mémoires

Encore aujourd'hui, les mécanismes moléculaires permettant la génération de LTm ne sont pas bien compris. Plusieurs modèles existent pour tenter d'expliquer comment les LTm sont générés et sont présentés ci-dessous.

1.4.5.1 Le modèle des précurseurs distincts

Ce modèle repose sur le fait que chaque LT CD8 naïf est préprogrammé, soit pour devenir un LTe différencié de façon terminale et mourir lors de la phase de contraction, soit pour survivre à long terme et de se différencier en LTm (Figure 5A). Cela suggérerait que ce choix de différenciation a été préprogrammé dans le thymus lors de la maturation des thymocytes. Cependant, il est peu probable que ce modèle soit le bon puisque le transfert adoptif d'un seul LT CD8 naïf peut donner à la fois des LTe différenciés de façon terminale, mais aussi des LTm¹⁴⁹. Ces résultats sont supportés par une seconde étude dans laquelle il était possible de suivre le devenir d'un LT CD8 naïfs grâce à un code barre¹⁵⁰.

1.4.5.2 Le modèle du potentiel décroissant

Dans ce modèle, ce serait les expositions répétées aux signaux antigéniques et à l'inflammation qui conduirait à la différenciation terminale des LT CD8 (Figure 5B). Ainsi, plus les LTe sont exposés à ces signaux et plus ils perdent la capacité de proliférer, d'exprimer CD127 et de survivre. Ainsi, il y aurait un spectre de différenciation des LTe qui relaterait de l'historique des signaux qu'ils ont reçus¹⁵¹. Ce modèle est supporté par plusieurs études dans lesquelles soit la présence de l'antigène, soit l'inflammation a été diminuée précocement en traitant les souris avec des antibiotiques ou par l'utilisation de modèle d'immunisation n'induisant très peu d'inflammation. En effet, ces études ont démontrées que réduire l'inflammation permet d'accélérer la génération de LTm^{60,81,152,153}. Enfin, une dernière étude a permis d'identifier des LT CD8 qui sont activés tardivement soit 3 jours après l'infection¹⁵⁴. Ils sont appelés « latecomers », car ils sont activés alors que l'infection est déjà en cours d'élimination. Ainsi, ces derniers perçoivent moins longtemps la présence de l'antigène et de l'inflammation ce qui conduit leur différenciation en LTm centraux.

1.4.5.3 Le modèle de la force du signal

Ce modèle permet aussi d'expliquer la grande hétérogénéité des populations effectrices et mémoires. En effet, l'état de différenciation serait la conséquence de la « force » totale des 3 signaux reçus par les LTe CD8 en cours d'activation (Figure 5C). La différence avec le modèle de potentiel décroissant réside dans le fait que la différenciation s'effectuerait très précocement. Ainsi, une forte signalisation via les 3 signaux requis pour activer un LTn permet la génération de LTm. Cependant, une signalisation trop forte favorise plutôt une différenciation terminale des LTe, les empêchant de survivre. Ce serait ainsi, la force du signal perçu qui dirigerait les choix de différenciation.

1.4.5.4 Le modèle la division asymétrique

Dans ce modèle supporté par plusieurs études, les LTe CD8 différenciés de façon terminale ainsi que les précurseurs de LTm peuvent provenir d'un même LTn (Figure 5D). En effet, ce modèle propose que, lors de la division cellulaire, la cellule fille en contact avec la CPA (cellule fille proximale) reçoive un fort signal provenant du TCR, de la costimulation et des signaux inflammatoires, favorisant la différenciation terminale. Au contraire, la cellule distale recevrait de plus faibles signaux d'activation permettant leur différenciation en LTm si l'on intègre le modèle de la force du signal ou celui du potentiel décroissant. Ce modèle est supporté par plusieurs études dans lesquelles il a été montré que lorsque les LTe se divisent alors qu'ils interagissent encore avec la CPA, la division est inégale puisque certaines molécules sont inégalement réparties entre les cellules filles. Ainsi, la cellule proximale hérite préférentiellement du récepteur à l'IFN- γ , exprime plus fortement CD69, CD25, T-bet et mTORC1 tandis qu'elle exprime de plus faibles niveaux de CD62L, CD127 par rapport à la cellule distale¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Ces résultats sont en accord avec ce modèle. Les cellules filles proximales semblent avoir un phénotype caractéristique des LTe différenciées de façon terminale tandis que les cellules filles distales ont plus un phénotype caractéristique des précurseurs de LTm.

1.4.5.5 Le modèle de dédifférenciation

Deux études ont récemment mis en évidence que les LTm CD8 humains et murins proviennent de la dédifférenciation des LTe^{116,159}. Dans la première étude, les auteurs

démontrent que, dans un modèle d'infection virale chez la souris, les promoteurs des gènes fortement exprimés par les LTn, parmi lesquels les promoteurs des gènes codant pour CD62L, CCR7, CD127, sont méthylés par l'enzyme DNA méthyltransférase 3 alpha (Dnmt3a), ce qui conduit à une diminution de leur expression et ce, y compris dans les MPEC¹⁵⁹. Au contraire, les promoteurs des gènes associés aux fonctions effectrices des LTe sont eux déméthylés et exprimés rapidement dans les SLEC ainsi que dans les MPEC. Cependant, lors de la transition des LTe en LTm, les méthylations ajoutées par la Dnmt3a sont perdues, permettant ainsi la réexpression des gènes initialement exprimés dans les LTn tandis que la majorité des déméthylations acquises lors de la transition des LTn en LTe sont gardées. Bien que les gènes associés à la fonctionnalité des LT CD8 restent déméthylés, ces derniers ne sont plus exprimés aux stades mémoires. Cependant, la déméthylation de ces loci permet une réexpression rapide de ces molécules en cas de restimulation antigénique. La seconde étude, qui étudie la génération des LTm, est effectuée chez l'humain à la suite d'une vaccination avec le virus atténué de la fièvre jaune¹¹⁶. Les auteurs ont utilisé plusieurs régimes d'administration d'eau lourde (D₂O) lors de la réponse lymphocytaire T CD8 dirigé contre le virus de jour 0 à jour 14. De façon intéressante, la dilution du D₂O dans l'ADN des LT CD8 spécifiques pour le virus de la fièvre jaune montre une cinétique biphasique avec une dilution rapide du marqueur dans les deux premières semaines après l'arrêt de l'administration du D₂O (soit entre jour 14 et 28), puis une dilution graduelle moins importante suggérant que les LT CD8 effectuant la transition LTe en LTm proviennent de cellules ayant proliférées rapidement. De plus, suite à l'administration du D₂O entre les jours 14 et 28 post-vaccination, la dilution de ce dernier suit une courbe monophasique et extrêmement faible démontrant que, suite à leur activation, les LT CD8 prolifèrent massivement, puis entrent dans une phase de quiescence au stade mémoire avec un rythme de division homéostatique très faible. En effet, deux ans après la vaccination, la majorité des LTm spécifiques pour le virus de la fièvre jaune proviennent de la cohorte originale. Ces cellules ont proliférées lors des deux premières semaines en réponse au vaccin. En plus de l'analyse de dilution du deuterium, les auteurs ont réalisé des expériences d'ATAC-seq et RNA-seq sur les LTn, LTe et LTm spécifiques au virus de la fièvre jaune. De façon intéressante, les résultats obtenus suggèrent, comme c'était le cas dans l'étude précédente chez la souris, que les LTm proviennent d'une sous-population de LTe suite à l'élimination du pathogène et qui, non seulement diminue l'expression des molécules effectrices exprimées au stade effecteur, mais

réexprime aussi les molécules exprimées par les LTn tel que Bcl-2, IL7R, CCR7. Ainsi, ces deux études suggèrent que les LTm proviennent d'une sous-population de LTe qui se sont dédifférenciés au cours du temps^{116,160}.

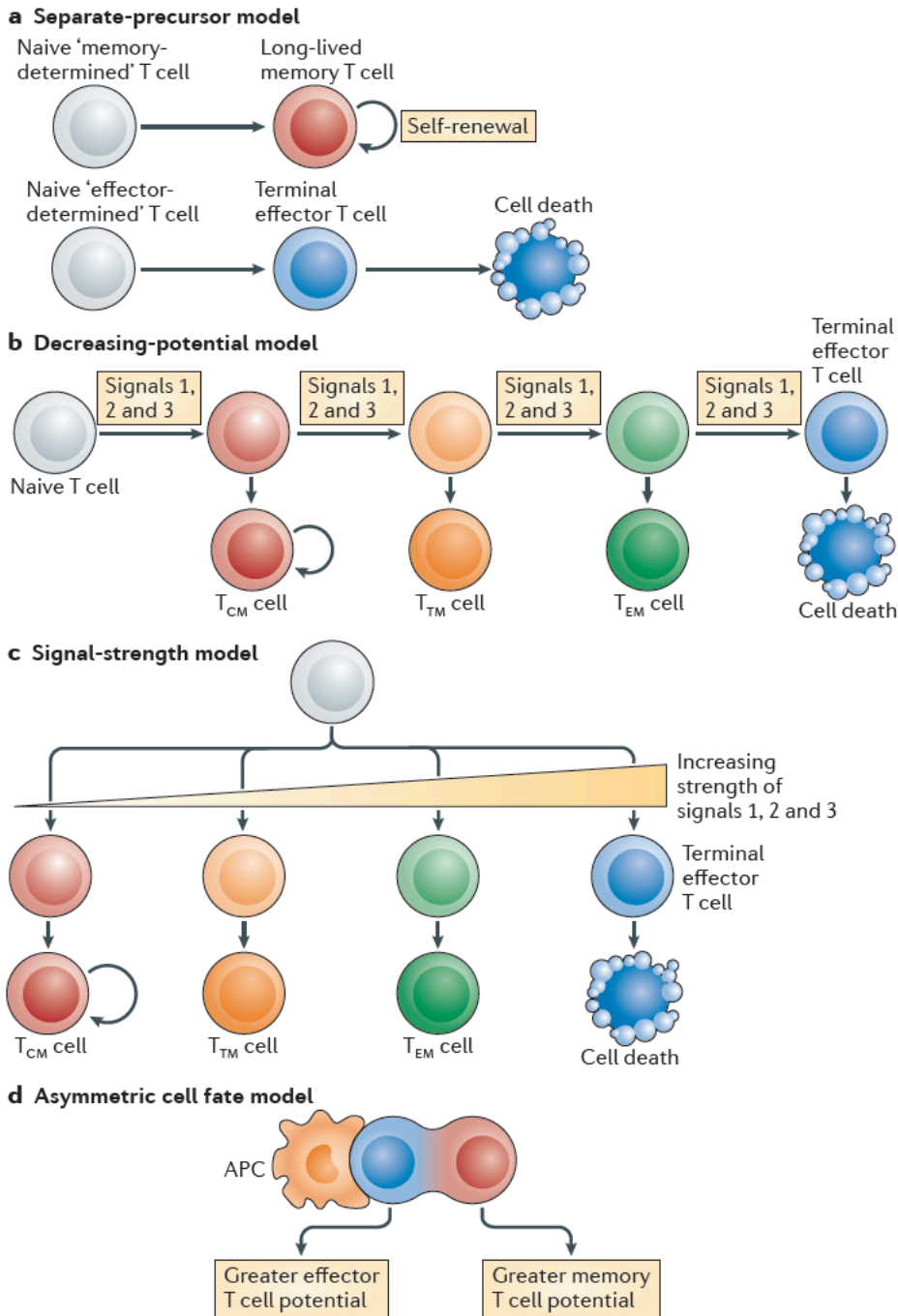


Figure 5. Les quatre modèles de différenciation des LTm. En gris, les LTn ; en bleu, les LTe différenciés de façon terminale ; en rouge, les LTCM ; en orange, les LTm différenciés de façon intermédiaire entre les LTCM et les LTEM⁷². En vert les LTEM⁷².

1.5 Les facteurs de transcription contrôlant la réponse lymphocytaire CD8

Durant et suite à leur activation, les LT CD8 sont exposés à une variété importante de signaux dont les quantités perçues peuvent être différentes d'un LT CD8 à un autre. C'est ce qui explique la diversité des sous-populations générées lors d'une réponse lymphocytaire CD8. En effet, l'intégration de ces signaux conduit ultimement à l'activation et l'expression plus ou moins importante de divers facteurs de transcription qui met alors en place, supporte et maintient un programme transcriptionnel supportant la différenciation des LT CD8 (Figure 6).

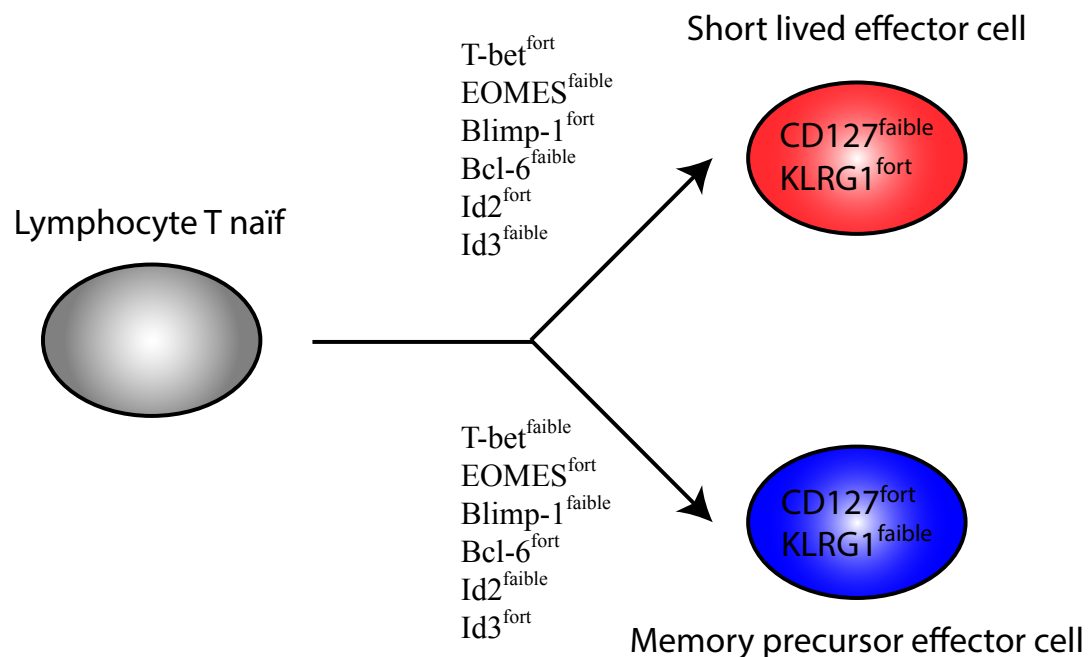


Figure 6. Expression relative des facteurs de transcription lors de la réponse lymphocytaire CD8.

1.5.2 T-bet, EOMES et RUNX3

Les facteurs de transcription hautement homologues, T-bet et EOMES font partie de la même famille des T-box et participent tous les deux à moduler la réponse immunitaire

adaptative. Ces deux facteurs de transcription ont des rôles redondants pour assurer la génération de LTe CD8 fonctionnels, mais aussi des rôles opposés dans la différenciation des LT CD8.

La voie de signalisation du RCT induit rapidement l'expression de T-bet qui à son tour induit l'expression de molécules essentielles à la fonctionnalité des LT CD8, à savoir, l'expression de l'IFN- γ et de la GrzmB^{161,162}. RUNX3, un facteur de transcription fortement exprimé dans les LT CD8 activés qui collabore avec T-bet aux promoteurs de gènes cibles pour induire leur expression, parmi lesquelles figurent l'IFN- γ et la GrzmB¹⁶³. Plus tard dans la réponse, le facteur de transcription RUNX3 induit l'expression d'EOMES qui peut maintenant induire l'expression de la perforine et maintenir l'expression de l'IFN- γ ¹⁶⁴. Les deux facteurs de transcription, EOMES et T-bet ont donc pour rôle d'assurer la mise en place et le maintien de la fonctionnalité des LT CD8 au cours de la réponse. En accord avec cela, la double délétion de ces facteurs de transcription conduit à une différenciation aberrante des LT CD8 puisque ceux-ci expriment moins d'IFN- γ et de GrzmB, mais commencent à produire de l'IL-17, empêchant ainsi l'élimination de la souche aiguë du virus LCMV⁷⁷. Il a de plus été démontré que ces deux facteurs de transcription collaborent pour induire l'expression de CD122, soit la chaîne β du récepteur à l'IL-15, une cytokine importante pour la survie des LTm¹⁶⁵.

Ces deux facteurs de transcription, EOMES et T-bet, ont aussi des rôles opposés dans la différenciation des LT CD8. T-bet est en effet plus exprimé dans les SLEC tandis qu'EOMES est plus exprimé dans les MPEC au pic de la réponse¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. De plus, la délétion génétique de T-bet dans les LT CD8 empêche la génération des SLEC sans affecter la génération des MPEC tandis que la délétion d'EOMES n'a que peu d'effets sur la génération d'effecteurs, mais conduit à une attrition de la population de LTm à des temps plus tardifs et empêche la génération de TCM¹⁶⁶.

1.5.3 Blimp-1 et Bcl-6

La délétion de Blimp-1 dans les LT CD8 conduit à une perte totale de la génération des SLEC favorisant la différenciation des cellules en MPEC¹⁷⁰⁻¹⁷². Ce facteur de transcription contrôle donc la différenciation terminale des LT CD8. Celui-ci collabore en partie avec T-bet pour induire l'expression de gènes importants pour la différenciation SLEC¹⁷³. De plus, il a été

démontré que celui-ci est nécessaire pour réprimer les gènes nécessaires à la différenciation des LTm¹⁷³. Cela repose sur le fait que Blimp-1 peut se lier au promoteur du facteur de transcription Bcl-6 (« B cell lymphoma 6 ») afin de réprimer sa transcription. Or, Bcl-6 est essentiel à la génération des TCM et à la réponse secondaire des LTm¹⁷⁴⁻¹⁷⁷. Étant donné que ce facteur de transcription est exprimé rapidement suite à l'activation et que celui-ci est capable de réprimer l'expression de Blimp-1, il est supposé que le choix de différenciation dépend de la balance d'expression entre Blimp-1 et Bcl-6.

1.5.4 Id2 et Id3

L'absence de la protéine Id2 au sein des LT CD8 empêche la génération de SLEC au profit des MPEC induisant un délai dans l'élimination de Lm-OVA^{178,179}. Plus tard dans la réponse, l'absence d'Id2 corrèle avec une absence totale de TEM. Il a été démontré plus récemment qu'Id2 limite la génération de LTm en inhibant l'activité transcriptionnelle de E2A (« Immunoglobulin Enhancer-Binding Factor E12/E47 »)¹⁸⁰. Son expression est inversement corrélée avec celle d'Id3, dont l'expression est tout d'abord réprimée suite à la reconnaissance antigénique, puis réexprimée dans les MPEC et LTm¹⁷⁹. La délétion d'Id3 dans les LT CD8 n'empêche pas l'établissement d'une réponse effectrice efficace, mais abolit la génération de LTm à longue durée de vie suggérant que cette protéine est importante dans la transition des effecteurs en LTm¹⁸¹. Il a par ailleurs été démontré que Blimp-1 est capable de réprimer l'expression d'Id3 afin d'induire une différenciation terminale des LTe^{179,181}.

1.6 Les facteurs influençant la réponse des lymphocytes T CD8

Chaque LT CD8 a besoin de recevoir trois signaux pour être activé de façon optimale. Cependant, la qualité ainsi que la quantité des signaux reçus peuvent varier grandement entre deux LT CD8 répondant au même agent infectieux. Or, c'est précisément ces différences qui permettent l'établissement d'une réponse lymphocytaire CD8 hétérogène permettant à ces derniers d'effectuer des choix de différenciation qui vont déterminer s'ils vont mourir lors de la

phase de contraction ou au contraire survivre à long terme. Dans ce dernier cas, d'autres choix de différenciation détermineront s'ils seront des CM, EM ou RM.

1.6.2 Signal 1 : la reconnaissance antigénique

Une première étude a mis à profit le transfert adoptif de LT CD8 OT-I dans des souris receveuses qui ont été infectées avec différentes souches de *Listeria monocytogenes* exprimant différents variant du peptide SIINFEKL (OVA). Chacun de ces variants possède une affinité différente et connue pour le RCT, permettant ainsi d'évaluer la contribution de l'affinité du complexe RCT-agoniste sur la réponse des LT CD8. Ainsi, même une faible affinité entre le RCT et son ligand est suffisante pour activer efficacement les LT CD8 (prolifération rapide et acquisition de fonctions effectrices)¹⁸². Cependant, une trop faible affinité conduit à une contraction précoce durant laquelle tous les effecteurs peuvent mourir, ne laissant place qu'au LT ayant interagit avec le complexe CMHI-peptide antigénique de plus fortes affinités.

Dans une seconde étude menée dans notre laboratoire, nous avons découvert que la densité d'épitope présenté par des CPA telles que des « bone marrow derived DC » (BMDC) pouvait aussi influencer la génération de LT CD8 mémoires sans affecter la réponse des LTe¹⁸³. En effet, une faible densité d'épitope à la surface des BMDC ne permet pas l'induction du programme génétique responsable de la différenciation des LTm et conduit à l'arrêt précoce de la prolifération des LT CD8. Ceci serait la conséquence de temps d'interaction plus court entre la CPA et le LT CD8.

Dans une troisième étude, les auteurs ont analysé les effets d'une mutation ponctuelle générée dans le motif CART du domaine transmembranaire de la chaîne β du RCT¹⁸⁴. Cette mutation permet la génération de LTe fonctionnels, mais la polarisation du RCT au sein de synapses immunologiques ne se produit pas, affectant ainsi l'activation de la voie NF κ B et empêchant la génération de LT CD8 mémoires.

Ces résultats suggèrent que la formation de la synapse immunologique est importante pour la génération de LT CD8 mémoires. Peut-être que la formation de la SI permet une interaction plus longue avec la CPA conduisant à une activation complète des LT CD8 capables de générer des LTm. Ceci implique que la densité d'épitope et l'affinité entre le RCT et son ligand soient suffisantes.

1.6.3 La costimulation

1.6.3.1 CD28

Lorsque les LT CD8 rencontrent l'antigène pour lequel ils sont spécifiques en absence de costimulation, cela active la « mort cellulaire induite par activation » (ou « activation-induced cell death » en anglais ou AICD)¹⁸⁵⁻¹⁸⁸. L'induction de l'apoptose peut se produire par deux mécanismes distincts. Le premier nécessite l'interaction de la molécule Fas avec la protéine Fas-ligand (FasL), toutes les deux exprimées à la surface des LT CD8 tandis que le deuxième implique des protéines associées à la membrane de la famille de Bcl. Or, la costimulation via le CD28 permet d'empêcher l'AICD de se produire^{185,186,189,190}. Notamment, cette voie de costimulation permet d'inhiber l'expression de FasL et active la transcription de c-FLIP, une protéine qui inhibe les caspases initiateuses de l'apoptose Cas8 et Cas10, empêchant ainsi l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose¹⁸⁷. De plus, l'interaction de CD28 avec ces ligands conduit à l'activation de la voie Pi3k/PKB. Or, l'activation de PKB empêche la formation du complexe DISC (pour « death-inducing signaling complex ») constitué de FasR, la protéine adaptatrice faisant le lien entre FasR et les caspases 8 et 10 et FADD inhibant là encore l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose¹⁹¹. De plus, la voie de CD28 favorise l'expression des molécules anti-apoptiques Bcl-2 et Bcl-X_L et affecte la balance entre survie et apoptose¹⁹².

1.6.3.2 La famille des récepteurs au « tumor necrosis factor » (TNFR)

L'activation de la voie 4-1BB soutient la prolifération des LTe CD8, améliore grandement leur activité cytotoxique et régule positivement la taille du réservoir de LTm sera maintenu au cours du temps¹⁹³⁻¹⁹⁷. En effet, l'emploi d'anticorps anti-4-1BB, conçu pour activer la voie, conduit à une prolifération plus importante des LT en cours d'activation et augmente leur activité cytotoxique dans le cadre d'une maladie du greffon contre l'hôte^{195,196}. De façon intéressante, la délétion de 4-1BBL n'empêche pas la génération de LTe au pic de la réponse, mais conduit un pool de LTm plus faible que dans des souris sauvages suite à une infection par le virus de la grippe¹⁹³. Étrangement, dans le cas d'une infection avec la souche aiguë du virus

LCMV, moins d'effecteurs sont produits dans les souris déficientes pour 4-1BBL¹⁹⁷. Cela peut être la conséquence du type de réponse inflammatoire qui diffère entre les deux modèles d'infection. Une autre explication est possible. Dans la première étude réalisée avec le virus de la grippe, l'analyse de la réponse a été faite en restimulant les LT CD8 avec un peptide spécifique du virus de la grippe tandis que dans la seconde étude, le suivi de la réponse a été faite à l'aide d'un tétramère, ce qui est plus précis.

1.6.4 Signal 3 : Les médiateurs solubles

1.6.4.1 Interleukine 12

La voie de signalisation du récepteur à l'IL-12 contrôle différents aspects de la réponse lymphocytaire CD8. Premièrement, cette voie de signalisation agit sur les CPA pour induire l'expression de CCL1/17, ce qui augmente la durée d'interaction entre la cellule T et la CPA, leur permettant ainsi une activation¹⁹⁸. Ensuite, l'immunisation de souris avec la forme non virulente de *T. gondii* ou suite à l'infection de souris avec Lm n'exprimant pas la sous-unité p35 de l'IL-12 conduit à la génération moins importante de LTe au pic de la réponse^{38,199}. Ceux-ci présentent les caractéristiques des MPEC (forte expression de CD127) et expriment de plus faible niveau d'expression de la cytokine IFN- γ . Cela s'explique par le fait que l'activation de la voie à l'IL-12 favorise l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR^{200,201}. Or, l'activation de cette voie conduit à la phosphorylation du FT FoxO1, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome^{202,203}. Ce FT est responsable d'induire l'expression de CD127, EOMES, mais aussi de réprimer l'expression de T-bet²⁰⁰⁻²⁰². Ainsi, l'absence de signaux induits par l'IL-12 conduit à une faible activité de la voie PI3K-Akt-mTOR, permettant une activité optimale de FoxO1, ce qui entraîne une faible expression de T-bet, un FT essentiel pour induire le programme transcriptionnel des SLEC. En accord avec cela, la charge bactérienne est augmentée en absence de stimulation par l'IL-12 suite à une infection par Lm³⁸. En revanche, malgré une plus faible proportion de LTe au pic de la réponse, la génération de mémoire est beaucoup plus importante en l'absence d'IL-12 lorsque l'on observe le taux de génération de LTm. Cela est probablement, en partie, la conséquence d'une plus forte expression de CD127, induit par FoxO1. Il a de plus été démontré que la surexpression d'une forme constitutivement active de FoxO1, en présence

ou en absence d'inhibiteur de mTOR, induit une forte expression de CD62L de façon indépendante de mTOR 5 jours post-stimulation *in vitro*²⁰³. Dans cet article, les auteurs démontrent que l'inhibition de mTOR minimise la différenciation terminale des LTe tout en favorisant leur expansion.

1.6.4.2 Les interférons de type I

De nombreuses infections induisent les IFN de type I, notamment le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), les virus de l'herpès, le virus de la vaccine ainsi que le virus LCMV²⁰⁴⁻²⁰⁶. L'absence du récepteur au IFN de type I ne permet pas la génération de LTe au pic de la réponse dirigée contre l'infection par le virus LCMV, empêchant ainsi le contrôle de la charge virale^{51,207}. En effet, les LT CD8 déficients pour le récepteur de l'IFN de type I présentent un défaut majeur d'expansion. De plus, l'IL-12 et l'IFN- α semble avoir des rôles redondants puisque le traitement de LTe en cours d'activation modifie la structure de la chromatine de façon similaire puisque de nombreux promoteurs des mêmes gènes se retrouvent acétylés²⁰⁸. Les gènes importants dans l'acquisition des fonctions effectrices, de la survie et de la prolifération sont surreprésentés. Parmi ces gènes, on compte ceux codant pour les protéines CD25, l'IFN- γ et la GrzmB. Enfin, le prétraitement de LTn avec l'IFN- α et l'IFN- β les présensibilisent, ceux-ci s'activant plus rapidement que des LTn non traités²⁰⁹.

1.6.4.3 L'IL-2

En plus de soutenir la prolifération des LT CD8, cette voie permet le contrôle des choix de différenciation des LT CD8. Plus précisément, c'est l'intensité et la durée d'activation de cette voie qui contrôlent le choix de différenciation SLEC/MPEC. En effet, suite à une infection aiguë par la souche Armstrong du virus LCMV, tous les effecteurs précoces commencent à exprimer fortement CD25. C'est plus tard dans la réponse, entre jour 3.5 et 5 post-infection que son expression devient biphasique²⁰⁹. Les cellules ayant diminué son expression ont des phénotypes qui s'apparentent à ceux de LTm, expriment de faibles niveaux d'expression de Blimp-1, un facteur de transcription essentielle à la différenciation des SLEC, et de plus forts niveaux d'expression de CD62L. À l'inverse, les cellules T qui maintiennent une forte expression de CD25 commencent à exprimer KLRG1, les protéines effectrices IFN- γ , perforine et GrzmB à jour 5 post-infection et meurt suite à leur transfert dans une souris ayant été infectée

en même temps que les donneuses ce qui révèle leur incapacité à se différencier en LTm. Ces cellules ont, de plus, une capacité cytotoxique supérieure au LTe ayant diminué leur expression de CD25²¹⁰. Plus récemment, notre laboratoire et une autre équipe ont révélé que la voie de l'IL-2 permet l'induction de l'expression de Blimp-1 et T-bet, deux facteurs de transcription essentiels à la différenciation en SLEC *in vivo*^{172,210,211}. Au sein des LT CD8 qui maintiennent l'expression de CD25, l'expression de Blimp-1 est soutenue ce qui favorise la génération des SLEC^{124,171,172,212}. La signalisation via l'IL-12R et le récepteur des IFN de type I permet le maintien de l'expression de CD25, ce qui induit une prolifération soutenue des LT au cours du temps⁴¹. De plus, l'absence d'IL-2 à des temps précoces de la réponse n'empêche pas la génération de LTm CD8, mais leur capacité à proliférer de nouveau suite à un second défi immunologique est grandement diminué¹²⁴. Enfin, la voie de l'IL-2, comme celle de l'IL-12 favorise l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR, ce qui entraîne la dégradation du FT Foxo1. Celui-ci ne sera donc plus en mesure de réprimer l'expression de T-bet et n'aura pas non plus la capacité d'induire l'expression de CD127 et EOMES, ce qui favorise la différenciation terminale des LT CD8.

1.6.4.4 L'aide CD4

L'absence de l'aide CD4 n'impacte pas seulement la réponse effectrice des cellules T CD8 mais peut aussi affecter la génération de LTm, leur phénotype et leur fonctionnalité^{219,221,222,224,230,231}. Plusieurs mécanismes sont impliqués. Premièrement, en absence d'aide CD4 lors de la réponse primaire, les LT CD8 commencent à exprimer la protéine TRAIL (« TNF-related apoptosis-inducing ligand ») en réponse à une restimulation, ce qui conduit à l'activation de la voie de mort cellulaire induite par activation (AICD). Cependant, il est important de noter que la délétion génétique de TRAIL ne restaure pas la prolifération normalement induite lors d'une réponse secondaire, suggérant que d'autres mécanismes sont en causes²²⁴. En revanche, le traitement ponctuel avec de l'IL-15 lors de l'immunisation primaire de souris restaure la génération de LTm malgré l'absence d'aide CD4²²⁰. L'ajout d'IL-15 corrèle avec une augmentation des protéines Bcl-2 et Bcl-XL et diminue l'expression des molécules pro-apoptotiques Bax et caspase3, ce qui serait responsable de restaurer la différenciation de LTm.

Un autre effet du « licencing » des CPA est de permettre au LT CD8 de produire de l'IL-2 qui agira alors de façon autocrine en induisant notamment l'expression de la protéine NGFI-A-binding protein 2 (NAB2), un répresseur transcriptionnel responsable d'inhiber la transcription de TRAIL, permettant ainsi une réexpansion secondaire optimale des CD8²³².

Le système immunitaire est très efficace pour éliminer les infections. Cependant, il existe un certain nombre de micro-organismes pathogènes qui peuvent persister à long terme et ainsi établir une infection chronique. La réponse lymphocytaire CD8 ne suffit pas pour éliminer rapidement ce type d'agent infectieux. Les LT CD8 répondant à de telles infections sont incapables de se différencier en LTm et se différencient plutôt en LT CD8 dits épuisés. En effet, ils perdent progressivement leur capacité à proliférer et à produire des cytokines. Les mécanismes moléculaires conduisant à l'épuisement des LT CD8 sont discutés dans la section suivante.

1.2 La réponse lymphocytaire CD8 suite à une infection chronique

Lors d'une infection chronique ou suite au développement d'une tumeur, les LTe sont incapables de générer des LTm, mais se différencient en un sous-type unique de cellules T CD8 dit « épuisé » (Figure 7)^{103,233,234}. En effet, suite à une infection chronique, les cellules T CD8 s'activent et se différencient en LTe fonctionnels en une semaine environ^{103,233}. Cependant, la persistance de l'antigène et de l'inflammation induite par les infections chroniques conduit à une perte graduelle de leur fonctionnalité^{103,233,235}. La perte de fonctionnalité est hiérarchique et commence par la perte de production d'IL-2 accompagnée d'une diminution importante de la capacité à lyser des cellules cibles *in vitro*. Ces cellules perdent ensuite la capacité à proliférer en réponse à une stimulation antigénique. À des stades intermédiaires de l'épuisement, on observe une perte de la production de TNF- α alors que la production d'IFN- γ est encore préservée. C'est uniquement dans les cas sévères d'épuisement que l'on observe une perte de production d'IFN- γ et, dans certains cas, l'épuisement des LT peut conduire ultimement à leur délétion physique (Figure 7)^{103,233,236}.

Un modèle intéressant pour comprendre comment l'épuisement des LT CD8 s'installe consiste en l'utilisation de deux souches du virus LCMV qui induisent soit une infection aiguë, soit une infection chronique. En effet, ces deux souches sont très proches puisque seuls trois acides aminés les distinguent sans que cela n'affecte les épitopes reconnus par les LT CD8²³⁷⁻²³⁹. La souche Armstrong (LCMV-Arm) induit une infection aiguë qui est éliminée en 8 jours post-infection tandis que la souche clone 13 (LCMVcl13) induit une infection chronique dont la virémie persiste pendant presque 3 mois^{237,238}. Ainsi, il est possible de comparer la réponse des LT CD8 reconnaissant les mêmes épitopes selon que celle-ci prenne place suite à une infection chronique ou aiguë par le même virus.

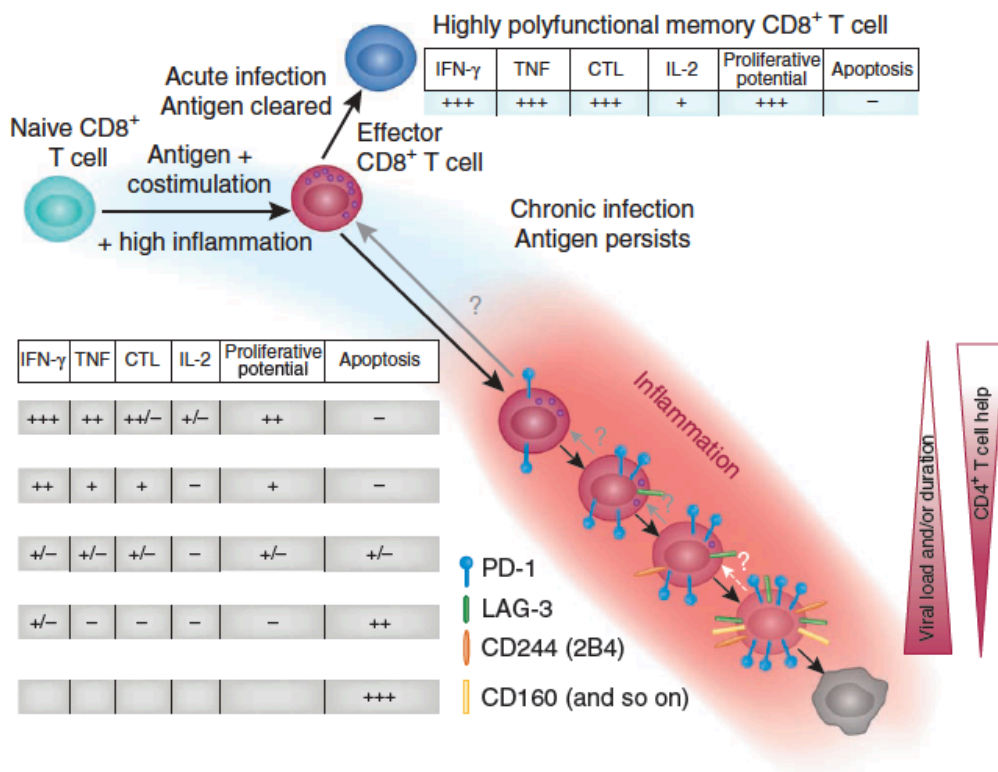


Figure 7. Différenciation des LT CD8 en LTm suite à une infection aiguë ou en LT CD8 épuisés lors d'une infection chronique. En haut, la différenciation des LTe en LTm suite à une infection aiguë et leur fonctionnalité. En bas, la différenciation progressive des LT CD8 épuisés lors d'une infection chronique. La perte progressive de leur fonctionnalité est représentée sous forme de tableau en fonction de la charge virale. L'expression progressive des récepteurs inhibiteurs est aussi représentée. Adapté de²⁴⁰.

1.2.1 La persistance de l'antigène

Il a été démontré que ce facteur est essentiel à l'établissement de l'épuisement puisqu'il existe une corrélation directe entre la charge virale dans le sang et la capacité des LT CD8 à produire différentes cytokines, dont l'IFN- γ , le TNF- α ainsi que l'IL-2¹⁰³. De plus, pour la même charge virale au sein d'une même souris, au sein d'un même organe, les épitopes qui sont présentés en plus grande quantité induisent un plus fort épuisement chez les LT CD8 qui les reconnaissent¹⁰³. En effet, suite à une infection chronique avec le virus LMCVcl13, les LT CD8 immunodominant lors d'une infection aiguë, NP396-404 (Db/NP396) et GP34-43 (Kb/ GP34), disparaissent environ 25 jours post-infection alors que les LT CD8, normalement sous-dominants lors d'une infection aiguë, répondent fortement¹⁰³. Ces résultats supportent un rôle essentiel de la persistance antigénique dans l'établissement de l'épuisement des LT CD8.

1.2.2 Les récepteurs inhibiteurs

La présence continue d'antigène induit la co-expression soutenue de plusieurs récepteurs inhibiteurs de l'activation des LT CD8 suite à une infection chronique ou lors d'un cancer^{234,241-245}. L'importance de l'expression de ces récepteurs inhibiteurs dans l'établissement de l'épuisement des LT CD8 n'est plus à démontrer puisque le blocage de ces récepteurs, seuls ou en combinaison, conduit à une amélioration importante de la réponse des LT CD8 contribuant au meilleur contrôle de l'infection en cours ou de la croissance tumorale^{242,243,246-249}. Plus les LT CD8 expriment de récepteurs inhibiteurs à leur surface, plus l'état d'épuisement est avancé^{241,246}. Les différents récepteurs inhibiteurs et leurs ligands sont schématisés dans la figure 8.

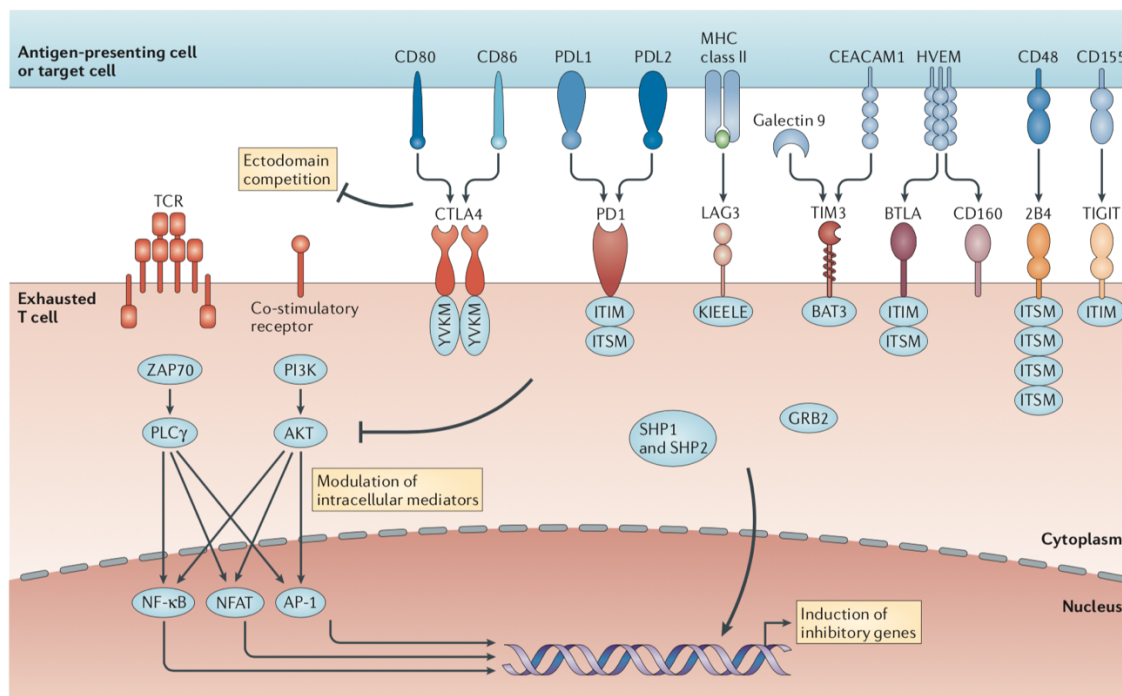


Figure 8. Les récepteurs inhibiteurs associés à l'épuisement des LT CD8. Adapté de ²⁵⁰.

1.2.2.1 PD-1

1.2.2.1.1 PD-1 et ses ligands

Le récepteur PD-1 (« Programmed cell death 1 » en anglais) peut interagir avec deux ligands, PD-L1 (B7-H1; CD274) et PD-L2 (B7-DC; CD273). Ce récepteur est un membre de la famille CD28. Son domaine intracellulaire est composé de séquences ITIM et ITSM (« immunoreceptor tyrosine-based switch motif » en anglais). L'expression de PD-L1 est exprimée constitutivement à la surface de nombreuses cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques tandis que PD-L2 est principalement exprimé par les CPA. Cependant, l'expression de ces deux ligands peut être augmentée par des signaux inflammatoires^{251,252}.

1.2.2.1.2 Fonction de PD-1 dans la réponse lymphocytaire CD8

Suite à une infection aiguë, les LT CD8 expriment de façon transitoire la molécule PD-1, et n'empêche pas l'élimination du pathogène. Son expression permet d'atténuer et d'arrêter l'activation des LT CD8 afin de contrôler le nombre de cellules qui répondent²⁵³. Suite à une

infection chronique ou lors d'un cancer en développement, l'expression de PD-1 reste élevée à la surface des LT CD8, ce qui contribue fortement à l'épuisement de ceux-ci^{234,243,254}. En effet, le blocage de ce récepteur ou de ses ligands conduit à une forte amélioration de la fonction des cellules T contribuant au meilleur contrôle de la charge virale suite à des infections chroniques ou à une diminution de la croissance tumorale dans le cas de cancer chez l'humain et chez la souris^{241,246,248,249,254-258}. En effet, l'inhibition de cette voie à des stades tardifs lors d'une infection chronique ou dans le cas de cancers conduit à une augmentation de la survie des patients ou des souris, ce qui corrèle avec une meilleure prolifération et une meilleure fonctionnalité des LT CD8.

1.2.2.1.3 Mécanisme par lequel PD-1 régule la réponse des LT CD8

Plusieurs mécanismes permettent de comprendre comment cette voie de signalisation induit l'épuisement des LT CD8. Premièrement, lorsque le récepteur PD-1 rencontre l'un de ses ligands, celui-ci devient phosphorylé au niveau de ses ITSM, ce qui permet le recrutement des « SH2-domain containing tyrosine phosphatase » (SHP-1 et SHP-2) qui inhibent alors l'activité des molécules d'activation proximales du RCT ainsi que des molécules de la voie de costimulation, telles que Zap70 et PI3K²⁵⁹⁻²⁶². Deuxièmement, cette voie permet d'induire l'expression de gènes parmi lesquels plusieurs sont connus pour inhiber l'activation des cellules T dont celui codant pour la protéine BATF²⁶³. En effet, BATF forme un dimère avec le facteur de transcription c-Jun, ce qui exclut c-Fos et inhibe ainsi la transcription induite par AP-1 suite à l'activation du RCT²⁶⁴. De plus, le complexe BATF-c-Jun peut induire l'expression d'autres gènes²⁶⁵. Troisièmement, cette voie de signalisation réprime l'expression de PGC-1 α (« Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator » en anglais), un FT important pour induire les gènes nécessaires pour le changement métabolique qui s'opère au stade effecteur^{266,267}. Ainsi, l'expression de PD-1 dérégule le métabolisme des LT CD8 répondants au virus LCMVcl13, induisant ainsi leur épuisement²⁶⁶.

1.2.2.1.4 Régulation de l'expression de PD-1

Le promoteur du gène codant pour la protéine PD-1, *Pdcd1*, contient deux régions conservées (CR-B et CR-C) essentielles pour induire son expression²⁶⁸. Ces deux régions comprennent de nombreux sites de liaison à différents facteurs de transcription et se situent

respectivement à -100 paires de bases (pb) et -1,1kpb du site d'initiation de la transcription. Parmi les sites de liaison présents sont présents ceux de NFκB, NFATc1, FoxO1, T-bet ainsi que des séquences « IFN stimulated response elements » (ISRE)²⁶⁸⁻²⁷¹. La présence de ces deux séquences est requise pour l'expression optimale de PD-1^{268,271}. Il existe probablement d'autres éléments de réponse en dehors de ces deux régions puisque la forme active du facteur de transcription Notch peut se fixer dans la région codante de PD-1, au niveau de l'exon 1 et de l'intron 1²⁷². Au sein des LT CD8 naïfs, qui n'expriment pas PD-1, les deux régions CR-B et CR-C sont fortement méthylées. Lors d'une infection aiguë, l'activation des LT CD8 conduit à la déméthylation de ces régions permettant à l'ADN de se décondenser. Ainsi, les facteurs de transcription peuvent être recrutés sur leurs sites consensus afin d'induire l'expression du gène²⁷³. Plus tard dans la réponse, l'expression de PD-1 ainsi que l'état de méthylation sont inversement proportionnels à la quantité d'antigène encore présent. En effet, la région promotrice de PD-1 est de nouveau méthylée lors de l'élimination de l'antigène. Cependant, lors d'une infection chronique, la persistance de l'antigène empêche la méthylation *de novo* de se produire²⁷⁴. De plus, 8 jours après l'infection par LCMVcl13, le retrait total de l'antigène par le transfert adoptif des LT CD8 épuisés dans un hôte naïf qui est ensuite infecté avec le virus LCMV-Arm ne permet pas d'observer une augmentation de la méthylation du promoteur de PD-1, suggérant qu'une empreinte héréditaire est transmise aux cellules filles, empêchant la répression de la transcription du gène²⁷⁵⁻²⁷⁷. De façon similaire, les niveaux d'expression de PD-1 restent élevés dans les LT CD8 de patients infectés par le VIH pourtant traités aux antirétroviraux, ce qui conduit pourtant à une diminution importante de la virémie²⁷⁸.

1.2.2.2 Lag-3

Cette protéine ressemble fortement à la molécule CD4 d'un point de vue structural et elle peut lier, avec une meilleure affinité que CD4, la molécule de CMHII. Cependant, la LSEctine, une molécule de la famille de DC-SIGN, serait aussi capable d'interagir et d'activer Lag-3²⁷⁹. La déficience de Lag-3 dans les cellules T affecte positivement la prolifération des LT CD8 suggérant un rôle négatif de cette protéine dans l'activation de ces cellules^{280,281}.

Peu de choses sont connues sur cette voie de signalisation. Cependant, cette protéine serait capable de former un complexe avec les molécules de CD3 et celui-ci serait à l'origine de l'inhibition de flux calcique, de la production de cytokine et de la prolifération des cellules T²⁸².

Enfin, l'injection d'anticorps bloquant Lag-3 en combinaison avec des anticorps bloquant PD-1 améliore considérablement la prolifération et la fonction des LT CD8 épuisés^{247,283}. Cependant, bloquer Lag-3 seul n'a que peu d'effets sur l'épuisement des LT CD8.

1.2.2.3 Tim-3

Cette protéine a été découverte il y a 14 ans, à la surface de LT CD4 Th1 et de LT CD8 produisant de l'IFN- γ ²⁸⁴. Son expression, avec celle de PD-1, permet d'identifier les LT CD8 fortement épuisés dans le cas de mélanome chez l'humain²⁸⁵. De plus, le blocage de ce récepteur par des anticorps bloquants, seuls ou en combinaison avec le blocage de la voie PD-1 permet de restaurer partiellement la fonctionnalité des cellules T et leur capacité à proliférer²⁸⁵. En accord avec cela, le blocage de la voie Tim-3 conduit à des symptômes plus sévères dans le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)²⁸⁴. Enfin, l'activation de la voie par l'un de ses ligand, la Galectine 9, induit la mort des LT CD4 Th1, ce qui diminue les symptômes induits par EAE²⁸⁶. Par ailleurs, il a été rapporté dans plusieurs études que la signalisation induite par la liaison de la Galectine 9 avec Tim-3 conduit à la dysfonction des LT CD4 et CD8, pouvant même induire la mort de ces derniers lors d'infection avec HSV chez la souris, d'infection HCV chez l'humain, dans le cancer du colon ou encore dans le cas de carcinome hépatocellulaire induit par le virus de l'hépatite B,²⁸⁷⁻²⁹⁰. Cependant, le rôle de la Galectine 9 comme ligand de Tim-3 fait débat puisqu'il existe une étude qui rapporte que la présence de Galectine 9 n'inhibe pas l'activation des LT humains et qu'elle n'interagit pas avec Tim-3²⁹¹. Dans cette études et contrairement à ce qui avait été précédemment démontré, les auteurs rapportent que le blocage de Tim-3 ne permet pas de restaurer la réponse allogénique des LT Th1 humains ni de restaurer la fonctionnalité des LT CD8 issus de patients infectés par le VIH stimulés avec les peptides Gag et Nef^{285,287,291}.

Le domaine cytoplasmique de cette protéine contient 5 tyrosines qui peuvent être phosphorylées par de nombreuses kinases impliquées dans l'activation de la voie du RCT, telles que Lck ou Fyn^{292,293}. En absence de ligand, la forme phosphorylée de Tim-3 est associée à la protéine Bat3 (« HLA-B associated transcript 3 »). Celle-ci peut alors recruter la forme active de Lck, ce qui contribue à l'activation de la cellule T. La liaison de Tim-3 avec son ligand, Gal-9 ou Ceacam-1, libère Bat3-Lck et Tim-3 peut alors interagir avec la protéine Fyn^{293,294}. Fyn

active alors la « phosphoprotein associated with glycosphingolipid » (PAG) qui, à son tour, recrute Csk pour inhiber l'activité de Lck et ainsi diminuer la voie de signalisation du RCT^{295,296}.

1.2.2.4 2B4

Cette protéine est membre de la famille « signaling lymphocyte activation molecule » (SLAM) et son activation peut avoir des effets positifs ou négatifs sur la réponse des cellules T chez l'humain comme chez la souris²⁹⁷⁻³⁰². Comme PD-1, le domaine cytoplasmique contient 4 ITSM qui peuvent être phosphorylés par des kinases de la famille Src, Fyn et Lck^{303,304}. Une fois phosphorylée au niveau des ITSM, cette protéine recrute différents partenaires tels que SHP-1, SHP-2, SAP et EAT-2³⁰⁴⁻³⁰⁸. Tout comme pour PD-1, le recrutement de SHP-1 et SHP-2 induit un effet négatif sur l'activation de la voie du RCT³⁰³. Au contraire, la liaison de SAP sur les ITSM phosphorylés de 2B4 permet le recrutement de Fyn qui alors phosphorylera 2B4 et ainsi amplifiera le signal³⁰⁹. La forme phosphorylée de 2B4 peut aussi induire l'activation de LAT, une protéine adaptatrice essentielle à la voie de signalisation du RCT, permettant ainsi une activation optimale du flux calcique, de Pi3K, des MAP-kinases³¹⁰⁻³¹². De plus, cette voie permet le contrôle de l'expression de gènes cibles, dont des molécules effectrices impliquées dans la cytotoxicité notamment, mais aussi des molécules proapoptotiques telles que Bim³⁰¹.

1.2.2.5 CD160

Cette protéine transmembranaire à un passage possède un petit domaine cytoplasmique et elle peut être modifiée de façon post-traductionnelle par l'ajout d'un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). Étonnamment, elle a tout d'abord été identifiée comme une molécule de costimulation qui favorisait la prolifération et l'acquisition de fonctions effectrices dans le cas de lignées de cellules T et de cellules « natural killer » (NK)³¹³⁻³¹⁵. Ce sont des années plus tard que la liaison de CD160 avec ses ligands, HVEM et BTLA, a été identifiée comme inhibant la prolifération des LT CD4³¹⁶. Toutefois, la co-expression de CD160 et 2B4 (CD244) identifie chez l'humain une sous-population de LTe ayant une forte capacité cytotoxique, suggérant que cette protéine ait deux fonctions opposées dans l'activation ou l'inhibition des cellules T³¹⁷. Les mécanismes expliquant comment CD160 agit ne sont pas connus, mais pourraient être similaires à ceux de Tim-3, dont les effets peuvent être opposés.

1.2.2.6 CTLA-4

Cette molécule fait partie de la famille des récepteurs B7-CD28 et est critique pour la régulation négative de l'activation des cellules T. Cette molécule contrôle en effet la prolifération, la progression du cycle cellulaire ainsi que la production d'IL-2 et ce, par divers mécanismes^{318,319}. Le premier consiste à entrer en compétition avec la molécule de costimulation CD28 pour interagir avec leurs ligands, CD80 et CD86. La protéine CTLA-4 se lie en effet à ces deux molécules avec une meilleure affinité et avidité que le CD28 et empêche ainsi le LT de recevoir le signal de costimulation³²⁰. En plus d'interagir avec les protéines CD80 et CD86, CTLA-4 est responsable de diminuer l'expression de ces protéines par un mécanisme de transendocytose, responsable du transfert des molécules de la famille B7 de la surface des CPA vers l'intérieur de la cellule T³²¹. De surcroît, l'interaction de CTLA-4 avec les protéines de la famille B7 induit la production d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), responsable du catabolisme du tryptophane, un acide aminé essentielle pour la prolifération des LT^{322,323}. Il a par ailleurs été démontré que la phosphorylation de CTLA-4 induit le recrutement des phosphatases SHP-2 et PP2A, deux protéines capables d'inhiber les voies du RCT et de la costimulation respectivement³²⁴.

1.2.3 Les médiateurs solubles

Lors d'une infection chronique, la persistance du pathogène induit continuellement la production de médiateurs solubles dont certains ont un rôle proinflammatoire alors que d'autres sont au contraire immunosuppresseurs.

1.2.3.1 Interférons de type I (IFN de types de I)

Les IFN- α et IFN- β sont encore fortement exprimés par les DC de la rate à jour 9 post-infection lors d'une infection chronique, suggérant que ces cytokines sont produites tout au long de l'infection³²⁵. Bien qu'elles aient un rôle important dans l'élimination du pathogène lors d'une infection aiguë et qu'elles participent positivement à l'élaboration d'une réponse lymphocytaire CD8 optimale, ces cytokines participent à l'établissement de l'épuisement des cellules T CD8. Cette voie de signalisation induit en effet l'expression des régulateurs négatifs

de l'activation des LT CD8, l'IL-10 et le ligand de PD-1, PD-L1 exprimé par les DC CD8 α -négatives de la rate³²⁶. La contribution des IFN de type I dans l'établissement de l'épuisement des LT CD8 sera discutée plus bas. Le blocage du récepteur aux IFN de type I au moment de l'activation des LT CD8 ou 10 jours post-infection permet de contrôler complètement une infection chronique par le virus LCMVcl13^{325,326}. Ce traitement thérapeutique affecte la migration des cellules T naïves, favorisant une localisation dans la pulpe blanche de la rate à 5 et 14 jours post-infection et requiert la présence de LT CD4³²⁶. Ce traitement améliore la réponse des LT CD4 qui pourrait indirectement améliorer la réponse des LT CD8^{250,326}. Enfin, l'exposition prolongée à ces cytokines, ou plus généralement à un milieu proinflammatoire, dans le cadre d'une réponse lymphocytaire CD8 aiguë dirigée contre VSV empêche la transition des LTe en LTm³²⁷.

1.2.3.2 Interleukine 10

Cette cytokine particulièrement immunosuppressive est exprimée par de nombreux types cellulaires dans le cadre d'une infection chronique et son expression est induite notamment chez les DC suite à une stimulation de ces cellules avec des IFN de type I^{326,328-330}. L'utilisation de souris déficientes ou non pour l'IL-10, ou ayant été traitées avec un anticorps bloquant cette cytokine durant toute la phase effectrice, empêche l'épuisement des cellules T CD8, ce qui conduit à l'élimination rapide de l'infection chronique induite par le virus LCMVcl13^{331,332}. Ces résultats suggèrent un rôle important de l'IL-10 dans l'établissement de l'épuisement des LT CD8. De plus, l'utilisation combinée d'anticorps bloquant à la fois les récepteurs inhibiteurs PD-1 avec des anticorps bloquants la voie de l'IL-10 synergisent pour empêcher l'épuisement des LT CD8 et conduit à une élimination encore plus rapide du virus LCMVcl13³³³.

1.2.3.3 Le « transforming growth factor » (TGF- β)

Cette voie de signalisation est encore fortement activée dans les LT CD8 9 jours après une infection par le virus LCMVcl13 contrairement à ce que l'on observe suite à une infection avec LCMV-Arm, suggérant que cette voie est continuellement active lors d'une infection chronique³³⁴. De plus, la délétion génétique des récepteurs de cette cytokine sur les cellules T induit une meilleure survie des LT CD8, celles-ci exprimant de plus faibles niveaux d'expression de la protéine proapoptotique Bim^{334,335}. Cela conduit à une élimination rapide du

virus LCMVcl13 permettant la génération de LTm^{334,335}. Cependant, le traitement de souris infectées avec le virus LCMVcl13 avec des anticorps bloquant de la cytokine TGF- β n'améliore pas l'élimination du virus³³⁵.

1.2.3.4 Interleukine 2 et interleukine 15 (IL-2 et IL-15)

Suite à une infection par le virus LCMVcl13, l'expression de la chaîne partagée entre les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15, CD122 est induite et atteint son maximum d'expression 6 jours post-infection^{336,337}. Son expression diminue lentement jusqu'à 65 jours post-infection. De façon similaire, l'expression de la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2, CD25, est fortement induite 4 jours après l'infection, mais retourne au niveau basal 4 jours plus tard³³⁷.

La délétion de CD25 au sein des LT CD8 suite à une infection chronique avec le virus LCMV ou avec le virus cytomégalovirus MCMV n'empêche pas la génération de LTe 8 jours post-infection³³⁸. Cependant, ceux-ci disparaissent rapidement entre le jour 15 et le jour 30 post-infection. Cette disparition est associée avec une diminution importante de leur fonctionnalité³³⁸. Ainsi, la voie de signalisation à l'IL-2, activée grâce à l'expression de CD25, semble importante pour la survie des LTe CD8 suite à une infection chronique.

Plus récemment, un rôle important des voies de l'IL-2 et de l'IL-15 dans l'établissement de l'épuisement dans les LT CD8 suite à une infection chronique par le virus LCMV a été découvert^{336,337,339}. En effet, l'expression de la chaîne partagée entre les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15 identifie les cellules hautement épuisées³³⁷. De plus, la délétion de cette chaîne au sein des cellules T CD8 conduit à une plus faible expression des récepteurs inhibiteurs à leur surface et corrèle avec une meilleure survie de ces cellules. Enfin, la déficience de ce récepteur améliore leur capacité à produire des cytokines et restaure leur capacité à se différencier en LTm d'après leur niveau d'expression de EOMES, Bcl-6, CD127 et CD62L³³⁷. Ces résultats suggèrent que ces deux voies de signalisation, IL2 et IL-15, jouent un rôle important dans l'établissement de l'épuisement des LT CD8 lors d'une infection chronique.

1.2.3.5 Interleukine 21 (IL-21)

Cette cytokine, exprimée par les cellules T CD4 lors d'une infection chronique, est importante pour soutenir la fonctionnalité et la survie des LT CD8. En effet, l'expression de son récepteur à la surface des LT CD8 est essentielle pour la survie à long terme, la prolifération de

ces cellules ainsi que pour maintenir leur fonctionnalité. Cette cytokine est donc importante pour le contrôle la charge virale³⁴⁰⁻³⁴⁵.

1.2.4 Facteurs de transcription et programme transcriptionnel des lymphocytes T épuisés

Tous les signaux reçus par les cellules T lors d'une infection chronique conduisent à l'expression de gènes cibles dont certains sont des facteurs de transcription qui permettent l'établissement de l'épuisement de ces cellules. D'un point de vue transcriptionnel, les LT CD8 épuisés sont différents des LTn, LTe et LTm et constituent une population à part entière²³⁴. En plus d'avoir un programme transcriptionnel qui leur est propre, les cellules T épuisées présentent des modifications épigénétiques qui assurent sa stabilité et de sa propagation de cellules mères en cellules filles³⁴⁶⁻³⁴⁹. L'établissement d'un tel programme génétique permettrait dans le cas d'infection persistante d'empêcher le système immunitaire d'avoir des effets néfastes et potentiellement mortels sur l'hôte.

1.2.4.1 Blimp-1

Ce facteur de transcription est fortement exprimé par les LT CD8 épuisés³⁵⁰. Cela est consistant avec son rôle de répresseur transcriptionnel de gènes impliqués dans la mise en place du programme transcriptionnel associés aux LTm. La déficience du gène codant pour Blimp-1 dans des LT CD8 répondant à une infection chronique conduit à une plus faible expression des RI, une plus faible capacité cytotoxique et à une plus forte expression de marqueurs de LTm³⁵⁰. Cependant, malgré un phénotype semblable à celui des cellules T mémoires, l'absence de Blimp-1 dans les LT CD8 empêche le contrôle de la virémie suite à une infection avec LCMVcl13³⁵⁰. De façon intéressante, des LT CD8 hétérozygotes pour Blimp-1 gardent une activité cytotoxique résiduelle conduisant à un meilleur contrôle de la virémie, suggérant que ce FT, connu pour inhiber la formation des LTm et pour réguler positivement l'expression des récepteurs inhibiteurs, agirait comme un rhéostat moléculaire balançant entre fonction effectrice et épuisement des LT CD8^{350,351}.

1.2.4.2 NFAT

Suite à une infection aiguë, le facteur de transcription NFAT peut migrer jusqu'au noyau, où il peut induire l'expression de gènes cibles, dont ceux codant pour les cytokines. Cependant, lors d'une infection chronique, NFAT ne migre plus jusqu'au noyau, ce qui conduit à une production sous-optimale des cytokines telles que l'IFN- γ ³⁵². Dans une seconde étude, les auteurs ont généré une construction plasmidique codant pour un mutant de NFAT ne pouvant plus interagir avec son partenaire AP-1³⁵³. Lorsque ce vecteur est exprimé dans des LT CD8 répondant à une infection aiguë par le pathogène Lm-GP33, le programme transcriptionnel est aberrant et ressemble à celui de LT CD8 épuisés. Ceci s'accompagne avec une perte des fonctions effectrices et l'expression continue des RI PD-1, Tim-3 et Lag-3, conduisant à l'impossibilité de contrôler la charge bactérienne ou de limiter la croissance tumorale³⁵³. Les auteurs démontrent qu'en absence de son partenaire, NFAT se lie directement aux promoteurs de gènes exprimés dans les LT CD8 épuisés révélant un rôle important de la coopération des FT dans les mécanismes de différenciation^{353,354}.

1.2.4.3 T-bet

Lors d'une infection chronique par le virus LCMVc13, les niveaux d'expression du facteur de transcription T-bet sont plus faibles que lors d'une infection aiguë au sein des LT CD8 à 8 jours post-infection³⁵⁵. La persistance de l'antigène est en effet responsable de la diminution d'expression de T-bet³⁵⁵. La surexpression de ce FT améliore la survie de ces cellules et diminue les niveaux d'expression de PD-1 à leur surface. Plus précisément, T-bet réprime l'expression de Lag-3, CD160 et PD-1 notamment en se fixant directement au promoteur de *Pdcd1* (gène codant pour PD-1) proche de la région CR-B à -500pb du site d'initiation de la transcription³⁵⁵. Ainsi ce facteur de transcription favorise le maintien des fonctions effectrices des LT CD8 et lutte contre l'épuisement de ceux-ci.

1.2.4.4 EOMES

Les niveaux d'expression d'EOMES sont très fortement supérieurs lors d'une infection chronique comparée à une infection aiguë à jour 30 post-infection³⁵⁶. De plus, les cellules exprimant fortement ce FT expriment aussi de forts niveaux de Blimp-1, mais aussi de PD-1, Lag-3, CD160, 2B4 et Tim-3³⁵⁶. Cependant, la délétion génétique d'EOMES diminue

grandement la survie des cellules T épuisées ce qui conduit à une charge virale élevée³⁵⁶. Ces informations suggèrent un rôle important de ce facteur de transcription dans l'établissement de l'épuisement des LT CD8, mais aussi dans le maintien de ces cellules.

1.2.5 Programme transcriptionnel des lymphocytes T épuisés

Suite à une infection aiguë, nous pouvons distinguer différentes librairies de gènes dont l'expression varie en fonction du stade dans lequel la cellule T est engagée, LTn, LTe, LTm. Parmi ces librairies, il y a celui pour lequel les gènes faiblement exprimés au stade naïfs et dont l'expression augmente au stade effecteur, puis diminue de nouveau dans les LTm^{60,63,70,124}. À l'inverse, certains gènes sont fortement exprimés au stade naïf, leur expression diminue fortement dans les LTe et sont réexprimés au stade mémoire. Dans ce dernier, de nombreux gènes, dont CD127, CCR7 et CD62L contribuent au développement des LTm^{60,63,70,124}. Or, suite à une infection chronique, la plupart de ces gènes ne sont jamais réexprimés ce qui conduit, au fil du temps, à un programme transcriptionnel divergent entre LT CD8 épuisés et LTm²³⁴. Une centaine de gènes impliqués ont été identifiés^{234,357}.

1.2.6 Les sous-populations de lymphocytes T épuisés

Suite à une infection chronique, les LT CD8 peuvent être divisés en deux sous-population sur la base de leurs niveaux d'expression de T-bet, EOMES et PD-1 (Figure 9). En effet, les cellules T CD8 exprimant fortement T-bet et de niveau intermédiaire de PD-1 sont définis comme des progéniteurs (T-bet^{fort}PD-1^{int}). Cette population exprime de plus faibles niveaux de récepteurs inhibiteurs et elle est encore capable de proliférer^{355,356}. En se divisant, ces cellules peuvent se différencier en LT CD8 épuisés différenciés de façon terminale, exprimant fortement EOMES et PD-1 (Figure 9)^{283,356}. De plus, le traitement de souris infectées avec LCMVcl13 avec un anticorps bloquant le ligand PD-L1 permet de revigorer la prolifération des progéniteurs uniquement, les cellules exprimant fortement EOMES ayant complètement perdu leur capacité à proliférer^{283,356}.

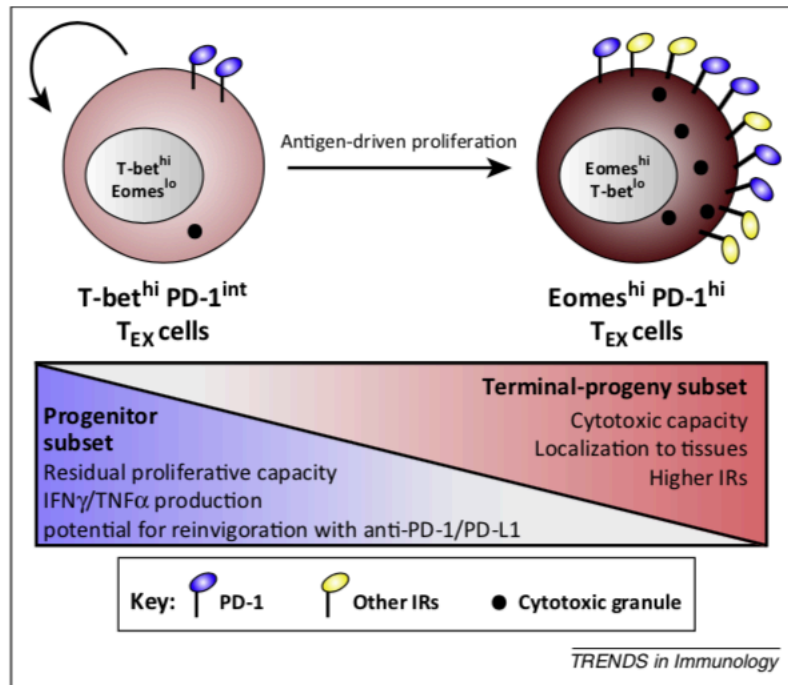


Figure 9. Les sous-populations de LT CD8 épuisés identifiées par l'équipe du Dr E. John Wherry. À gauche, les progéniteurs sont définies par une forte expression de T-bet, une faible expression d'EOMES et des niveaux intermédiaires de PD-1. Ces derniers expriment peu de récepteurs inhibiteurs, sont capables de proliférer et sont revigorés lors d'une immunothérapie bloquant la voie PD-1. En se divisant, ils peuvent se différencier en LT épuisés de façon terminale à droite. Cette sous-population est définie par une forte expression d'EOMES et PD-1 tandis qu'ils expriment faiblement T-bet. Ces cellules expriment de nombreux récepteurs inhibiteurs, ils ont perdu la capacité de proliférer et ils ne sont pas revigorés à la suite du blocage de PD-1. Adapté de ³⁵⁸.

Plus récemment, une nouvelle sous-population de LT CD8 épuisés a été découverte. Celle-ci est définie par l'expression du marqueur CXCR5 et par sa localisation inhabituelle dans les follicules B des organes lymphoïdes secondaires^{249,359-361}. En plus de cette localisation folliculaire et de leur expression du marqueur CXCR5 propre aux LT CD4 folliculaires (T_{FH}), le profil transcriptionnel de cette sous-population est proche de celui des LT CD4 T_{FH}^{249,361}. Cette sous-population exprime de plus forts niveaux de cytokines que les cellules n'exprimant pas CXCR5 (CXCR5⁻), mais une certaine divergence existe sur les niveaux d'expression de RI que ces cellules expriment^{359,362}. Notamment, He *et al* identifient les cellules CXCR5⁺ comme exprimant de plus faibles niveaux d'expression de PD-1 tandis que Utzschneider *et al* qui étudie les LT CD8 TCF1⁺ identifient des niveaux semblables d'expression de PD-1 et Lag-3 entre les

cellules CXCR5⁺ et CXCR5^{-359,362}. Cependant, toutes les études à ce sujet rapportent une plus faible expression de Tim-3 dans les cellules T CD8 folliculaires^{249,359-362}. En accord avec un phénotype moins épuisé des LT CD8 CXCR5⁺, elles ont gardé leur capacité à proliférer au contraire des cellules T CD8 CXCR5^{-249,362}. De plus, le transfert adoptif de LT CD8 CXCR5⁺ ou CXCR5⁻ dans des hôtes infectés avec LCMVcl13 ou dans des hôtes naïfs puis infectés avec LCMVcl13 ou LCMV-Arm révèle qu'en plus d'être la seule sous-population à proliférer, la population CXCR5⁺ constitue la sous-population progénitrice des cellules T CD8 CXCR5^{-249,362}. Enfin, lors d'un traitement bloquant la voie PD-1, les LT CD8 folliculaires sont les seuls qui peuvent être revigorés puisque ceux-ci peuvent améliorer leur capacité proliférative en plus d'avoir un impact positif significatif sur la charge virale suite à leur transfert^{249,359}. Il est tentant d'affirmer que les cellules CD8 CXCR5⁺ correspondent à la sous-population de progéniteurs précédemment identifiée, seulement, cette sous-population est hétérogène en ce qui concerne leurs niveaux d'expression des molécules T-bet et EOMES, indiquant que l'hétérogénéité de ces sous-populations est plus importante que ce qui était initialement défini²⁴⁹. Les LT CD8 folliculaires expriment fortement les facteurs de transcription TCF1 et Bcl-6 essentiels pour leur génération³⁶⁰. Cette sous-population exprime des niveaux plus faibles du facteur de transcription Blimp-1 ce qui est cohérent avec une forte expression de Bcl-6 et avec une meilleure fonctionnalité de ces cellules³⁶⁰. Le facteur de transcription TCF1 est capable de se fixer au promoteur de Bcl-6 pour induire son expression supposément, mais aussi au promoteur de *Prdm1* (gène codant pour Blimp-1), de *Havcr2* (gène codant pour Tim-3) et *Cish* (gène codant pour la protéine « Cytokine Inducible SH2 Containing Protein » Cish) pour réguler négativement leur expression³⁶¹. Enfin, les LT CD8 folliculaires sont les seuls à subsister après l'élimination du virus de l'hépatite C, ce qui supporte l'idée que cette sous-population de cellules est proche des LTm³⁶³.

Ainsi, les LT CD8 répondant à une infection chronique présentent une hétérogénéité importante. Parmi les sous-populations identifiées, certaines semblent moins différenciées puisqu'un traitement bloquant les RI semble revigorer leur fonction et leur capacité à proliférer tandis que d'autres sont différenciées de façon terminale. Ainsi, les sous-populations les moins différenciées semblent être importantes pour maintenir la sous-population de LT CD8 différenciées de façon terminale en se divisant. Ce mécanisme pourrait être important pour

contenir l'infection chronique tandis que l'épuisement des LT CD8 pourrait être une façon de protéger l'hôte d'une réponse immunitaire trop forte et constante, ce qui pourrait nuire à son intégrité.

1.2.7 Épuisement, anergie et sénescence des lymphocytes T CD8

L'état anergique des LT CD8 est induit lorsque ceux-ci sont activés en absence de signal de costimulation²⁵. Ainsi les cellules T anergiques sont incapables de proliférer, produire des cytokines ou encore de lyser des cellules cibles, ce qui s'apparente aux LT CD8 épuisés. Cependant, l'état anergique est induit immédiatement après la rencontre de l'antigène tandis que l'épuisement s'établit progressivement en plusieurs jours, parfois semaines, après la rencontre avec l'antigène. De plus, la signature transcriptionnelle des cellules T épuisées est différente de celle des LT anergiques²³⁴. En effet, certains gènes sont spécifiques à l'anergie tels que, par exemple, *Rnf128*, *Egr2* et *Egr3*. Toutefois, il est à noter que plusieurs gènes montre le même profil d'expression dans les deux cas. L'analyse plus approfondie des gènes différentiellement exprimés entre les LT CD8 épuisés et anergiques permettrait de mieux comprendre les spécificités de chacun de ces états.

La sénescence est caractérisée par un arrêt de prolifération des cellules, comme cela est observé dans le cas de LT CD8 épuisés. Cependant, l'expression des marqueurs KLRG1 chez la souris et CD57 chez l'homme, permettant d'identifier les LT CD8 sénescents, ne sont que très peu exprimés par les cellules T épuisées^{234,256,364,365}. De plus, des LT CD8 sénescents sont toujours fonctionnels, produisant des cytokines et étant cytotoxiques, ce qui n'est pas le cas des LT CD8 épuisés. Ainsi, l'état sénescence semble être un état distinct de l'épuisement bien que les mécanismes moléculaires spécifiques à chacun restent encore à étudier.

1.2.8 Traitements thérapeutiques de l'épuisement des lymphocytes T CD8

Rétablir la fonctionnalité des LT CD8 épuisés est essentiel pour espérer pouvoir guérir les patients atteints de cancer ou d'infection chronique. Récemment, les immunothérapies dirigées contre les récepteurs inhibiteurs ont permis une percée majeure en ce sens améliorant

la réponse des LT CD8 humains et murins suite à une infection chronique ou bien dans le cas de cancer.

1.2.8.1 Les immunothérapies

Dans de nombreux cas, lors d'une infection chronique, l'expression continue de récepteurs inhibiteurs induit la dysfonction et parfois même la délétion des cellules T répondant. Il est suggéré que cet état d'épuisement des LT est induit pour protéger l'organisme hôte contre une forte réponse immunitaire continue, ce qui pourrait endommager de nombreux tissus et éventuellement conduire au décès de l'hôte. Cependant, la persistance des LT épuisés, bien que dysfonctionnels, est associée à un contrôle de la charge virale, permettant de limiter la croissance de l'agent infectieux. Ainsi cet état d'épuisement serait balancé entre la protection de l'hôte des réactions immunitaires fortes à long terme et la protection de l'hôte envers le pathogène²⁴⁰.

1.2.8.2 Infection par le virus de l'hépatite B (HBV)

Ce type d'infection persistante induit un fort état d'épuisement des LT dont l'intensité est inversement proportionnelle avec la virémie^{366,367}. Cet état corrèle avec l'expression soutenue de récepteurs inhibiteurs, dont PD-1³⁶⁶⁻³⁶⁸. De plus, celui-ci est plus fortement exprimé par les LT CD8 intrahépatiques comparé au LT CD8 en périphérie, suggérant que son expression est dépendante de l'antigène³⁶⁹. À l'inverse, le profil d'expression du marqueur de LTm, CD127, est inversement proportionnel au niveau d'expression de PD-1³⁷⁰. Par ailleurs, d'autres études révèlent que des niveaux faibles d'expression de CD127 corrélerent avec une plus forte dysfonction des LT³⁷¹⁻³⁷⁴. De surcroît, le blocage de la voie PD-1 par l'utilisation d'anticorps bloquant PD-L1 permet d'améliorer la réponse des LT CD8 périphériques et intraépithéliaux et notamment leur capacité à produire de l'IL-2^{70,366,375}. En plus de PD-1, certains LT CD8 répondant à l'infection HBV co-expriment Tim-3 et 2B4³⁷⁶. Le blocage de 2B4 permet de restaurer la production d'IFN- γ et cet effet est d'autant plus prononcé si ce traitement est fait simultanément avec le blocage de PD-L1 et PD-L2³⁷⁶.

1.2.8.3 Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Comme pour HBV, lors d'une infection par le VIH, les cellules T co-expriment plusieurs récepteurs inhibiteurs à leur surface et plus le nombre de RI est important à la surface d'une cellule et plus celle-ci est épuisée^{256,377,378}. Notamment, il a été démontré que la fonctionnalité des LT CD8 spécifiques pour le VIH est inversement corrélée avec la charge virale et avec les niveaux de PD-1 exprimés par ces derniers³⁷⁸. De plus, un traitement bloquant le ligand PD-L1 permet de restaurer la survie, la prolifération ainsi que la fonctionnalité des LT CD8 lors d'une restimulation *ex vivo* avec l'antigène³⁷⁸. Certains LT CD8 spécifiques pour le VIH co-expriment PD-1 et CD160 à leur surface, ce qui est associé à une inhibition des voies de survie cellulaire telles que SUMO2, dont l'activité est connue pour réguler négativement l'activité des protéines STAT³⁷⁹. D'autres cellules co-expriment PD-1, CD160 et 2B4 et l'expression de ces RI corrèle avec une forte expression d'EOMES et une expression intermédiaire de T-bet, ce qui identifie généralement des cellules T terminalement différenciées^{356,380}. L'expression d'un autre RI, « T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains » (TIGIT), corrèle avec une incapacité à contrôler la charge virale³⁸¹. Notamment, les cellules co-exprimant TIGIT et PD-1 sont plus fréquentes dans les cohortes de patients qui ne contrôlent pas l'infection et corrèle avec une augmentation de la charge virale dans le sang³⁸¹. Le blocage de ce RI en combinaison avec le blocage de PD-1 améliore la prolifération ainsi que la capacité des LT CD8 spécifiques pour l'antigène GAG du virus à produire de l'IL-2 *in vitro*³⁸¹. L'expression de Tim-3 apparaît progressivement lors de l'infection et corrèle positivement avec la charge virale et négativement avec le nombre de LT CD4³⁸². Les cellules n'exprimant pas ce RI produisent plus fortement la perforine et la GrzmB et ont une meilleure capacité de dégranulation, suggérant que ces cellules ont une meilleure capacité cytotoxique par rapport aux cellules qui l'expriment³⁸³. Le blocage de cette voie par des anticorps bloquants permet de restaurer l'expression de la GzmB et d'améliorer la capacité sécrétoire des LT CD8³⁸⁴. Cependant, il serait intéressant de savoir s'il peut exister un effet synergique en bloquant ce récepteur en combinaison avec des anticorps bloquants ciblant d'autres RI.

1.2.8.4 Cancers

Suite à l'apparition d'une tumeur, une réponse lymphocytaire se met en place dans le but de l'éradiquer. Malheureusement, la persistance de l'antigène en plus de l'environnement supprimeur que génère la tumeur conduit rapidement à un épuisement sévère des LT CD8. Certaines tumeurs expriment directement les ligands des récepteurs inhibiteurs tels que PD-L1. L'interaction de ces derniers avec les récepteurs inhibiteurs exprimés à la surfaces des LT CD8 est alors responsable de l'induction de la perte de la fonctionnalité des cellules T^{385,386}. Plusieurs études ont remarqué que l'expression de PD-1 par les LT infiltrant la tumeur (TIL) est un indicateur de leur dysfonction³⁸⁷⁻³⁸⁹. Cependant, les immunothérapies dirigées contre la voie PD-1 ne permettent pas de soigner tous les cancers et ne sont pas efficaces chez tous les patients. De plus, les cellules T expriment de nombreux autres récepteurs dont les profils d'expression peuvent varier d'un type de cancers à un autre et varier en fonction du stade de la maladie³⁹⁰. C'est autant de paramètres à prendre en compte pour le design d'une nouvelle stratégie thérapeutique.

1.2.8.5 Mélanome métastatique

Ce cancer de la peau apparaît sous la forme d'une tache pigmentée et il commence par se développer horizontalement dans l'épiderme. À ce stade, on parle de mélanome *in situ*. Plus tard, la tumeur continue son développement verticalement dans le derme et l'hypoderme, la tumeur devient alors invasive. De façon similaire à ce qui a été décrit dans le cas d'une infection chronique à HBV, les LT CD8 présents au sein de la tumeur ou présents dans les ganglions lymphatiques drainant celle-ci expriment plus fortement divers RI tels que PD-1, Lag-3, CTLA-4, et Tim-3 comparés à ces mêmes populations de LT CD8 présents dans d'autres tissus dépourvus d'antigène^{391,392}. De plus, les cellules T positives pour le marqueur PD-1 expriment de plus faibles niveaux de cytokine comparées aux cellules qui ne l'expriment pas³⁸⁷. De façon intéressante, la stimulation antigénique des LT CD8 intratumoraux (TIL) *in vitro* combinée au blocage de la voie PD-1 permet de restaurer les fonctions effectrices de LT CD8 reconnaissant l'antigène tumoral NY-ESO-1, mais pas dans le cas de LT CD8 spécifiques pour l'antigène MART-1³⁹³. Or, les cellules T spécifiques pour NY-ESO-1 expriment 5 à 6 fois plus la molécule PD-1 comparée au LT spécifique pour Mart-1, suggérant que le niveau d'épuisement des LT

CD8 dépend de l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. Cependant, nous ne savons pas si cela est dû au fait que ces deux antigènes pourraient être présentés en quantités différentes. D'autres études ont démontré que le blocage de la voie PD-1 n'a aucun effet positif sur la réponse LT CD8 si les ligands ne sont pas exprimés dans la tumeur et ce, même si les cellules T exprimaient de forts niveaux de PD-1³⁹⁴. Cela nous indique que seule l'expression de PD-1 ne suffit à prédire de l'efficacité des traitements, il faut aussi confirmer que PD-1 interagit avec ses ligands dans la tumeur. Par ailleurs, l'effet négatif du RI TIGIT ne s'exerce que lorsqu'il est co-exprimé avec PD-1^{395,396}. De plus, l'expression de son ligand CD155 par les cellules tumorales et les CPA, associée avec une diminution de l'expression de CD226 qui est en compétition avec TIGIT pour lier le ligand CD155 sont deux événements permettant à TIGIT d'induire son effet négatif sur l'activation des LT^{395,396}. De façon intéressante, l'expression simultanée de PD-1 avec CTLA-4 par les TIL présent dans les métastases corrèle avec une forte efficacité des traitements bloquant la voie de PD-1³⁸⁹. Par ailleurs il a été récemment et élégamment démontré qu'une fréquence importante de monocytes classiques (CD14⁺CD16⁻HLA-DR^{fort}) dans le sang des patients atteints de mélanome métastatique permet de prédire l'efficacité d'un traitement bloquant la voie PD-1³⁹⁷. En effet, l'utilisation de la cytométrie de masse (CytoF) a permis d'identifier que les patients qui ont répondu positivement et à long terme à une immunothérapie ciblant PD-1 avaient une fréquence plus élevée de monocytes classiques dans le sang. De plus, l'analyse comparative du transcriptome des monocytes classiques issus des patients répondants ou non au traitement dirigé contre PD-1 n'a révélé aucune différence, confirmant que seule la fréquence de ces derniers est importante pour prédire l'efficacité de l'immunothérapie. Grâce à cette étude, il est maintenant possible de prédire si une immunothérapie dirigée contre PD-1 sera bénéfique ou non pour un patient atteint de mélanome métastatique. Il sera ainsi possible d'orienter les patients prédits comme non-répondants vers des stratégies thérapeutiques plus adaptées et ce, plus rapidement. Enfin cela permettra de ne pas appliquer ces traitements dispendieux à des patients pour lesquels ce dernier ne sera pas efficace.

D'autres études ont mis en évidence certains paramètres comme étant importants pour prédire l'efficacité des immunothérapies. Notamment, il a été démontré que le microbiome des patients est un élément essentiel à prendre en compte lorsqu'une immunothérapie est considérée

pour traiter un cancer³⁹⁸⁻⁴⁰³. En effet, dans une étude récente, les auteurs identifient la prise d'antibiotiques comme un élément prédictif de la résistance à une immunothérapie dirigée contre le récepteur inhibiteur PD-1 ou son ligand PD-L1. En effet, la prise d'antibiotiques diminue significativement la survie des patients traités avec une immunothérapie comparé à des patients traités avec une immunothérapie n'ayant toutefois pas pris d'antibiotique. En comparant les microbiomes des patients répondants ou non aux immunothérapies ciblant PD-1, les auteurs révèlent une sureprésentation de certaines bactéries dont *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*). La transplantation fécale de matières fécales issues de patients répondants à l'immunothérapie dans les deux semaines précédant l'implantation de sarcome murins dans des souris traitées avec anticorps bloquant PD-1 conduit à un délai de la croissance tumorale ainsi qu'à une infiltration importante de LT CD4 dans la tumeur contrairement à des souris ayant été transplantées avec des matières fécales de patients ne répondant pas aux immunothérapies. Enfin, les souris portant une tumeur ayant été gavées avec *A. muciniphila* restaurent l'efficacité des immunothérapies bloquant PD-1, notamment en induisant la production de l'IL-12 par les cellules dendritiques, ce qui augmente le recrutement de LT CD4 Th1 au sein de la tumeur³⁹⁸.

Ainsi, bien que de nombreux mécanismes induisant l'épuisement des LT CD8 aient été découverts et que certaines thérapies existent déjà pour contrer cet état, il n'a pas encore été possible de développer des traitements curatifs pour de nombreux types de cancers et d'infections chroniques. C'est pourquoi il est important d'approfondir nos connaissances sur le sujet.

1.3 La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch a été découverte il y a un peu plus de 100 ans alors que John Dexter et Thomas Hunt Morgan faisaient des études de génétique chez la mouche du fruit en 1914⁴⁰⁴. C'est à la suite de divers croisements qu'ils ont pu observer des mouches mutantes ayant des ailes dentelées (« Notched wings » en anglais), un phénotype qui donnera ce nom à la voie de signalisation. Ça ne sera que dans les années 80, grâce notamment aux avancées en

biochimie, que cette voie et ces différents composants découverts et que son fonctionnement a été élucidé. Nous savons aujourd'hui que cette voie de signalisation, très conservée dans l'évolution, contrôle de nombreux choix de polarisation et de différenciation binaire telles que la différenciation des neurones chez les métazoaires⁴⁰⁵, l'induction du mésoderme durant l'embryogenèse chez *C. elegans*⁴⁰⁶ et le choix de l'engagement vers les lignées lymphoïdes B ou T chez les mammifères⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹. Très peu de choses sont connues sur cette voie dans la réponse des LT matures suite à leur activation et la plupart des études faites jusqu'à maintenant étaient majoritairement faites *in vitro*.

1.3.1 Biologie des récepteurs et des ligands

La voie de signalisation Notch est composée de 4 récepteurs (Notch1 à Notch4) et de 5 ligands (Jagged1, Jagged2, Delta1, Delta3 et Delta4) (Figure 10)⁴¹⁰. Ces récepteurs transmembranaires de type I sont composés d'un domaine extracellulaire contenant 29 à 36 répétitions de type EGF (epiderm growth factor repeat), permettant l'interaction avec le ligand de 3 régions riches en cystéine qui forme le domaine NRR (negative regulatory region) qui empêche l'activation du récepteur de façon indépendante du ligand. Le domaine intracellulaire ou NICD (pour Notch intracellular domain) est composé d'un domaine de liaison à RBPJ-k (RAM domain), de deux signaux de localisation nucléaire, d'un domaine de transactivation (TAD) ainsi que d'un domaine PEST (pour Pro-Glu-Ser-Thr), régulant la stabilité du NICD par le protéasome. Les ligands interagissent avec les récepteurs via leur domaine extracellulaire contenant des répétitions de type EGF. Les ligands contiennent aussi un domaine conservé entre eux, DSL (pour Delta, Serrate et Lag), situé du côté N-terminal de la protéine. Enfin, un domaine riche en cystéine est situé entre les répétitions de EGF et la membrane plasmique pour Jagged1 et Jagged2.

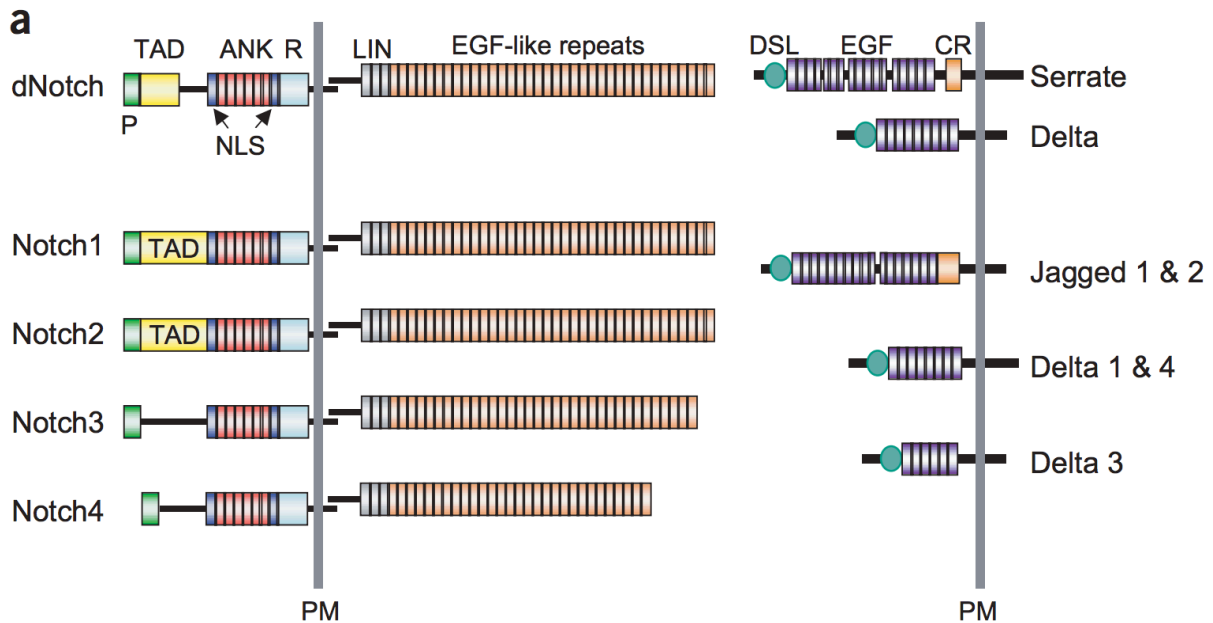


Figure 10. Schéma des récepteurs et ligands de la voie de signalisation Notch chez la drosophile. À gauche, les récepteurs de la voie Notch et leurs domaines. À droite, les ligands de la voie et leurs domaines. Adapté de ⁴¹⁰.

1.3.2 Biogénèse et maturation des récepteurs Notch

Suite à la traduction de l'ARNm codant les récepteurs, la protéine transmembranaire présente à la surface du réticulum endoplasmique doit subir plusieurs modifications post-traductionnelles lors de son transport jusqu'à la membrane pour que les récepteurs soient fonctionnels (Figure 11). En effet, l'une des premières modifications a lieu dans l'appareil de Golgi où le récepteur subit un clivage protéolytique par la furin-like convertase au niveau du site 1 (aussi appelé S1). Les deux fragments de protéine restent associés par des liaisons non-covalentes sous forme d'hétéromères qui pourront alors interagir avec les ligands une fois à la surface. Cependant, le clivage protéolytique du récepteur n'est pas la seule modification que doivent subir les récepteurs pour être fonctionnels. Diverses enzymes, telles que Pofut ou Rumi, ajoutent des groupements O-fucose aux sérines et thréonines ou encore des O-glucose respectivement dans le domaine de répétition de type EGF⁴¹¹⁻⁴¹³. Par la suite, les modifications de type O-fucose peuvent servir d'ancrage pour accueillir de multiples résidus N-Acétyleglucosamine transférés par l'enzyme de la famille Fringe : Lunatic, Radical et

Manic^{414,415}. Ces modifications sont importantes, car elles modifient la qualité de l'interaction des récepteurs avec leurs ligands. En effet, les modifications catabolisées par les enzymes Lunatic et Manic améliorent l'interaction des récepteurs avec les ligands de type Delta-like tout en diminuant la force d'interaction avec les ligands de type Jagged alors que les modifications catabolisées par l'enzyme Radical améliorent l'interaction avec tous les ligands⁴¹⁶. Ainsi, la glycosylation des récepteurs, avant même qu'ils atteignent la surface, représenterait un moyen de réguler l'activité de cette voie de signalisation.

1.3.3 Mécanismes généraux de la voie de signalisation Notch

L'activation de la voie de signalisation requiert généralement l'engagement des récepteurs avec leurs ligands exprimés par une cellule voisine à celle qui reçoit le signal (Figure 11). Cette interaction conduit à un clivage du récepteur Notch libérant ainsi le domaine intracellulaire de celui-ci (NICD pour « Notch intracellular domain »). Celui-ci migre alors jusqu'au noyau où il s'associe avec son partenaire RBPJ κ . Ce dernier est lié à l'ADN au promoteur des gènes cibles de la voie Notch. En absence du NICD, RBPJ κ est associé avec des corépresseurs de la transcription. Cependant, l'association de ce dernier avec le NICD exclut les corépresseurs et induit le recrutement de co-activateurs de la transcription permettant ainsi l'expression des gènes cibles de la voie. Ce mécanisme d'activation de la voie Notch constitue la voie canonique. Néanmoins, plusieurs autres mécanismes d'activation de la voie Notch que l'on regroupe sous le terme d'activation non canonique de la voie Notch étaient découverts. Parmi ces mécanismes, certains sont indépendants des ligands de la voie, d'autres sont indépendants de l'interaction du NICD avec RBPJ κ et même indépendants du clivage du récepteur. De plus, certains effets peuvent être la conséquence d'une interaction de la voie Notch avec d'autres voies de signalisation.

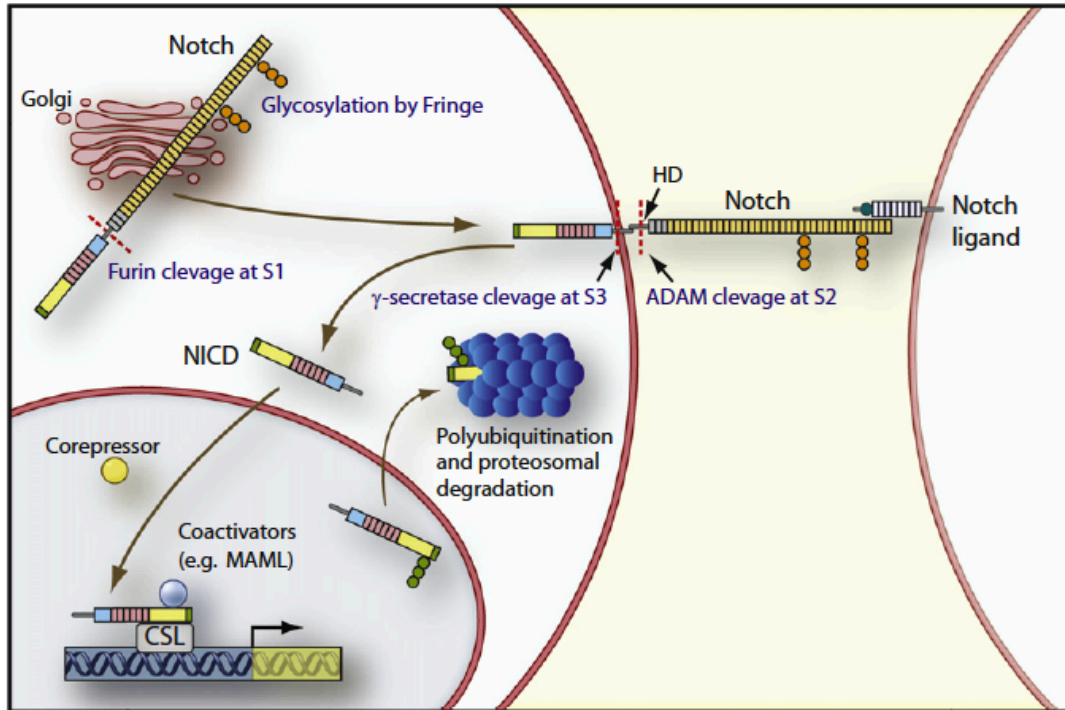


Figure 11. La voie de signalisation Notch. Pour être fonctionnels les récepteurs Notch transiter par l'appareil de Golgi où subissent plusieurs étapes de maturation. Parmi celles-ci, le récepteur Notch doit être clivé au niveau du site S1 par une furine. Celui-ci doit aussi subir plusieurs étapes de glycosylation effectuées par Fringe à la suite de quoi, il est exprimé à la surface des LT CD8. Lorsqu'il interagit avec l'un de ses ligands, il s'en suit un second clivage protéique du récepteur par une protéine ADAM au niveau du site S2, libérant la partie extracellulaire du récepteur. Cet événement permet à la γ -sécrétase de cliver une troisième fois le récepteur au niveau de la membrane, au site S3, ce qui libère le NICD. Celui-ci migre alors jusqu'au noyau où il s'associe avec la protéine RBPJ κ , aussi appelée CSL. La formation de ce complexe favorise le recrutement de co-activateur de la transcription ce qui induit la transcription de gènes cibles. Adapté de ⁴¹⁷.

1.3.3.1 La voie canonique

1.3.3.1.1 Activation de la voie

Lorsque le récepteur rencontre son ligand, il est communément admis qu'il s'exerce alors une force de traction sur le récepteur, ce qui induirait un changement de conformation dans le domaine NRR du récepteur, le rendant accessible au clivage par les métalloprotéases ADAM au site 2 (S2)⁴¹⁸. Une fois le récepteur clivé, il s'en suit un second clivage protéolytique au niveau de la membrane catabolisée par la *gamma*-sécrétase au site 3 (S3), libérant ainsi le

NICD⁴¹⁹. Certains rapportent que ce clivage pourrait se faire directement à la surface cellulaire⁴²⁰⁻⁴²² tandis que d'autres études suggèrent qu'il pourrait prendre place dans l'environnement acide des endosomes suite à l'endocytose de celui-ci⁴²³⁻⁴²⁵. Celui-ci migre alors rapidement jusqu'au noyau où il peut s'associer avec la protéine RBPJ-*kappa*. Cette dernière est déjà fixée à l'ADN et agit de façon négative sur la transcription en recrutant des corépresseurs tels que SMRT ainsi que des HDAC1 et HDAC2 qui contribuent au maintien de la chromatine sous sa forme compacte empêchant ainsi la transcription⁴²⁶⁻⁴²⁸. Le complexe NICD-RBPJ-*kappa* exclut les corépresseurs et recrute à son tour la protéine MAML (Master mind-like) ainsi que des co-activateurs de la transcription tels que p300, PCAF et PBAF⁴²⁹, conduisant à l'ouverture de la chromatine et à l'expression de gènes cibles. Le complexe ternaire NICD-RBPJ-*kappa*-MAML est aussi appelé le « Notch transcription complex » (NTC). Parmi les gènes induits se trouvent ceux de la famille « hairy and enhancer of split-related » (HESR) qui encodent des répresseurs transcriptionnels et sont souvent décrits comme étant les gènes clés de la voie Notch ainsi que ceux de la famille Deltex. Par exemple, nous savons que la transcription des gènes HESR est importante dans la tumorigenèse, dans l'engagement de la lignée T ainsi que dans de nombreux autres choix de différenciation⁴³⁰⁻⁴³².

1.3.3.1.2 Régulation transcriptionnelle des cibles de la voie de signalisation Notch

Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), à l'aide d'anticorps dirigés contre le NICD ou contre RBPJ-*kappa*, suivies de séquençage à haut débit ont permis de mieux comprendre comment Notch induit l'expression de gènes cibles. Les éléments de réponse de la voie de signalisation Notch sur l'ADN existent sous deux formes distinctes. La première est appelée « Notch Responsive Element » (NRE) et consiste en une séquence monomérique d'ADN reconnue par RBPJ-*kappa*, C/tGTGGGAA, présente dans les promoteurs proximaux des gènes cibles, la plupart du temps située proche du site d'initiation de la transcription (TSS pour « transcription starting site ») et associée avec des marques actives de la chromatine telles que l'acétylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 27 (H3K27ac)⁴³³. Les seconds éléments de réponse de la voie de signalisation Notch sont appelés « sequence-paired sites » (SPS), car ils contiennent deux séquences de liaison à l'ADN spécifique pour RBPJ-*kappa* conduisant à la formation d'un homodimère de NTC permettant ainsi de stabiliser le complexe sur l'ADN conduisant à une transcription très rapide des gènes ayant ces éléments

de réponse au sein de leur promoteur⁴³⁴⁻⁴³⁶. Les interactions permettant la formation de cet homodimère se forment au niveau des domaines ANK du NICD et, plus précisément, au niveau de la lysine 1945, de la glutamine 1949 et l'arginine 1984. Des études plus récentes ont démontré que ces deux séquences d'ADN spécifique pour la liaison de RBPJ-kappa doivent être disposées en tête à tête et doivent être espacées par environ 15 à 17pb l'une de l'autre pour que ce complexe se forme⁴³⁶. Contrairement au modèle qui existait depuis longtemps, il a été démontré que 90% de ces sites sont des sites dynamiques, se formant uniquement lorsque la voie de signalisation Notch est active. Cela rompt avec le précédent modèle selon lequel la protéine RBPJ-kappa est déjà fixée à l'ADN avant même que la voie Notch ne soit active.

1.3.3.1.3 Régulation de l'activité de la voie de signalisation Notch

Dans de nombreux cas de cancers où la voie de signalisation Notch est impliquée, beaucoup sont causés par une suractivation de celle-ci, c'est pourquoi l'arrêt de cette voie de signalisation est essentielle. En effet, dans 50% des cas de leucémie lymphoblastique aiguë, la cause est une mutation induisant une activation incontrôlée de cette voie⁴³⁷. Ainsi, le domaine PEST du NICD, riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine permet une fine régulation de la demi-vie de celui-ci. En effet, ce domaine est la cible de nombreuses enzymes qui pourront catalyser divers types de modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitinylation, ce qui conduit à la dégradation de ce dernier.

Le NICD peut être phosphorylé par diverses enzymes telles que la glycogène synthase *beta* kinase (GSK3 β) qui empêche le NICD2 (domaine intracellulaire du récepteur Notch2) d'induire l'expression de ces gènes cibles, mais qui, au contraire, contribue à la stabilisation du NICD1^{438,439}. Le NICD2 peut aussi être inhibé par la phosphorylation dans son domaine PEST lorsque les cellules sont stimulées avec le « granulocyte stimulating factor » (GSF)⁴⁴⁰. Enfin il est connu que la « Cyclin C/cyclin-dependant kinase » (CDK8) est capable de phosphoryler certains sites du NICD qui sont alors pris comme substrat par des ubiquitinases⁴⁴¹.

La demie vie du NICD peut aussi être régulée par l'ubiquitinylation, par des ubiquitines ligases E3 de son domaine PEST⁴⁴². D'autres protéines telles que la F-box et WD-40 domain (Fbxw7) sont capables d'ubiquitinyler le NICD induisant une rapide dégradation du NICD1 par le protéasome sans affecter la quantité du NICD4^{441,443-446}. Par ailleurs, une étude a montré que

la « serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK1) peut interagir avec le complexe NICD-Fbxw7 et accélérer encore plus la dégradation du NICD⁴⁴³.

La protéine NUMB agit aussi de façon négative sur la régulation de la voie de signalisation Notch par le recrutement de l'ubiquitine ligase Itch, favorisant l'endocytose du récepteur ainsi que sa dégradation⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹. La protéine NUMB est aussi capable de réguler négativement cette voie en interagissant avec Itch et Notch1 provoquant son endocytose et favorisant sa dégradation^{447,448}. De la même façon, la protéine Deltex, responsable du cheminement du récepteur à la membrane cellulaire, est aussi responsable de sa dégradation avec l'ubiquitine ligase E3 Itch, en l'absence de stimulation par les ligands.

1.3.3.2 La voie non-canonique

Il n'existe pas un unique mécanisme moléculaire définissant la voie non-canonique de Notch. Ainsi, l'activation de la voie de signalisation Notch peut être indépendante des ligands classiques de type Jagged ou Delta-like et, notamment, il a été démontré que MAGP1 et MAGP2 («Microfibril-Associated Glycoproteins»), YB-1 («Y-box binding protein») et DNER («Delta/Notch Like EGF Repeat Containing») peuvent aussi interagir avec les récepteurs Notch et induire leurs clivages, menant à la libération du NICD⁴⁵⁰⁻⁴⁵².

La voie de signalisation Notch peut aussi contrôler la différenciation cellulaire indépendamment de l'interaction entre le NICD et RBPJ-kappa. Par exemple, dans un système *in vitro*, les auteurs démontrent que l'activation de la voie de signalisation Notch empêche la différenciation de myoblastes et ce, même dans le cas où le domaine d'interaction de RBPJ-kappa avec Notch est manquant^{453,454}. Il a aussi été démontré *in vivo* chez la drosophile que la voie de signalisation Notch régule négativement la différenciation de progéniteurs de muscle à partir du mésoderme et ce, de façon indépendante des ligands classiques de la voie ou encore de RBPJ-kappa⁴⁵⁵.

Enfin, il arrive que la voie soit activée de façon indépendante du clivage de Notch et de la présence du NICD. Notamment, dans le pancréas, le facteur de transcription Ptf1 se fixe directement à RBPJ-kappa, induisant ainsi la transcription de gènes cibles permettant la différenciation des cellules acineuses et des cellules nerveuses⁴⁵⁶⁻⁴⁵⁸. La délétion du NICD dans

ce modèle n'a d'ailleurs pas d'impact sur la différenciation de ces cellules alors que celle de RBPJ-kappa récapitule le phénotype induit lors de la perte de fonction de Pt1fa^{457,458}.

1.3.4 Diversité de réponse suite à l'activation de la voie de signalisation

Notch

Il est difficile de comprendre comment une seule voie de signalisation aussi simple que celle-ci puisse avoir autant d'effets différents sur la différenciation cellulaire. Il est facile d'imaginer que cette voie conduit toujours ou presque à l'induction des mêmes gènes quel que soit le contexte cellulaire, mais ce n'est pas le cas⁴⁵⁹. En effet, les nombreuses études pangénomiques faites sur différents types cellulaires (cellules souches embryonnaires de souris en train de se différencier en ectoderme, en mésoderme ou encore en tissu neural ; des cellules tumorales de colons humains ainsi que des cellules endothéliales lymphatiques humaines) dans lesquels le NICD a été surexprimé indiquent que les gènes cibles directs de la voie de signalisation Notch sont très différents avec peu de chevauchements⁴⁶⁰⁻⁴⁷⁰.

Étant donné que le RBPJ-kappa est déjà fixé à l'ADN avant que la voie soit activée, il est évident qu'il puisse exister un effet de dose. Une forte activation de la voie de signalisation pourrait conduire à établir un complexe activateur de la transcription sur chaque site où est présent RBPJk tandis que seuls certains de ces sites pourraient être transcrits dans le cas d'une quantité limitante de NICD.

La diversité transcriptionnelle que peut induire la voie de signalisation Notch pourrait aussi s'expliquer par des différences épigénétiques selon le type cellulaire étudié, mais aussi par l'interaction du NICD avec d'autres partenaires protéiques, co-activateurs ou corépresseurs de la transcription. Notamment, dans des lignées de cellules humaines, *Wan-Ru Liao et al* ont démontré que le NICD peut se lier au facteur de transcription YY1 et réguler l'expression de gènes ayant dans leurs promoteurs des éléments de réponse à CBF1, tel que C-myc notamment^{471,472}.

Il était pendant longtemps admis qu'en absence d'activation de la voie Notch, RBPJ-kappa était fixé à l'ADN, jouant ainsi son rôle de répresseur transcriptionnel et que c'est l'interaction avec le NICD qui permettait l'activation de la transcription. Or, nous savons

désormais que ce modèle est incomplet, l'expression de RBPJ-kappa étant régulée de façon dynamique par différents signaux tels que, notamment, la présence d'IL-12 dans l'environnement des LT⁴⁷³. Par ailleurs, la liaison de RBPJ-kappa à l'ADN est faible tandis que la constante de dissociation du complexe NICD-RBPJ-kappa est la même lorsque ce dernier est fixé ou non à l'ADN⁴⁷⁴. Ainsi, il est envisageable qu'il existe un mécanisme par lequel les protéines RBPJ-kappa libres pourraient séquestrer le NICD et empêcher son action.

Cette diversité de réponse de la voie Notch selon les types cellulaires étudiés peut s'expliquer par le fait que ces derniers n'expriment pas toujours les mêmes récepteurs Notch. Ainsi, si les différents récepteurs Notch avaient des cibles transcriptionnelles différentes, alors cela pourrait expliquer cette diversité. Or, il existe des évidences soutenant cette hypothèse. La surexpression de Notch3 dans le développement du pancréas empêche la prolifération des cellules épithéliales pancréatiques ainsi que la différenciation des cellules exocrines sans affecter la différenciation des cellules endocrines⁴⁷⁵. Au contraire, la surexpression de Notch1 inhibe la différenciation des cellules endocrines pancréatiques⁴⁷⁶. Les effets entre Notch1 et Notch2 peuvent être opposés. À titre d'exemple, la surexpression de Notch2 favorise l'apparition du cancer embryonnaire du cerveau tandis que Notch1 l'empêche⁴⁷⁷. Les mécanismes expliquant les différences existantes entre les différents récepteurs ne sont pas bien compris encore aujourd'hui, mais pourraient impliquer les différentes configurations des sites de liaisons à l'ADN aux promoteurs des gènes cibles. Plus précisément, la transcription des gènes cibles par Notch1 est meilleure s'il existe dans leurs promoteurs deux sites de liaison pariés à l'ADN permettant ainsi la formation d'un homodimère NICD1-RBPJ-kappa. Notch3 en revanche se fixe mieux aux sites de liaisons qui sont proches de ceux de facteurs de transcription à doigt de zinc⁴⁷⁸.

Enfin, la voie de signalisation Notch est connue pour induire l'expression de nombreux gènes codant pour des facteurs de transcription tels que ceux de la famille HESR par exemple, mais aussi bien d'autres. Ainsi, suite à l'activation de la voie de signalisation, une première « vague de gènes » sont induits directement par le complexe ternaire NICD-RBPJ-kappa-MAML et, parmi ceux-ci, des facteurs de transcription qui sont alors à leur tour responsables de la transcription d'une deuxième « vague de gènes » et ainsi de suite. Il est alors possible que, selon le type cellulaire, les facteurs de transcription induits lors de la première « vague de

gènes » ne soient pas les mêmes, entraînant ainsi des réponses pouvant être très variées dépendamment du contexte cellulaire dans lequel la voie est activée.

1.3.5 Notch dans le système immunitaire

1.3.5.1 Notch dans l'engagement de la lignée T

Lorsque les progéniteurs provenant de la moelle osseuse entrent dans le thymus, ces derniers peuvent se différencier en LB, LT, cellules NK, CD ou encore en macrophages. Or, ce choix de différenciation est en partie contrôlé par la voie de signalisation Notch⁴¹⁷. En effet, la délétion de Notch1, de RBPJK ou encore la surexpression de la forme dominante négative de MAML1 bloque l'engagement des thymocytes en LT, ce qui corrèle avec une accumulation de LB dans le thymus^{407,409,479}. À l'inverse, la surexpression du domaine intracellulaire de Notch1 dans les progéniteurs de moelle osseuse conduit à une forte génération de LT au sein de la moelle osseuse au détriment de la génération des LB⁴⁸⁰. Il a été découvert plus tard que le ligand de la voie Notch DLL4, exprimé par les cellules endothéliales du thymus (TEC), est responsable de l'activation de la voie en interagissant avec le récepteur Notch1 exprimé à la surface des thymocytes immatures^{481,482}. La figure 12A illustre les ligands et récepteurs de la voie Notch dans le développement des thymocytes.

1.3.5.2 Notch dans le développement des LT $\alpha\beta$

Lorsque les thymocytes sont engagés dans la lignée T, ils doivent effectuer le choix de différenciation pour devenir des LT $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. La génération des LT $\gamma\delta$ est indépendante de la voie de signalisation Notch, mais dépend plutôt de l'expression de la protéine Id3⁴⁸³. En revanche, les LT $\alpha\beta$ ont besoin d'activer la voie Notch pour leur développement jusqu'au stade DN3 où les cellules subissent le point de contrôle de la β -sélection⁴⁸⁴. À ce stade, les précurseurs de LT $\alpha\beta$ expriment la forme réarrangée de la chaîne β du RCT en association avec les molécules de CD3 et la chaîne invariante pT α ⁴⁸⁵. Or, pour survivre, ces cellules doivent recevoir un signal via le pré-RCT, mais aussi le signal Notch pour survivre et pour continuer leur développement. Il a été démontré que le facteur de E2A est important pour induire l'expression de Notch1 aux stades précoces du développement des thymocytes. De plus, il existe une boucle

d'amplification positive permettant l'expression de Notch1 directement par Notch1 et de Notch3^{486,487}. Or, Notch1 et Notch3 sont capables d'induire directement l'expression de la chaîne invariante pTα^{432,487}. Cependant, il a été démontré que la protéine IKAROS peut entrer en compétition avec RBPJκ au promoteur pTα pour en réprimer l'expression. Toutefois, Notch3 est aussi capable d'induire l'expression de la protéine HuD, une protéine qui se fixe sur les ARN et qui induit un épissage alternatif de IKAROS. L'isoforme d'IKAROS générée par cet épissage alternatif bloque la forme active d'IKAROS en l'empêchant de se fixer à l'ADN, ce qui contribue indirectement à l'induction de l'expression de la chaîne invariante pTα⁴⁸⁸. Enfin, la voie Notch contribue au développement des précurseurs de LT αβ en régulant la survie de ces derniers, notamment en activant le métabolisme du glucose via l'activation de la voie Akt⁴⁸⁹.

1.3.5.3 Notch dans la différenciation des lymphocytes B de la zone marginale

Les lymphocytes B de la zone marginale (MZB) dérivent de LB immatures présents dans la rate. Leurs différenciations requièrent la présence du ligand DLL1, probablement exprimé à la surface des cellules endothéliales de la pulpe rouge et de la zone marginale, ainsi que celle du récepteur Notch2 à la surface des MZB^{490,491}. De plus, la délétion génétique conditionnelle de RBPJκ ou de MAML1 empêche la génération de MZB, confirmant l'importance du rôle de la voie canonique de Notch dans ce choix de différenciation⁴⁹²⁻⁴⁹⁴. En outre, la délétion de MINT, un régulateur négatif de la voie de Notch, augmente significativement la génération de MZB⁴⁹⁵. La protéine MINT est un corépresseur de la transcription et il compétitionne avec le NICD pour interagir avec RBPJκ⁴⁹⁶. Tous ces éléments révèlent un rôle essentiel de la voie Notch dans la génération des MZB. La figure 12A illustre les ligands et récepteurs de la voie de la voie Notch impliqués dans le processus de différenciation des lymphocytes B de la zone marginale.

1.3.5.4 Notch dans la leucémie lymphoblastique

Dans une étude faite sur 96 patients pédiatriques ayant développé une leucémie lymphoblastique aiguë (LLA), il a été découvert que 55% d'entre eux présentent une mutation génétique dans le gène de Notch1⁴³⁷. Certaines de ces mutations conduisent à l'activation de la voie Notch de façon indépendante des ligands tandis que d'autres stabilisent le NICD^{497,498}. De plus, l'expression ectopique du NICD dans les progéniteurs de moelle osseuse induit rapidement

une LLA⁴⁹⁹. Ces éléments révèlent un rôle important de la voie Notch dans l'induction de la LLA. Les mécanismes permettant de comprendre comment la forte activation de la voie Notch conduit à l'induction de cette maladie sont exposés ci-dessous.

Premièrement, la voie Notch contrôle directement l'expression de la protéine c-Myc et il a été démontré que ce facteur de transcription régule, avec le NICD, un certain nombre de gènes impliqués dans la régulation de la croissance et la prolifération cellulaire ainsi que le métabolisme^{462,500,501}. Ce mécanisme est important dans l'établissement de la maladie puisque l'inhibition de c-Myc en combinaison avec de la chimiothérapie semble être une stratégie thérapeutique intéressante⁵⁰².

Deuxièmement, la signalisation aberrante de la voie Notch dans la LLA est liée à la régulation des protéines du cycle cellulaire. Notamment, l'activation de la voie de signalisation Notch conduit à l'expression de la protéine Skp2, une E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation de la protéine p27^{kip1}, une kinase qui inhibe le cycle cellulaire⁵⁰³. Ainsi, la dégradation de p27^{kip1} induite indirectement par la voie Notch favorise la croissance tumorale⁵⁰⁴. De plus, des évidences suggèrent que la voie Notch contrôle aussi l'expression de la cycline D3, dont on connaît l'importance dans l'induction de la LLA⁵⁰⁵. Il a en effet été démontré que la délétion de la cycline D3 diminue grandement la susceptibilité à la LLA induite par l'activation de la voie NOTCH. La voie de signalisation Notch contrôle aussi négativement l'activité du complexe ARF-mdm2-p53, ce qui diminue l'activité de p53⁵⁰⁶. Ce mécanisme est important dans la LLA puisque l'inhibition de la voie Notch corrèle avec une plus forte expression de p53, mais aussi avec une régression de la tumeur par l'induction de l'apoptose.

Troisièmement, la voie de signalisation régule positivement la voie métabolique PI3K-Akt-mTOR, une voie importante pour soutenir la prolifération cellulaire dans la LLA⁵⁰⁷. En effet, l'inhibition de la voie Notch par un inhibiteur chimique de la γ -sécrétase conduit à une plus faible activation de la voie PI3K-Akt-mTOR tandis que la surexpression du NICD favorise l'activation de cette voie dans des lignées cellulaires de LLA⁴⁹⁹. De plus, la surexpression du dominant négatif de la protéine MAML1 récapitule les résultats obtenus avec les inhibiteurs de la γ -sécrétase, suggérant que la voie Notch régule positivement l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR via l'induction de l'expression de gènes cibles. Étant donné que l'expression ectopique de la protéine c-Myc dans des cellules traitées avec un inhibiteur de γ -sécrétase permet

de restaurer l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR, il est probable que la voie Notch régule cette dernière via l'induction de c-Myc⁴⁹⁹. Cependant, il existe une autre possibilité. En effet, la voie de signalisation Notch contrôle l'expression de Hes-1, un répresseur transcriptionnel capable d'inhiber l'expression de la protéine PTEN. Or, cette dernière est connue pour réguler négativement la voie PI3K-Akt-mTOR. Ainsi, il est possible que la voie Notch régule positivement la voie PI3K-Akt-mTOR en induisant l'expression de c-Myc, mais aussi en induisant l'expression du répresseur transcriptionnel PTEN⁵⁰⁸.

Quatrièmement, la voie de signalisation Notch affecte l'activité de différents facteurs de transcription. En effet, la voie Notch contrôle notamment l'activité de NFκB en le séquestrant au noyau, ce qui régule positivement son activité et induit, entre autres, l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2A1^{509,510}. Par ailleurs, l'inhibition de la voie NFκB diminue la croissance tumorale suggérant que la voie NFκB est impliquée dans la tumorigénèse. La voie de signalisation Notch contrôle aussi positivement l'activité de NFAT. En effet, Notch contrôle l'activité de la calcineurine, une phosphatase qui induit la migration de NFAT au noyau où il pourra activer la transcription de gènes cibles. Or, l'inhibition de la calcineurine conduit à la diminution de la croissance tumorale associée avec une espérance de vie augmentée chez la souris⁵¹¹.

1.3.6 Notch dans les lymphocytes T CD4

Les récepteurs Notch1 et Notch2 sont exprimés par les LT CD4 naïfs et leur expression ainsi que celles de Notch3 et Notch4 sont rapidement induites suite à leur activation rendant ainsi possible un rôle de cette voie dans la réponse des LT CD4^{512,513}. Une première étude *in vitro*, utilisant un inhibiteur de la gamma-sécrétase, démontre un rôle positif de cette voie dans la prolifération des LT CD4^{512,514}. Dans la première étude, les auteurs identifient la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2, CD25, comme une cible de Notch et postulent que la voie Notch sensibilise les LT CD4 au rôle paracrine de cette cytokine⁵¹². La seconde étude suggère que cette voie de signalisation est importante pour activer la voie mTOR/akt et ainsi favoriser la croissance cellulaire⁵¹⁴. D'autres études ont par la suite identifié un rôle de cette voie dans le contrôle de la différenciation des LT CD4. Cependant, la diversité des méthodes utilisées pour

activer les LT CD4 associés à la diversité des méthodes utilisées pour manipuler la voie ont conduit à diverses conclusions, parfois contradictoires, sur le rôle de la voie lors de la différenciation des LT CD4. L'utilisation d'inhibiteur de gamma-sécrétase ainsi que la surexpression soit des ligands de la voie Notch, soit des différents NICD ont conduit, dans un premier temps, à conclure que l'interaction entre DLL1 et Notch3 est essentielle à la différenciation des LT CD4 en LT de type Th1, sans affecter la génération de Th2, en régulant positivement l'expression du facteur de transcription T-bet^{515,516}. Ceci corrèle avec une autre étude dans laquelle l'expression de Notch1 est génétiquement supprimée et qui rapporte que Notch1 n'est pas requis pour la différenciation des LT CD4⁵¹⁷. Ce résultat pourrait s'expliquer par un rôle redondant des différents récepteurs Notch. À l'inverse, d'autres études montrent, grâce à un modèle génétique d'inhibition de tous les récepteurs Notch ainsi qu'un modèle de surexpression du NICD1, que cette voie contrôle la différenciation des LT CD4 en LT de type Th2 sans affecter la génération de Th1 *in vitro* et *in vivo*^{518,519}. Les auteurs démontrent que Notch contrôle directement et indirectement la production de l'IL-4, une cytokine essentielle à la différenciation en Th2. Ainsi, Notch est capable de se lier directement à l'enhancer de CNS-22 du gène de l'IL-4 tandis que GATA3, qui est induit par la voie Notch, est lui aussi capable de se fixer dans le promoteur proximal de ce gène. La co-expression du NICD et de GATA3 permet une forte induction de l'expression de l'IL-4 tandis que l'expression du NICD seul ne permet pas l'expression de la cytokine^{518,520}. Par ailleurs, d'autres travaux suggèrent que ce serait le type de ligands de la voie Notch qui contrôlerait l'activation des LT CD4 et permettrait le choix de différenciation Th1/Th2^{513,516,521}. Dans l'article de Rutz, les auteurs démontrent que le ligand DLL4 favorise l'activation des LT CD4 tandis que DLL1 et jagged1 ne permettent pas l'expression optimale des marqueurs d'activation précoces CD69 et CD25 et que ce phénomène est indépendant de la gamma-sécrétase. Par ailleurs, l'utilisation de différents ligands solubles ainsi que la surexpression de différents ligands de la voie Notch ont permis de conclure que la famille jagged favorise une différenciation des LT CD4 naïfs en LT CD4 de type Th2 tandis que la famille Delta-like favoriserait une différenciation de type Th1^{513,516}. Cependant, il est difficile de comprendre comment différents ligands pourraient induire différentes réponses. Ainsi, plus récemment, une étude plus rigoureuse vient mettre à mal ce principe selon lequel le type de ligands contrôlerait le choix de différenciation des LT CD4⁵²². Dans cette étude, des LT CD4 naïfs sont activés avec des CPA n'exprimant pas de façon naturelle les ligands de Notch

ayant été transduites ou non avec différents ligands de la voie dans un milieu neutre ou polarisant Th1 ou Th2 durant 7 jours à la suite de quoi, ces cellules ont été restimulées avec de la PMA/iono. Les LT CD4 se sont différenciés selon le milieu polarisant dans lesquelles ils sont stimulés, et ce indépendamment du type de ligands exprimé, contredisant ainsi les précédentes études. En revanche, la présence des ligands de la voie Notch permet une augmentation de la production des cytokines. C'est pourquoi les auteurs suggèrent que ce serait les cytokines dans le milieu qui orienteraient le choix des cibles transcriptionnelles de la voie Notch. C'est enfin en 2013 que le mécanisme par lequel Notch contrôle ce choix de différenciation a été compris alors qu'il a été depuis découvert que Notch est aussi important pour la différenciation des LT CD4 de type Th17 par le contrôle notamment de l'expression Rorc et de l'IL-17⁵²³⁻⁵²⁵. Dans cet article, Bailis et al. démontrent que la voie Notch ne contrôle pas le choix de différenciation Th1, Th2 ou encore Th17, mais démontre plutôt que le signal Notch régule positivement et simultanément les différents programmes transcriptionnels spécifiques de chacun des sous-types cellulaires. En effet, dans des cellules en cours de différenciation vers le sous-type TH17, le NICD se lie non seulement aux promoteurs de gènes régulant ce choix de différenciation, mais aussi aux promoteurs des gènes régulant les autres choix de différenciation tels que celui de L'IL-4, de T-bet et de GATA3. Enfin, les auteurs montrent que cette voie orchestre simultanément la différenciation des LT CD4 en les rendant sensibles aux cytokines de l'environnement, et ce grâce à la dilution en série des cytokines présentes dans le milieu en présence ou en absence de signal Notch. La figure 12B illustre le rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation des LT CD4.

1.3.7 La voie Notch et les lymphocytes T CD8

Les LT CD8 naïfs expriment de très faibles niveaux du récepteur Notch1, des niveaux intermédiaires de Notch2 tandis qu'ils n'expriment pas Notch3 ou Notch4 au niveau protéique et transcriptionnel⁵²⁶⁻⁵³⁰. En revanche, l'activation *in vitro* des LT CD8 par l'utilisation d'anticorps ciblant soit le RCT, soit CD3 associé ou non avec des anticorps ciblant CD28 conduit à une forte induction de l'expression de Notch1 et Notch2, mais pas de Notch3 et Notch4 qui eux, restent indétectables⁵²⁶⁻⁵²⁸. L'expression de ces récepteurs à la surface des LT CD8 en

cours d'activation connaît un pic d'expression entre 12 et 24h post-stimulation, mais se maintient jusqu'à 96h⁵²⁶⁻⁵²⁸. En plus d'être exprimés, ces deux récepteurs sont activés puisque le NICD est détecté dans le noyau des LT CD8^{509,527}. Cette activation est dépendante de l'action de la *gamma*-sécrétase puisque le traitement avec un inhibiteur de celle-ci ne permet plus la détection de la forme clivée des récepteurs^{509,527,531}. La forme clivée des récepteurs Notch1/2 dans les LT CD8 en cours d'activation est fonctionnelle puisqu'elle permet l'induction de l'expression du gène cible de la voie Notch, Hes-1^{272,527}.

Peu d'informations existent quant à la source des ligands permettant l'activation de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8. Une première étude analyse l'expression des ligands de la voie sur des « monocytes derived dendritic cells » (MoDC) humain⁵²⁸. À l'état basal, les MoDC n'expriment que Jagged1 à de faibles niveaux. En revanche, suite à leur activation par exposition à une faible dose de lipopolysaccharide (LPS), ceux-ci commencent à exprimer à de fort niveau DLL4 et Jag1 tandis que DLL1 n'est que faiblement exprimé. Aucune expression de DLL3 et Jag2 n'est détectée. Dans une seconde étude, l'utilisation d'anticorps bloquants ciblant chacun des ligands de la voie utilisée seule ou en combinaison ont permis de déterminer que DLL4 et DLL1 sont les ligands responsables d'activer la voie Notch dans les LT CD4 activés suite à une transplantation de moelle allotypique avec un effet dominant de DLL4 (réaction du greffon contre l'hôte, GVHD)⁵³². Dans cette étude, le blocage de DLL4 et DLL1 permet de diminuer l'expression de cytokines par les CD4 et CD8 telles que l'IFN-*gamma* et l'IL-2 par les LT CD4 responsables de la GVHD tout en préservant l'activité cytolytique antitumorale. Plus récemment, le même groupe a identifié les cellules stromales fibroblastiques comme source des ligands DLL1/4 responsables d'activer la voie de signalisation Notch dans les LT CD4 et CD8 lors d'une GVHD⁵³³. En effet, l'utilisation de souris hôtes dont l'expression de DLL1/4 a été éliminée uniquement dans ce type cellulaire récapitule les phénotypes observés en absence de la voie de signalisation Notch dans les LT CD4 et CD8⁵³³. Ainsi, il serait intéressant de savoir si ce sont les mêmes ligands exprimés par le même type cellulaire qui contrôleraient l'activation de la voie de signalisation dans les LT CD8 à la suite d'une infection.

1.3.7.1 Notch dans la réponse lymphocytaire CD8

1.3.7.1.1 Le rôle de la voie Notch dans la réponse lymphocytaire in vitro

Les premières études ont révélé un rôle essentiel de la voie de signalisation Notch dans l'activation des lymphocytes CD8. En effet, l'inhibition de la voie Notch en utilisant un inhibiteur de γ -sécrétase durant l'activation *in vitro* de lymphocyte T CD8 avec l'anticorps anti-CD3 provoque une diminution importante de la prolifération chez la souris et l'humain^{527,528,531}. Par ailleurs, l'ajout d'IL-2 ne permet pas de restaurer la prolifération suggérant que la voie Notch n'agit pas en contrôlant l'expression de cette cytokine. De plus, les LT CD8 traités avec l'inhibiteur expriment de plus faibles niveaux des marqueurs d'activation CD69 et CD25 96h post-stimulation⁵²⁷. Ceci est associé à une réduction de la production et de la sécrétion des cytokines telles que l'IFN- γ et de l'IL-2 ainsi qu'une plus faible production des molécules effectrices granzyme B et perforine A^{527,531}. Par ailleurs, l'activation de LT CD8 provenant de souris dont les cellules expriment de plus faibles niveaux d'expression du récepteur Notch1 (souris Notch1AS portant un transgène anti-sens pour Notch1 sous le contrôle du promoteur du virus de la tumeur mammaire murin) ne conduit pas à une diminution de la prolifération de ceux-ci, mais affecte négativement la production de cytokines et des molécules effectrices, suggérant que le récepteur Notch1 exerce un effet dominant sur la production de cytokine tandis qu'il existerait un rôle redondant des récepteurs Notch1/2 dans l'induction de la prolifération cellulaire. Ces résultats suggèrent un rôle essentiel de la voie de signalisation Notch dans le renforcement de l'activation des LT CD8.

1.3.7.1.2 *Le rôle de la voie Notch dans la réponse lymphocytaire in vitro*

Le rôle de la voie de signalisation Notch dans la réponse des lymphocytes T CD8 *in vivo* n'avait été évalué jusqu'alors que dans quatre études. La première s'appuie sur l'utilisation de souris dont seuls les LT CD8 matures sont déficients ou non pour le récepteur Notch2⁵²⁶. Ces souris ont alors été infectées avec le parasite *Trypanosoma cruzi* (T. Cruzi). L'absence d'expression de Notch2 dans les LT CD8 corrèle avec une mort prématurée des souris par rapport à des souris dont les LT CD8 étaient sauvages. De plus, ces dernières meurent avec la même cinétique que des souris dépourvues de LT CD8, suggérant ainsi un rôle essentiel de la voie Notch dans l'acquisition des fonctions effectrices des LT CD8 *in vivo*.

La seconde étude repose sur le même modèle murin dans lequel Notch2 est déficient dans les LT CD8 lors d'une réponse antitumorale⁵³⁴. Ainsi, l'injection de cellules de lymphome

murin (EL4) modifiées pour exprimer l'antigène OVA (EG7) conduit à une croissance tumorale plus importante dans le cas de souris dont les LT CD8 n'expriment pas Notch2. Au contraire, l'injection d'anticorps anti-Notch2 activateur de la voie Notch dans des souris sauvages réduit considérablement la croissance tumorale par rapport à des souris non-traitées, augmentant ainsi leur espérance de vie, allant même jusqu'à l'élimination complète de la tumeur. Enfin, la surexpression du ligand DLL1 dans des BMDC ayant été cultivées plusieurs jours en présence de cellules EG7 irradiées permet de supprimer la croissance tumorale suite à leurs injections dans une souris ayant reçu une infusion des cellules tumorales⁵³⁴.

Les deux dernières études *in vivo* ont été faites par le même groupe et consistent en l'étude de la voie Notch dans la réponse lymphocytaire CD4 et CD8 lors d'une réponse de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Des LT CD4 ou CD8 provenant de souris C57BL/6 sauvages ou surexprimant l'inhibiteur DNAM1 ont été transférés dans des souris BALB/c ou BALB/b, induisant ainsi une forte réaction de GVHD dans la souris hôte^{535,536}. Suite au transfert de LT sauvages, les souris meurent rapidement des conséquences de la GVHD induite alors qu'au contraire, en l'absence de la voie de signalisation canonique de Notch, non seulement les souris survivent, mais elles sont capables d'éliminer le lymphome induit par l'injection de cellules A20. Ainsi, le blocage de la voie Notch constituerait un traitement efficace lors de la greffe de moelle osseuse dans le cadre d'une leucémie. Dans ce contexte, la fréquence de LT exprimant de l'IFN- γ diminue malgré une expression similaire des facteurs de transcription EOMES et T-bet. En revanche, les voies de signalisation RAS/MAPK et NF κ B sont moins activées en l'absence de Notch et ceci corrèle avec une augmentation de l'expression de régulateurs négatifs de l'activation des LT tels que Dgka et Dgkz ; Egr3, Rnf128, Grail, etc.⁵³⁶.

Plusieurs éléments de réponse ont été apportés quant aux mécanismes par lesquelles la voie Notch agirait dans les LT CD8. Notamment, l'une des voies essentielles à la transduction du signal RCT conduit à l'activation du facteur de transcription NF κ B⁵³⁷ duquel il est connu qu'il puisse interagir avec la voie de signalisation Notch pour réguler positivement^{538,539} ou négativement^{540,541} son action dans différents types cellulaires. Ainsi, dans les LT CD8 provenant de souris Notch1AS, l'activité de NF κ B est diminuée par rapport aux LT CD8 sauvages suite à leur activation⁵²⁷. En accord avec ce résultat, le groupe du Dr Osborne rapporte quelques années plus tard que la voie de signalisation Notch améliore l'activité NF κ B dans les

LT CD4 et CD8⁵⁰⁹. Plus précisément, il est démontré que la voie Notch n'affecte pas l'activité initiale de la voie NFκB, mais permet plutôt de soutenir son activation dans le temps. Ce mécanisme est rendu possible par la séquestration de p50 et C-rel par le NICD au noyau des LT favorisant ainsi une activation plus longue de cette voie dans le temps.

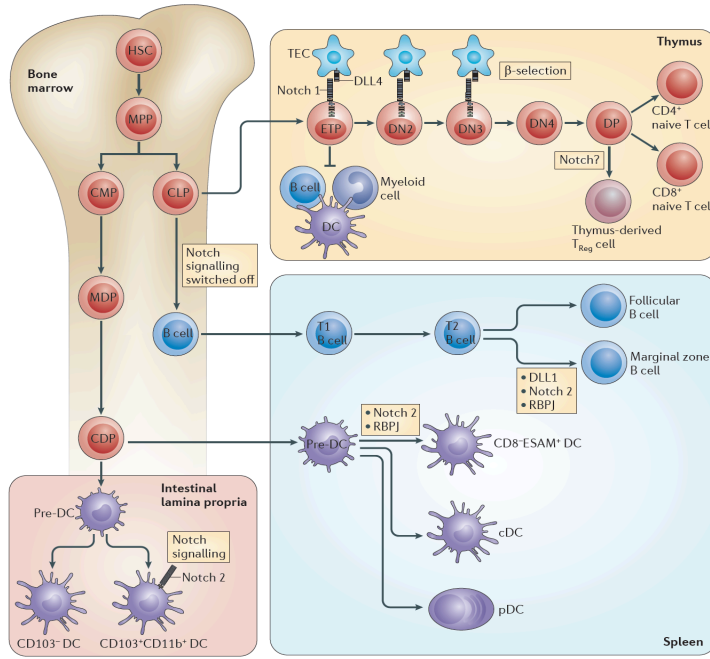
1.3.7.1.3 La voie de signalisation Notch contrôle l'acquisition des fonctions effectrices des LT CD8

D'autres études ont rapporté que la voie Notch pouvait contrôler l'état d'activation des LT CD8 via le contrôle transcriptionnel de gènes cibles importants. Parmi ceux-ci, le NICD peut se fixer au promoteur des molécules GrzmB et perforine afin de réguler leur expression en collaborant, par interaction directe, avec le facteur de transcription CREB1 sous sa forme phosphorylée^{526,531}. Le NICD peut aussi se fixer directement au promoteur de l'IFN-γ pour y contrôler son expression en collaborant avec les facteurs de transcription EOMES et NFκB^{509,515,526,527}. Il a par ailleurs été démontré qu'en absence d'EOMES, la présence du NICD2 au promoteur n'était pas suffisante pour induire l'expression de l'IFN-γ⁵²⁶. Or, le NICD permet aussi le contrôle transcriptionnel direct de EOMES en collaborant positivement avec le facteur de transcription NFκB à son promoteur⁵³¹. Enfin, il a été montré par notre équipe que la voie de signalisation contrôle directement l'expression de PD-1 par liaison du NICD à RBPJ-kappa dans le promoteur proximal ainsi que dans l'intron1⁵⁴².

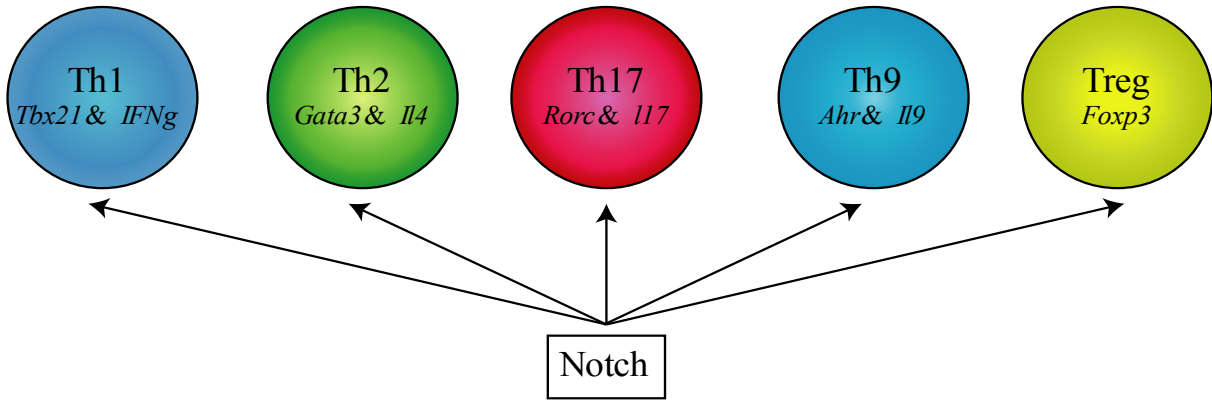
Chez l'humain, la voie de signalisation Notch contrôle aussi la fonctionnalité des LT CD8 puisque 1) les récepteurs Notch1 et Notch2 sont induits suite à leur activation 2) ces récepteurs sont activés, car il s'en suit une induction importante de la présence de la forme clivée de ces récepteurs conduisant à l'expression des gènes cibles classiques de la voie Notch 3) le traitement de ces cellules par un inhibiteur de la gamma-sécrétase lors de leur activation conduit à un pourcentage plus faible de cellules exprimant de l'IFN-γ et que parmi celles qui en expriment encore, elles en produisent en plus faible quantité⁵²⁸. La figure 12C représentent les gènes directement régulés par la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 activés ainsi que les partenaires transcriptionnels avec qui elle s'associe pour permettre leur expression. La figure 12D représente les différents processus régulés par la voie de signalisation Notch lors de la réponse des LT CD8.

Ainsi, peu de choses sont connues sur le rôle de la voie de signalisation Notch dans la réponse des LT CD8. De plus, la majorité de ces études ont été faites en inhibant la voie de signalisation en utilisant des inhibiteurs chimiques de la γ -sécrétase. Or, cette enzyme agit dans d'autres processus moléculaires que ceux impliqués dans l'activation de la voie Notch, ce qui pourrait induire des effets indépendants de Notch. De plus, la majorité des autres études utilisent des modèles dans lesquels seul un des deux récepteurs Notch1 ou Notch2 sont déficients dans les LT CD8, ce qui n'est pas optimal pour l'étude du rôle de la voie de signalisation Notch puisque ces deux récepteurs sont exprimés dans les LT CD8. Cependant, nous savons que cette voie est activée dans les LT CD8 suite à leur stimulation antigénique^{526,527,543}. Certaines études rapportent que l'absence de Notch corrèle avec un défaut d'activation *in vitro*⁵²⁷. Il a aussi été montré un rôle de la voie Notch dans l'acquisition de la fonctionnalité des LT CD8 et notamment dans la production de cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-2 mais aussi des molécules effectrices GrzmB et de la perf^{526,527,543}. De plus, cette voie de signalisation semble essentielle pour le contrôle du pathogène T. Cruzi et importante pour l'activité antitumorale des LT CD8 *in vivo*^{526,534}. En outre, cette voie semble être une cible moléculaire de choix dans la maladie du greffon contre l'hôte puisque son inhibition dans les LT empêche l'apparition de la maladie tout en gardant une activité dirigée contre la leucémie. Enfin, le rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation des LTe ainsi que dans la génération de LTm n'a jamais été évalué.

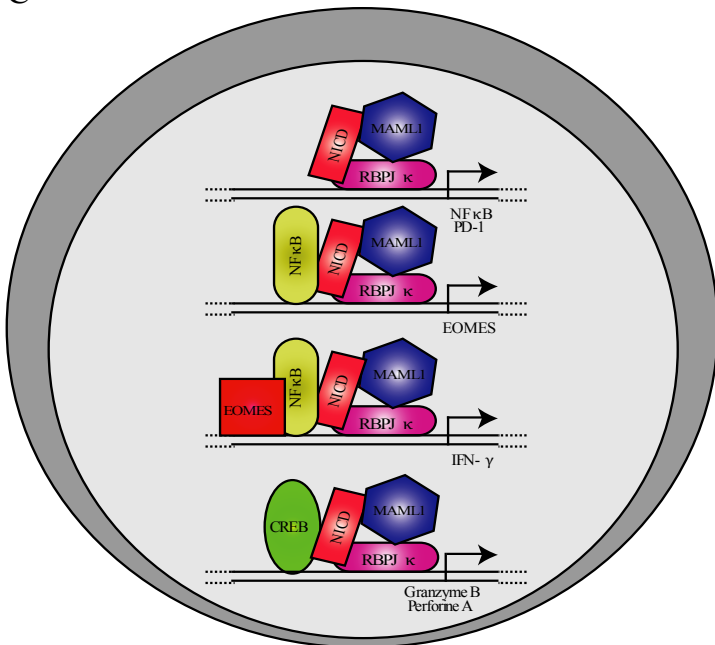
A



B



C



D

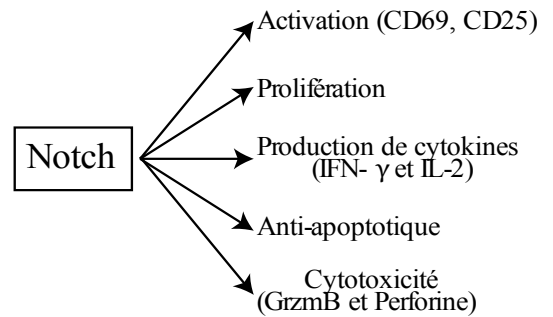


Figure 12. Schéma représentant l'implication de la voie de signalisation Notch dans les étapes de maturations et de développement des cellules du système immunitaire (A). Inspiré de⁵⁴⁴. Représentation des gènes supportant la différenciation des LT CD4 et régulés par la voie de signalisation Notch^{513,515,518,545} (B). Gènes régulés par la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 activés^{526,527,531} (C). Les partenaires collaborant avec le NICD pour l'expression de gènes sont aussi représentés aux promoteurs des gènes cibles (D). Processus cellulaires régulés par la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 activés^{526,527,531,546,547}.

Tableau I. Représentation des gènes cibles de la voie de signalisation Notch et de leurs rôles dans le développement et la maturation des des LT et durant l'activation des LT CD4 et CD8 matures^{431,515,518,526,527,531,545,546,548-552}. Les ligands et les récepteurs de la voie de signalisation Notch impliqués dans l'expression de ces gènes cibles sont indiqués lorsqu'ils ont été identifiés

Contexte	Ligands	Récepteurs	Cibles transcriptionnelles	Rôle du gène cible
Développement des LT	DLL4	Notch1	TCF-1	maturation des thymocytes DN1 en DN2
	DLL4	Notch1	Hes-1	Réprime le programme transcriptionnel myéloïde permettant l'engagement T
	DLL4	Notch1	CD25	prolifération des thymocytes au stade DN3
	DLL4	Notch1	pTα	Prolifération des thymocytes au stade DN3
	DLL4	Notch1	cMyc	Survie des thymocytes
Lymphocytes T CD4	/	Notch1	CD25	Prolifération des LT CD4 activés
	DLL1	Notch3 et Notch1	T-bet	différenciation des LT CD4 Th1
	/	Notch1	IFN-γ	différenciation des LT CD4 Th1
	/	Notch1	GATA-3	différenciation des LT CD4 Th2
	/	Notch1	IL-4	différenciation des LT CD4 Th2
	/	Notch1	Rorc	différenciation des LT CD4 Th17
	/	Notch1	IL-17	différenciation des LT CD4 Th17
Lymphocytes T CD8	/	Notch1	IL-2	Fonctionnalité des LT CD8
	/	Notch1	IFN-γ	Fonctionnalité des LT CD8
	/	Notch1 et Notch2	Granzyme B	Fonctionnalité des LT CD8
	/	Notch1 et Notch2	perforine	Fonctionnalité des LT CD8
	/	Notch1	EOMES	Fonctionnalité des LT CD8

Raisonnement et hypothèse

Les mécanismes moléculaires permettant les choix de différenciation des LT CD8 suite à leur activation restent méconnus. Or, la manipulation de ces choix de différenciation permettrait d'améliorer les stratégies de vaccination actuelles en favorisant la génération de LTm hautement fonctionnels et à longue durée de vie ou encore pour prévenir l'épuisement des LT CD8 suite à une infection chronique ou dans le cas de cancer. Chez les mammifères, la voie de signalisation Notch régule les processus de prolifération et de survie cellulaire en plus de contrôler les choix de différenciation cellulaire au cours du développement embryonnaire. De plus, dans le système immunitaire, cette voie contrôle le choix de différenciation de précurseurs en LB ou LT⁴¹⁷. C'est pourquoi nous sommes intéressés au rôle de la voie de signalisation Notch dans ces événements de différenciation chez les LT CD8 périphériques. Les ligands de la voie de signalisation sont induits à la surface de différents types cellulaires et notamment à la surface des CPA lorsque celles-ci reçoivent des signaux de dangers^{528,530,544}. De plus, la faible expression des récepteurs Notch1 et Notch2 à la surface des LT CD8 est rapidement et fortement augmentée suite à une stimulation antigénique des LT CD8^{509,526-529,531}. Ces éléments suggèrent que cette voie de signalisation est activée dans les LT CD8 de façon transitoire lors d'une infection aiguë tandis qu'elle serait activée de façon continue dans le cas d'une infection chronique ou lors du développement d'une masse tumorale puisque dans ces derniers cas, l'inflammation et la présence de l'antigène est persistante. De plus, cette voie de signalisation est essentielle à la différenciation des LT CD4^{513,515,516,518,519,521,522,545,553}. En effet, la voie Notch contrôle simultanément les différents programmes transcriptionnels spécifiques à plusieurs sous-populations de LT CD4^{518,545,554,555}. Notamment, Notch contrôle directement l'expression du facteur de transcription T-bet et contribue à une expression optimale de l'IFN- γ favorisant ainsi la différenciation des LTn CD4 en LT CD4 Th1, mais il induit aussi directement l'expression de GATA3 et contribue à induire l'expression de l'IL-4, ce qui permet la génération de LT CD4 Th2^{518,545}. Le rôle de cette voie est moins connu dans la réponse des LT CD8. Cependant, nous savons que cette voie de signalisation contrôle directement l'expression de l'IFN- γ dans les LT CD8 et ce, chez l'homme comme chez la souris^{526-528,531,534,536,545,556}. En plus de l'IFN- γ , Notch contrôle aussi l'expression des molécules effectrices perforine et GrzmB chez la souris. De plus, l'absence de Notch2 ne permet la génération de LTe CD8 fonctionnels *in vitro* ou capables de contrôler la croissance tumorale *in vivo*^{526,528,531,534}. Enfin, cette voie

contrôle l'expression du facteur de transcription EOMES, dont on sait que son expression est essentielle à la survie des LTm suite à une infection aiguë tandis qu'il favorise la différenciation terminale des LT épuisés suite à une infection chronique⁵³¹. En revanche, son rôle dans l'expression de T-bet n'a pas encore été évalué. Or, ce FT est essentiel à la génération des LT CD8 différenciés de façon terminale (SLEC) suite à une infection aiguë alors qu'il permet de maintenir la fonctionnalité des LT épuisés lors d'une infection chronique. Enfin, l'absence de cette voie de signalisation dans les LT protègent les souris d'une réaction du greffon contre l'hôte sans pour autant altérer la fonction cytolytique de ces cellules envers des cellules cancéreuses^{536,556,557}. Les LT CD8 déficients pour Notch ont un défaut de prolifération et produisent moins d'IFN- γ , mais en revanche, ils expriment de plus forts niveaux d'expression d'EOMES tandis que les niveaux d'expression de T-bet sont inchangés lors d'une réaction du greffon contre l'hôte^{536,556,557}. Le rôle de cette voie de signalisation dans la génération de LTm n'a jamais été évalué.

Ainsi, de nombreux éléments suggèrent un rôle important de cette voie de signalisation dans la réponse lymphocytaire CD8. Étant donné que cette voie permet la génération de LT CD4 et CD8 fonctionnels et qu'elle est impliquée dans le contrôle des choix de différenciation binaire ainsi que dans la différenciation des LT CD4, nous avons émis l'hypothèse qu'elle est essentielle pour le choix de différenciation SLEC/MPEC des LTe CD8 suite à une infection aiguë tandis qu'elle influencerait la différenciation des LT épuisés suite à une infection chronique, notamment en contrôlant l'expression des FT T-bet et EOMES.

Les objectifs de ma thèse consistaient à :

- 1) Évaluer le rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation SLEC/MPEC des LT CD8 et dans la génération de LTm à la suite d'une infection aiguë par Lm-OVA ou suite à une vaccination à l'aide de cellules dendritiques chargées à l'OVA (DC-OVA).
- 2) Étudier le rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation des LT CD8 épuisés suite à une infection chronique par le virus LCMVcl13.

Résultats

Article I. The Notch Signaling Pathway Controls Short-Lived Effector CD8+ T Cell Differentiation but Is Dispensable for Memory Generation

Mélissa Mathieu, Frédéric Duval, Jean-François Daudelin and Nathalie Labrecque.

Cet article a été publié dans le journal *The Journal of Immunology*, vol. 194 no. 12 5654-5662, DOI : 10.4049 (2015).

Cet article a mis en lumière le rôle de la voie de signalisation Notch dans la réponse lymphocytaire CD8 suite à une infection aiguë et répond donc au premier objectif de ma thèse. Voici les contributions détaillées de chacun des auteurs : J'ai effectué plus de la moitié des expériences dans cet article, soit environ 60%. Mélissa a effectué 35% des expériences tandis que Jean-François Daudelin m'a aidé à faire les expériences demandées par les réviseurs. Prenant en compte le fait que je venais de changer de domaine, associé au fait que le projet était débuté quand je suis arrivé, ma contribution conceptuelle à cet article est mince, environ 20 à 30% tandis que Mélissa a fait le reste, 70 à 80%. Enfin, Mélissa a écrit l'article, j'ai réalisé les figures. Bien sûr, Nathalie Labrecque a supervisé chacune des étapes et nous a soutenu dans notre réflexion en plus d'avoir corrigé le manuscrit. Enfin, c'est moi qui ai soumis l'article après que l'on ait répondu aux questions des réviseurs.

Article I. The Notch Signaling Pathway Controls Short-Lived Effector CD8+ T Cell Differentiation but Is Dispensable for Memory Generation

1.3.8 Méli^ssa Mathieu^{*,†,1}, Frédéric Duval^{*,†,1}, Jean-François Daudelin^{*} and Nathalie Labrecque^{*,†,‡}.

*Maisonⁿeuve-Rosemont Hospital Research Center, Montreal, Quebec H1T 2M4, Canada;
†Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada; and ‡Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada

Adresse de correspondance : Nathalie Labrecque
Maisonⁿeuve-Rosemont Hospital Research Center
5415 Boul de l'Assomption
Montré^al, QC, Canada, H1T 2M4
E-mail : nathalie.labrecque@umontreal.ca
Tel : 1-514-252-3552
Fax : 1-514253-7626

1 both authors contributed equally to this work

Abstract

Following an infection, naive CD8⁺ T cells expand and differentiate into two main populations of effectors: short-lived effector cells (SLECs) and memory precursor effector cells (MPECs). There is limited understanding of the molecular mechanism and cellular processes governing this cell fate. Notch is a key regulator of cell fate decision relevant in many immunological pathways. In this study, we add to the role of Notch in cell fate decision and demonstrate that the Notch signaling pathway controls the MPEC/SLEC differentiation choice following both *Listeria* infection and dendritic cell immunization of mice. Although fewer SLECs were generated, Notch deficiency did not alter the rate of memory CD8⁺ T cell generation. Moreover, we reveal that the Notch signaling pathway plays a context-dependent role for optimal cytokine production by effector CD8⁺ T cells. Together, our results unravel critical functions for the Notch signaling pathway during effector CD8⁺ T cell differentiation.

Introduction

Upon Ag encounter, CD8⁺ T lymphocytes become activated, proliferate, and differentiate into effector T (Te) cells able to kill target cells and secrete cytokines. Following pathogen clearance, only ~5–10% of Te cells will survive and further differentiate into long-lived memory T (Tm) lymphocytes. This generation of Tm cells is essential for protection against reinfection. The differentiation of naive CD8⁺ T cells into Te and Tm cells requires the proper integration of several signals provided by the APC and the environment in which the immune response occurs. At the peak of the CD8⁺ T cell response, different subsets of effectors can be identified using CD127 and KLRG1 expression (1, 2). The short-lived effector cells (SLECs; CD127^{low}KLRG1^{high}) are destined to die during the contraction phase of the CD8⁺ T cell response, whereas the memory precursor effector cells (MPECs; CD127^{high}KLRG1^{low}) will further differentiate into long-lived Tm cells. The fate of effectors is mainly dictated by the inflammatory cytokine signals that they perceived during the immune response. High amount

of IL-12 favors their differentiation into SLECs by increasing the expression level of the transcription factor T-bet (1). Furthermore, SLECs differentiate from effectors that have maintained the expression of the IL-2Ra chain (CD25) (3), which allows for the induction of the expression of the transcriptional repressor Blimp-1 (3, 4), a key molecule controlling SLEC differentiation (5, 6). Although the cytokine milieu plays a very important role during the differentiation of effectors, it is still possible that other receptor–ligand interaction provided by APCs may also play a crucial role during the differentiation of naive CD8⁺ T cells into T_e and T_m cells.

The Notch signaling pathway is an evolutionary conserved pathway that is well known for its role during various differentiation events. In vertebrates, this pathway is composed of four receptors (Notch1–4) and five ligands (Jagged-1, -2, and Delta-like-1, -3, -4). The interaction of Notch with its ligands leads to its proteolytic cleavage releasing the Notch intracellular domain (NICD) (7). The NICD translocates to the nucleus, where it associates with RBPJ (recombination signal-binding protein for Ig kJ region). This displaces the corepressors associated with RBPJ and allows assembly of a transcriptional activator complex (NICD, MAML1–3, and MED-8 mediator transcription activation complex) that induces transcription of target genes (7). HES family members are common targets of Notch signaling in many tissues, whereas other target genes are tissue specific. Furthermore, a broad number of genes can be regulated by Notch, as shown using genome-wide methodologies (8–11).

In the immune system, the Notch signaling pathway has been shown to control the development of multiple cell types, including T cells, marginal zone B cells, innate lymphoid cells, and dendritic cells (DCs) (12). Apart from playing crucial roles for the development of immune cells, the Notch signaling pathway also regulates T cell response. Indeed, T cells express Notch receptors, whereas APCs can express the ligands (12). In CD4⁺ T cells, Notch signaling regulates the differentiation and response of various Th cell subsets (12). Indeed, the induction of different Notch ligands by danger signals on DCs controls the Th1 and Th2 differentiation choice (13). This initial observation has now been expanded to the differentiation of several Th cell subsets (12). Specifically, the Notch signaling pathway was shown to directly regulate the transcription of *Tbx21* (encoding for T-bet) and to increase IFN- γ production in Th1 cells (14, 15). The Notch pathway is also a direct regulator of Gata3 transcription during Th2

differentiation (16, 17). More recently, the Notch signaling pathway was also shown to regulate Th9, Th17, and T regulatory differentiation (18–20). The mechanism by which the Notch signaling pathway orchestrates the various Th differentiation program was recently identified by the group of Pear (21). It appears that Notch does not dictate the Th differentiation choice, but rather it potentiates the cytokine signal received by CD4⁺ T cells during differentiation. Thus, by itself, the Notch signaling pathway cannot initiate the differentiation of CD4⁺ T cells toward one subset or another, but it acts as an amplifier of Th cell differentiation.

Much less is known about the involvement of the Notch signaling pathway during CD8⁺ T cell response, and most of the experiments addressing its function have been performed *in vitro*. For instance, Notch signaling was shown to directly regulate, via binding of the NICD to their promoter, the transcription of many effector molecules, such as perforine, granzyme B, and IFN- γ , in mouse CD8⁺ T cells (22–24). Similarly, the Notch signaling pathway controls the production of IFN- γ by human CD8⁺ T cells (25). Furthermore, the transcription factor Eomes was defined as a transcriptional target of the Notch signaling pathway in *in vitro* activated CD8⁺ T cells (23). *In vivo*, Notch2 expression by CD8⁺ T cells is essential for the efficient killing of target cells (24), for the control of *Trypanosoma cruzi* infection (24), and for potent antitumor activity (26). Moreover, inhibition of the Notch signaling pathway using either genetic deletion of Rbpj or expression of a dominant-negative form of MAML protected mice from graft-versus-host disease (GVHD) (27, 28). The protective effect of Notch inhibition was not a consequence of decreased alloreactive CD8⁺ T cell expansion, but was most likely the result of defective IFN- γ production (27, 28). However, in this system, Eomes expression was increased, whereas T-bet expression was preserved (27, 28). Very interestingly, inhibition of the Notch signaling pathway during GVHD did not alter the ability of CD8⁺ T cells to lyse tumor cells (28), suggesting that not all the effector functions of CD8⁺ T cells are regulated by Notch.

Over the last years, the Notch signaling pathway has been shown to have the capacity to regulate different aspects of CD8⁺ T cell response following Ag encounter. However, the *in vivo* role of the Notch signaling pathway during infection and vaccination has not been assessed. In this manuscript, we have addressed the requirement for Notch signaling during *in vivo* CD8⁺ T cell response following an infection with the intracellular bacteria *Listeria monocytogenes* or after vaccination with DCs. These two experimental systems allow us to evaluate the influence of an

inflammatory response on the role of the Notch signaling pathway during an active immune response. In this study, we report that Notch signaling influences the formation of SLECs following *Listeria* infection and DC vaccination, whereas it is dispensable for memory CD8⁺ T cell differentiation. The reduced generation of SLECs in absence of Notch signaling correlates with defective CD25 expression by effectors. The Notch signaling pathway was also required for maximal IFN- γ production by effectors after *Listeria* infection and DC vaccination. However, Notch signaling is selectively required for the production of IL-2 and TNF- α following DC vaccination, revealing a contextdependent role for Notch during CD8⁺ T cell response. Furthermore, IFN- γ production was more severely decreased by Notch deficiency following DC vaccination than infection. This more severe reduction in IFN- γ production leads to impaired control of *Listeria* growth following rechallenge. Our results highlight a crucial role for the Notch signaling pathway for the differentiation of functional CD8⁺ T_H1 cells.

Matériels et méthodes

Mice

B6.SJL, (C57BL/6 \times B6.SJL)F1, and OT-1 Rag-1-deficient (29) mice were bred at the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center facility. Notch1^{fl/fl} (B6.129 \times 1-Notch1tm2Rko/GridJ) (30), Notch2^{fl/fl} (B6.129SNotch2 tm3Grid/J) (31), and E8I-cre (C57BL/6-Tg(Cd8a-cre)1Itan/J) (24) mice were purchased from The Jackson Laboratory. Notch1^{fl/fl} were backcrossed to the C57BL/6 background and bred to Notch2^{fl/fl} and E8I-Cre to obtain E8I-Cre^{+/2}Notch1^{fl/fl}Notch2^{fl/fl} mice (Notch1/2-deficient mice, Δ/Δ) and their Notch1^{fl/fl}Notch2^{fl/fl} littermates (Notch1/2-sufficient mice, fl/fl). E8ICre^{+/2}Notch1^{fl/fl}Notch2^{fl/fl} mice were crossed to OT-1 Rag-1-deficient mice to generate Notch-sufficient and -deficient OT-1 Rag-12/2 mice. Mice were housed at the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center Facility, in a pathogen-free environment, and treated in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

L. monocytogenes infection, DC immunization, and analysis of T cell response

L. monocytogenes expressing OVA (Lm-OVA) was grown, as previously described (32). A sublethal dose of 2×10^3 CFUs was injected i.v. for analysis of primary T cell response, whereas a lethal dose of 2×10^5 CFUs was used for challenge experiments. Bone marrow-derived DCs were generated, as previously described (33), matured with LPS (1 mg/ml), and loaded overnight with the OVA257–264 peptide (SIINFEKL, 2 mg/ml; Midwest Biotech). A total of 1.25×10^6 DCs was injected i.v. for vaccination. In some experiments, 15,000 U rIL-2 (Novartis) was injected i.p. twice daily from the day of vaccination until day 7, as described previously (4). The primary endogenous CD8⁺ T cell response was analyzed in the spleen with either Kb-OVA tetramer staining or intracellular cytokine staining following a short in vitro stimulation with the OVA peptide. In some experiments, 10^4 Notch-sufficient or -deficient OT-1 CD8⁺ T cells were adoptively transferred in B6.SJL recipient mice before *Listeria* infection or DC vaccination.

Hematopoietic chimeras

(C57BL/6 X B6.SJL)F1 (CD45.1+CD45.2+) mice were lethally irradiated (12 Gy) and reconstituted with a 50:50 mixture of 5×10^6 bone marrow cells from B6.SJL (CD45.1+) mice and E8I-Cre+/2Notch1^{fl/fl} Notch2^{fl/fl} mice (Notch1/2-deficient mice, Δ/Δ , CD45.2+). Chimeric mice were used at 8 wk postreconstitution.

Abs, flow cytometry, and cell sorting

Anti-CD44 (IM7), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD25 (PC61), anti-Ly6C (HK1.4), anti-IL-2 (JES6-5H4), and anti-TNF- α (MP6-XT22) Abs were from BioLegend; anti-IFN- γ (XMG1.2) Ab was from Life Technologies; anti-CD127 (A7R34), anti-KLRG1 (2F1), anti-T-bet (4B10), and anti-Eomes (Dan11mag) Abs were from eBioscience. Anti-Ki67 (B56) was purchased from BD Biosciences. Cell surface staining, intracellular staining, tetramer staining, and OVA peptide loading on Kb MHC were performed, as previously described (33–35). Cell death was measured using 7-aminoactinomycin D (BD Biosciences) and annexin V (BioLegend) stainings, as previously described (4).

Naive CD8⁺ T cells (CD8⁺CD44⁻), total OVA-specific CD8⁺ effector cells (CD8⁺CD44^{high}Tet-OVA⁺), OVA-specific CD8⁺ SLECs (CD8⁺CD44^{high}Tet-OVA⁺CD127⁻KLRG1⁺), and OVA-specific CD8⁺ Tm cell (CD8⁺CD44^{high}Tet-OVA⁺) were sorted with a BD FACSAria III.

Quantitative real-time PCR

Quantification of *Pdram1*, *Eomes*, and *Tbx21* mRNAs from sorted OVA-specific CD8⁺ T cells was performed, as previously described (4, 35). Briefly, total RNA was isolated using TRIzol (Life Technologies) and reverse transcribed into cDNA using SuperScript II with oligo(dT) primers (Life Technologies). Real-time PCR was performed in triplicates using Power SYBR Green (Life Technologies) on an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Sequences of primers used were as follows: *Prdm1*, 5'-ACACACAGGAGAGAAGCCACATGA-3' and 5'-TCGAAGGTGGGTCTTGAGATTGCT-3'; *Eomes*, 5'-GTTCACCCAGAATCTCCTAAC-3' and 5'-CAGCCTCGGTTGGTATTT-3'; *Tbx21*, 5'-AGGGGACACTCGTATCAACAGA-3' and 5'-AGGGGGCTTCCAACAATG-3'.

PCR for measurement of the deletion of the floxed Notch1 and Notch2 genes

Genomic DNA was extracted from sorted naive CD8⁺ T cells, OVA-specific CD8⁺ effectors, OVA-specific CD8⁺ SLECs, and OVA-specific Tm cells. PCR were performed as described by Zheng et al. (36).

Statistical analysis

Statistical analyses for differences between Notch1/2-sufficient and Notch1/2-deleted mice were done using Student's t test for all experiments except for Lm-OVA rechallenge, in which a Mann-Whitney U test was used. All tests were two sided, and $p > 0.05$ was considered statistically significant. Welch correction was applied when variances were unequal between groups. Only significant statistical differences are indicated on the figures.

Résultats

Notch signaling controls SLEC differentiation

It was shown by us and others that CD8⁺ T cells upregulate Notch1 and Notch2 expression following TCR stimulation (22, 24, 37, 38). However, Notch3 and Notch4 mRNA were not increased (24, 39) (data not shown); thus, the deletion of Notch1 and Notch2 genes should completely abrogate Notch signaling in CD8⁺ T cells. To elucidate the role of the Notch signaling pathway during in vivo CD8⁺ T cell response, Notch1 and Notch2 expression was specifically abrogated in mature CD8⁺ T cells using Notch1^{fl/fl}Notch2^{fl/fl}-E8I-Cre^{+/-} mice (referred as Notch1/2-deficient mice or Δ/Δ through the manuscript). These mice express the Cre recombinase under the CD8a enhancer, allowing for Notch1 and Notch2 deletion only in mature CD8⁺ T cells (24). The efficient and specific deletion of the Notch1 and Notch2 genes in mature CD8⁺ T cells was assessed by flow cytometry. Indeed, Notch1 and Notch2 cell surface expression could not be detected on CD8⁺ T cells from Notch-deficient mice following TCR stimulation (data not shown). Moreover, mice with deletion of the Notch1 and Notch2 genes in CD8⁺ T cells did not show any difference in peripheral CD8⁺ T cell populations (naive, effector, and memory) nor in the expression of various cell surface markers (TCR, CD3, CD44, CD62L, CD127, CD25, CD5, and TCRV β usage) in the steady state when compared with their wild-type littermates (data not shown).

To delineate the role of the Notch signaling pathway in CD8⁺ T cell response, Notch1/2-sufficient and -deficient mice were infected with a sublethal dose of the intracellular bacteria Lm-OVA, allowing us to follow the response of OVA-specific CD8⁺ T cells in an inflammatory environment. The effector response was assessed in the spleen 7 d postinfection using Kb-OVA tetramer staining. As shown in Fig. 1A and 1B, Notch deficiency in CD8⁺ T cells promoted a better expansion of OVA-specific CD8⁺ T cells compared with their wild-type counterpart. The phenotypic characterization of the effectors generated revealed a crucial role for Notch signaling for their proper differentiation into SLECs (Fig. 1C, 1D). OVA-specific CD8⁺ T cells lacking expression of Notch1/2 show a 2-fold reduction in the proportion of SLECs. Although proportionally less SLECs were generated by Notch ^{Δ/Δ} CD8⁺ T cells, this did not lead to a direct reciprocal increase in MPECs (Fig. 1C, 1D). However, an increase in early effector cells (EECs;

KLRG1^{low} and CD127^{low}), the precursors of both SLECs and MPECs (40), is also observed in Notch^{ΔΔ} mice (Fig. 1C, 1D). These results suggest that Notch deficiency is most important for the EEC to SLEC transition.

In our model, Cre-mediated inactivation of the Notch1 and Notch2 genes should only occur in mature peripheral CD8⁺ T cells in favor of a cell-autonomous role for Notch signaling in CD8⁺ T cells. However, it is possible that the Cre transgene is expressed by other cells, which may then influence the CD8⁺ T cell response. To exclude that possibility, we generated mixed bone marrow chimeras by grafting in the same recipient a 1:1 ratio of wild-type (CD45.1⁺) and Notch^{ΔΔ} (CD45.2⁺) bone marrow cells. Following infection with Lm-OVA, SLEC generation was selectively impaired in OVA-specific Te cells originating from Notch^{ΔΔ} hematopoietic cells (Supplemental Fig. 1). These results confirm that Notch signaling acts in a cell-autonomous manner on CD8⁺ Te cell differentiation.

To confirm the role of the Notch signaling pathway during CD8⁺ T cell response, we immunized mice with LPS-matured DCs pulsed with the OVA peptide (DC-OVA). In contrast to Lm-OVA, the CD8⁺ T cell response is primed in a low inflammation setting, and, as a result, fewer SLECs are generated, whereas memory T cell differentiation is accelerated (1, 4, 33, 41, 42). Although CD8⁺ T cell expansion was similar in absence or presence of Notch signaling (Fig. 2A, 2B), SLEC generation was almost abrogated following DC vaccination in Notch^{ΔΔ} mice (Fig. 2C, 2D). Therefore, the Notch signaling pathway plays a very important role during CD8⁺ Te cell terminal differentiation irrespective of the inflammation level.

The defect in SLEC generation in Notch^{ΔΔ} mice could be the consequence of an increased death rate of SLECs, a reduced proliferation of SLECs, or an inability of EECs to differentiate into SLECs. To understand better how Notch signaling affects SLEC differentiation, we evaluated the death rate of the different effector populations using annexin V staining. We did not observe any significant difference in the percentage of annexin V⁺ cells at day 7 postinfection or postvaccination (Supplemental Fig. 2A). We also did not observe any difference in the rate of effector proliferation as measured using Ki67 staining (Supplemental Fig. 2B). Altogether, these results suggest that the decreased generation of SLECs in absence of Notch1/2 is not the

consequence of an increased death rate or reduced proliferation of SLECs, but rather from a defective differentiation of EECs into SLECs.

Although SLEC generation was severely affected following both Lm infection and DC vaccination, few cells with a SLEC phenotype were still present in Notch^{Δ/Δ} mice. To address whether these cells were derived from naive T cells that did not properly delete the Notch1 or Notch2 genes, we evaluated whether the residual SLEC population was enriched for cells that have not deleted the floxed genes using PCR. As shown in Supplemental Fig. 3, this effector population contains cells that have as efficiently deleted Notch1 and Notch2 as the total effector T cell population.

Defective SLEC generation is not the consequence of reduced T-bet expression

The level of expression of the transcription factors T-bet controls the SLEC/MPEC differentiation choice, whereby increased levels of T-bet promote the generation of SLECs, and in absence of T-bet no SLECs are generated (1). Moreover, there is evidence that Tbx21 is a Notch target gene (14, 15, 23). Therefore, we evaluated whether the reduced generation of SLECs in the absence of Notch1/2 correlated with a decrease in T-bet expression. To do so, we used an anti-T-bet Ab that has been reported by others to be specific as measured by a lack of staining of T-bet knockout effector CD8⁺ T cells (1). We observed that Notch^{Δ/Δ} CD8⁺ effectors express similar amount of T-bet protein than Notch^{fl/fl} effectors in both an inflammatory and noninflammatory setting (Fig. 3A). However, following Listeria infection, the level of Tbx21 mRNA was reduced in absence of Notch1/2 (Fig. 3A), but it did not translate into a significant reduction of T-bet protein expression. This suggests that Notch does not control SLEC differentiation by affecting T-bet expression, irrespective of the inflammation level.

Defective SLEC differentiation is the consequence of reduced expression of CD25 by CD8⁺ T cells

In addition to inflammation, prolonged IL-2R signaling on Ag specific CD8⁺ T cells is required to promote SLEC differentiation (3, 43). Furthermore, IL-2 is the key in vivo signal that induced

Blimp-1 expression, which then promotes SLEC differentiation (4). As there is evidence that the Notch signaling pathway controls CD25 expression in immature thymocytes (44) and activated CD4+ T cells (45), we evaluated whether Notch deficiency affects CD25 expression by CD8+ Te cells. The expression level of CD25 is maximal a few days before and becomes undetectable at the peak of the CD8+ T cell response (3). Therefore, to analyze CD25 expression at day 4–5 postimmunization, we adoptively transferred 10^4 OVA-specific OT-I T cells lacking (OT-I/Notch $^{\Delta/\Delta}$) or not (OT-I/Notch $^{fl/fl}$) Notch1 and Notch2 expression in naive B6.SJL congenic recipients. These mice were then infected with Lm-OVA or vaccinated with DC-OVA. As shown in Fig. 3B, OT-I/Notch $^{\Delta/\Delta}$ CD8+ effectors failed to properly express CD25 when compared with OT-I/Notch $^{fl/fl}$ CD8+ Te cells. Furthermore, both the percentage of cells expressing CD25 and the amount expressed by the positive cells are severely reduced in absence of Notch signaling (Fig. 3B). These results suggest that, in our two distinct immunization protocols, Notch signaling controls CD25 expression to promote SLEC generation.

As Notch $^{\Delta/\Delta}$ Ag-specific CD8+ T cells probably received less IL-2 signals, we tested whether twice daily administration of rIL-2 during the expansion phase of the response to DC-OVA vaccination could restore SLEC generation in absence of Notch signaling. As shown in Supplemental Fig. 4, in vivo administration of rIL-2 was not sufficient to promote the generation of SLEC in Notch $^{\Delta/\Delta}$ mice, whereas it enhances SLEC generation in Notch $^{fl/fl}$ mice. One of the mechanisms proposed to explain how the maintenance of CD25 expression on effectors promotes SLEC differentiation is via the upregulation of Blimp-1 (encoded by the gene *Prdm1*) expression (3, 4, 43). Therefore, we evaluated whether Notch $^{\Delta/\Delta}$ effectors express lower level of *Prdm1* using quantitative RT-PCR. As shown in Fig. 3C, *Prdm1* expression was not statistically different between Notch $^{fl/fl}$ and Notch $^{\Delta/\Delta}$ effectors. These results suggest that Notch influences SLEC generation via another mechanism than regulation of the expression of the key transcription factors (T-bet and Blimp-1) known to control this differentiation process.

Notch controls optimal IFN- γ and IL-2 production by CD8+ Te cells

Our results clearly indicate that the Notch signaling pathway affects effector differentiation; we then tested whether the functionality of CD8+ Te cells was also impaired in absence of

Notch1/2. Upon *Listeria* infection, we found a similar frequency of CD8⁺ Te cells producing IFN- γ in Notch $\Delta\Delta$ and Notch^{fl/fl} mice following a short in vitro stimulation with the OVA peptide (Fig. 4A, 4C). However, the amount of IFN- γ produced by cells was reduced in Notch1/2-deficient effectors when compared with Notch-sufficient effectors (Fig. 4A, 4C). Notably, a more drastic effect on IFN- γ production was observed following DC vaccination. Very few Notch-deficient CD8⁺ Te cells produced IFN- γ , and the amount produced by each cell was also severely decreased (Fig. 4B, 4D). Furthermore, the proportion of effectors producing IL-2 and TNF- α was only affected by Notch deficiency following DC vaccination (Fig. 4A–D). These results suggest a differential role for the Notch signaling pathway in the regulation of cytokine production by CD8⁺ effectors depending on the context of the CD8⁺ T cell response.

We next undertook to explain the variation in IFN- γ production. The two transcription factors, T-bet and Eomes, have been shown to be important to regulate IFN- γ expression in CD8⁺ T cells (46, 47). Indeed, in absence of both transcription factors, effector CD8⁺ T cells lose their ability to produce IFN- γ , whereas single deficiency did not alter their ability to produce IFN- γ (46, 47). Interestingly, both *Tbx21* and *Eomes* are potential Notch target genes (14, 15, 23, 24). However, a decrease in the expression level of T-bet cannot explain the more severe reduction of IFN- γ production by Notch $\Delta\Delta$ effectors generated following DC vaccination (Fig. 3A). Therefore, we evaluated whether *Eomes* expression was affected by Notch deficiency. As shown in Fig. 5, *Eomes* expression was lower in effectors that were deficient for the expression of Notch1/2. *Eomes* expression was similarly reduced following both DC vaccination and *Listeria* infection (Fig. 5), suggesting that this reduction is not responsible for the more defective production of IFN- γ by Notch $\Delta\Delta$ effectors following DC vaccination.

To evaluate whether the reduction in IFN- γ production by Notch $\Delta\Delta$ CD8⁺ effectors generated following DC vaccination had a functional impact, we challenged the mice with a lethal dose of Lm-OVA. In this system, efficient elimination of the bacteria will depend on the ability of OVA-specific CD8⁺ Te cells to produce IFN- γ (48, 49). As expected, OVA-specific CD8⁺ T cells lacking or not Notch1/2 expression generated following *Listeria* infection were very efficient at controlling a lethal challenge with Lm-OVA (Fig. 4E). However, Notch $\Delta\Delta$ CD8⁺ effectors

generated with DC vaccination were inefficient at controlling bacterial growth (Fig. 4F), whereas their wildtype counterparts were very effective.

Notch signaling is not required for the generation of CD8+ Tm cells

In the absence of Notch signaling, OVA-specific CD8+ Te cells successfully differentiate into MPECs. However, these effectors express less Eomes (Fig. 5), which might affect their differentiation into long-lived CD8+ Tm cells. We then evaluated whether these MPECs efficiently give rise to Tm cells. At day 45 postinfection with Lm-OVA or postvaccination with DCs, OVA-specific CD8+ Tm cells were generated regardless of the expression of Notch1 and Notch2 receptors (Fig. 6A, 6C). However, Notch1/2 deficiency leads to an increased yield (% Tm cells/% of Te cells) of OVA-specific CD8+ Tm cells following DC vaccination, but not following *Listeria* infection (Fig. 6A, 6C). Furthermore, the CD8+ Tm cells generated in Notch^{ΔΔ} mice are not derived from the survival of cells that did not delete the Notch1 and Notch2 genes (Supplemental Fig. 3). These results indicate that the Notch signaling pathway is not required for CD8+ Tm cell generation, and that in some circumstances it may impede CD8+ Tm cell differentiation.

Although OVA-specific CD8+ Tm cells were generated in Notch^{ΔΔ} mice, it was important to evaluate whether Notch deficiency had altered their functionality. To address that, we evaluated their capacity to produce cytokines following a short in vitro restimulation with the OVA peptide. No difference in IFN- γ production was observed in Notch^{ΔΔ} and Notch^{fl/fl} OVA-specific CD8+ Tm cells that were generated following Lm-OVA infection (Fig. 6B). However, a lower frequency of OVA-specific CD8+ Tm cells produces IFN- γ in Notch^{ΔΔ} mice compared with wild-type mice following DC immunization (Fig. 6D). Moreover, the amount of IFN- γ produced on a per cell basis upon DC vaccination is significantly lower in OVA-specific CD8+ Tm cells lacking expression of the Notch1 and Notch2 receptors (Fig. 6D). Thus, in absence of Notch1/2, the ability to produce IFN- γ is significantly impaired following DC vaccination.

Discussion

Our results demonstrate that the Notch signaling pathway plays specific and crucial roles during the response of CD8⁺ T cells to infection and vaccination. Furthermore, our results uncover a context-dependent role for the Notch signaling during these immune responses.

In this study, we report that the Notch signaling pathway is very important for the proper generation of SLECs during the response of CD8⁺ T cells to both infection and vaccination. One mechanism by which Notch signaling could have impacted SLEC differentiation is via its ability to regulate T-bet expression. Indeed, Tbx21 has been reported to be a direct transcriptional target of Notch in CD4⁺ T cells (14, 15). In CD8⁺ T cells, inhibition of Notch signaling following *in vitro* stimulation of CD8⁺ T cells leads to reduced expression of T-bet, but, unfortunately, the direct binding of the NICD to the Tbx21 gene was not evaluated in this study (23). In our *in vivo* experimental models, we did not observe any significant difference in T-bet protein expression level between Notch-deficient and wild-type effectors. Our results are in agreement with other studies in which no effect of the Notch signaling pathway on T-bet expression by CD4⁺ and CD8⁺ T cells was observed during GVHD (27, 28). Although we did not observe a significant decrease in the level of T-bet protein, the transcription level of Tbx21 was reduced in Notch^{Δ/Δ} effectors obtained following *Listeria* infection, but not following DC vaccination. The reduction in Tbx21 transcription that we observe following Lm-OVA infection is in agreement with the very recent report of Backer et al. (50) using an Influenza infection model. Therefore, this suggests that the Notch signaling pathway may contribute to the regulation of Tbx21 transcription in models with high inflammation. However, as we did not observe any significant effect on protein expression level, it makes it unlikely that the effect of Notch deficiency on Tbx21 transcription is the direct cause of reduced SLEC differentiation in the *Listeria* infection model. Therefore, the effect of the Notch signaling pathway during SLEC differentiation is not via the direct regulation of T-bet expression in our model of *Listeria* infection and DC vaccination. This further suggests that Notch deficiency does not affect SLEC differentiation via a modulation of the response of the CD8⁺ T cells to inflammation, as it is well documented that the level of expression of T-bet in CD8⁺ Te cells is controlled by inflammation level (e.g., IL-12) (1, 51).

Another key signal controlling the differentiation of CD8⁺ effectors into SLECs is IL-2 (3, 4, 43). Indeed, in absence of Notch signaling, Ag-specific CD8⁺ effectors show a severe reduction in CD25 expression and as such receive less IL-2 signaling. This observation is in agreement with the recent publication of Backer et al. (50), who has also observed reduced expression of CD25 by Notch-deficient Ag-specific CD8⁺ Te cells. Therefore, Notch signaling influences SLEC generation by regulating CD25 expression. Further studies are required to determine whether Cd25 is a direct Notch target gene in CD8⁺ T cells, a likely possibility because it has been reported that the NICD can be recruited to the Cd25 promoter in double-negative thymocytes (44) and to the Cd25 enhancer in leukemic T cells (10).

The maintenance of CD25 expression on a subset of effector CD8⁺ T cells is required for the generation of SLECs, and it was proposed, by us and others, that this was necessary to allow for the proper upregulation of Blimp-1 (3, 4), a key transcriptional repressor controlling SLEC differentiation (5, 6). Unexpectedly, in our models, the defective expression of CD25 by Notch^{ΔΔ} effectors did not prevent the upregulation of Prdm1 transcription. Furthermore, rIL-2 supplementation during the expansion phase of the CD8⁺ T cell response to DC-OVA vaccination did not rescue SLEC generation, suggesting that Notch affects SLEC differentiation independently of Blimp-1. A possible mechanism by which Notch regulation of CD25 expression could affect SLEC differentiation is via modulation of T cell metabolism, as IL-2 signaling is known to regulate the activity of the Akt/mTOR pathway (52–55). This possibility is in agreement with the very recent observation of Backer et al. (50), who have shown reduced activation of the Akt-mTOR pathway in Notch deficient CD8⁺ Te cells.

It is intriguing that we observe a severe SLEC differentiation defect even if Notch^{ΔΔ} effectors were able to upregulate the expression of T-bet and Blimp-1. This suggests that either Notch signaling acts in concert with T-bet and/or Blimp-1 during SLEC differentiation or that it regulates another pathway (for example metabolism) controlling SLEC differentiation. Further studies are required to better define how the Notch signaling pathway influences SLEC differentiation.

Unlike what would have been expected from in vitro studies (22, 23, 37), ablation of Notch1 and Notch2 receptor expression did not decrease the in vivo proliferation of CD8⁺ T cells. This difference might be the result of unspecific effect of the Notch inhibitors that were used for the

in vitro studies. Furthermore, CD8⁺ T cell in vivo proliferation was not affected by Notch deficiency during the alloresponse that occurs during GVHD (27, 28). In our models, following in vivo response to an infection with *Listeria*, but not following DC vaccination, CD8⁺ T cell expansion was enhanced in absence of Notch1/2 expression by CD8⁺ T cells. This suggests that Notch activation during an immune response to a pathogen that induced high level of inflammation is deleterious to T cell expansion. Further studies are required to understand the distinct effect of the Notch signaling pathway during different in vivo CD8⁺ T cell responses.

Our results also highlight that the Notch signaling pathway controls the ability of CD8⁺ Te cells to produce cytokines in a context-dependent manner. It seems that when the CD8⁺ T cell response is primed in the context of a pathogen (*Listeria* infection), the absence of Notch signaling on cytokine production by CD8⁺ Te cells is less important than in a low inflammatory context (DC vaccination). Indeed, IL-2 and TNF- α production by Ag-specific CD8⁺ Te cells is only affected following DC vaccination in absence of Notch1 and Notch2. This illustrates a context-dependent role for the Notch signaling pathway and is reminiscent of what has been observed during GVHD (27, 28), a non pathogen driven immune response. When inflammation is low, it is possible that there is less induction of the key transcription factors controlling the production of IL-2 and TNF- α , which then renders the optimal production of these cytokines dependent on Notch signaling. Therefore, the NICD may directly bind to the promoter/ enhancer of the *Il2* and *Tnfa* genes. Alternatively, Notch signaling may act in a noncanonical manner (without binding of the NICD to RBPJ) to regulate the production of these cytokines. Indeed, the NICD has been reported to interact with signaling components of the TCR (56–58), and thus, it is possible that Notch deficiency affects TCR signaling, which in turn influences cytokine production. Further studies are required to decipher the mechanism by which Notch signaling controls the production of IL-2 and TNF- α in CD8⁺ Te cells.

The production of IFN- γ was affected following both *Listeria* infection and DC vaccination, although the effect was more severe after DC vaccination. This suggests that priming of CD8⁺ T cells during infection is able to induce some transcription of the *Ifng* gene in absence of the NICD, whereas binding of the NICD to the *Ifng* promoter is required following DC vaccination, which occurs in a low inflammatory context. It was shown that the two transcription factors, T-bet and Eomes, act together to regulate IFN- γ production in effector CD8⁺ T cells; when both

are absent, CD8⁺ T cells lose their ability to produce IFN- γ (47). Although we have observed that Notch-deficient CD8⁺ Te cells express lower amount of Eomes, this decrease cannot explain the selective defect of IFN- γ that we observed following DC vaccination because it occurs following both *Listeria* infection and DC vaccination. However, following DC vaccination, less T-bet is induced than following infection. Thus, it is possible that it is the combined decrease of Eomes and T-bet expression observed in Notch $^{\Delta\Delta}$ effectors that regulates the transcription of the *Ifng* gene in DC vaccination. In contrast, it was shown by others that the *Ifng* gene is a direct target gene of the Notch signaling pathway (14, 21). Therefore, when the inflammation level is high, such as following an infection, it is possible that a different set or quantity of transcription factors is induced, and that this can compensate for the lack of NICD binding to the *Ifng* promoter. Alternatively, the difference in the duration of antigenic presentation that occurs following DC vaccination versus *Listeria* infection may affect the expression of key transcription factors controlling the transcription of the *Ifng* gene, making Notch signaling important to induce maximal production of IFN- γ by CD8⁺ T cells. Interestingly, the defective ability of Notch $^{\Delta\Delta}$ CD8⁺ T cells to produce IFN- γ was maintained at the memory stage, suggesting that the absence of binding of the NICD to the *Ifng* gene has a permanent impact on the ability of the Ag-specific CD8⁺ T cells to produce this cytokine.

The severe reduction of IFN- γ and TNF- α production by Notch $^{\Delta\Delta}$ CD8⁺ Te cells generated following DC vaccination has a functional consequence because these effectors were not able to control a challenge with a lethal dose of Lm-OVA. The fact that the CD8⁺ Te cells generated following *Listeria* infection are able to control the same challenge, although they also produce less IFN- γ , might be explained by their maintenance of normal TNF- α production, a cytokine that has been shown to be important for *Listeria* elimination (49, 59).

Our results also demonstrate that Notch signaling is dispensable for the generation of CD8⁺ Tm cells. However, in the DC vaccination model, the yield of Ag-specific CD8⁺ Tm cells was higher in absence of the Notch1 and Notch2 receptors. One possible explanation could be that the reduced production of IFN- γ by Notch $^{\Delta\Delta}$ CD8⁺ Te cells allows for a better survival of Ag-specific T cells during the contraction phase of the T cell response. Indeed, it was previously shown that IFN- γ contributes to the contraction phase of the CD8⁺ T cell response (60, 61).

In summary, the Notch signaling pathway influences various aspects of the CD8⁺ T cell response. Interestingly, some of the effects of the Notch signaling pathway are dependent on the context in which the CD8⁺ T cell response occurs. Further identification of the Notch target genes during different types of CD8⁺ T cell response should shed light on the mechanism by which the Notch signaling pathway influences the differentiation of Ag-specific CD8⁺ T cells during different immune responses.

Remerciements

We thank all the members of the laboratory (Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center) for helpful discussion. We thank Sylvie Lesage (Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center) for critical reading of the manuscript. We thank all the animal care staff (Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center) for mice husbandry and Martine Dupuis for cell sorting. We thank Alain Lamarre for help with tetramer preparation and Denis-Claude Roy for providing rIL-2. We acknowledge J. Shen for providing us with the Notch1 and Notch2 deletion PCR protocols.

Références

1. Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Hageman, L. Gapin, and S. M. Kaech. 2007. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27: 281–295.
2. Sarkar, S., V. Kalia, W. N. Haining, B. T. Konieczny, S. Subramaniam, and R. Ahmed. 2008. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J. Exp. Med.* 205: 625–640.
3. Kalia, V., S. Sarkar, S. Subramaniam, W. N. Haining, K. A. Smith, and R. Ahmed. 2010. Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 32:91–103.

4. Boulet, S., J. F. Daudelin, and N. Labrecque. 2014. IL-2 induction of Blimp-1 is a key in vivo signal for CD8⁺ short-lived effector T cell differentiation. *J. Immunol.* 193: 1847–1854.
5. Rutishauser, R. L., G. A. Martins, S. Kalachikov, A. Chandele, I. A. Parish, E. Meffre, J. Jacob, K. Calame, and S. M. Kaech. 2009. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* 31: 296–308.
6. Kallies, A., A. Xin, G. T. Belz, and S. L. Nutt. 2009. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* 31: 283–295.
7. Osborne, B. A., and L. M. Minter. 2007. Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 64–75.
8. Palomero, T., W. K. Lim, D. T. Odom, M. L. Sulis, P. J. Real, A. Margolin, K. C. Barnes, J. O’Neil, D. Neuberg, A. P. Weng, et al. 2006. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 18261–18266.
9. Weng, A. P., J. M. Millholland, Y. Yashiro-Ohtani, M. L. Arcangeli, A. Lau, C. Wai, C. Del Bianco, C. G. Rodriguez, H. Sai, J. Tobias, et al. 2006. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* 20: 2096–2109.
10. Geimer Le Lay, A. S., A. Oravec, J. Mastio, C. Jung, P. Marchal, C. Ebel, D. Dembe’le’, B. Jost, S. Le Gras, C. Thibault, et al. 2014. The tumor suppressor Ikaros shapes the repertoire of notch target genes in T cells. *Sci. Signal.* 7: ra28.
11. Wang, H., C. Zang, L. Taing, K. L. Arnett, Y. J. Wong, W. S. Pear, S. C. Blacklow, X. S. Liu, and J. C. Aster. 2014. NOTCH1-RBPJ complexes drive target gene expression through dynamic interactions with superenhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 705–710.
12. Radtke, F., H. R. MacDonald, and F. Tacchini-Cottier. 2013. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 427–437.

13. Amsen, D., J. M. Blander, G. R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo, and R. A. Flavell. 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117: 515–526.
14. Minter, L. M., D. M. Turley, P. Das, H. M. Shin, I. Joshi, R. G. Lawlor, O. H. Cho, T. Palaga, S. Gottipati, J. C. Telfer, et al. 2005. Inhibitors of gammasecretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat. Immunol.* 6: 680–688.
15. Roderick, J. E., G. Gonzalez-Perez, C. A. Kuksin, A. Dongre, E. R. Roberts, J. Srinivasan, C. Andrzejewski, Jr., A. H. Fauq, T. E. Golde, L. Miele, and L. M. Minter. 2013. Therapeutic targeting of NOTCH signaling ameliorates immune-mediated bone marrow failure of aplastic anemia. *J. Exp. Med.* 210:1311–1329.
16. Amsen, D., A. Antov, D. Jankovic, A. Sher, F. Radtke, A. Souabni, M. Busslinger, B. McCright, T. Gridley, and R. A. Flavell. 2007. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 27: 89–99.
17. Fang, T. C., Y. Yashiro-Ohtani, C. Del Bianco, D. M. Knoblock, S. C. Blacklow, and W. S. Pear. 2007. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 27: 100–110.
18. Mukherjee, S., M. A. Schaller, R. Neupane, S. L. Kunkel, and N. W. Lukacs. 2009. Regulation of T cell activation by Notch ligand, DLL4, promotes IL-17 production and Rorc activation. *J. Immunol.* 182: 7381–7388.
19. Elyaman, W., R. Bassil, E. M. Bradshaw, W. Orent, Y. Lahoud, B. Zhu, F. Radtke, H. Yagita, and S. J. Khoury. 2012. Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells. *Immunity* 36: 623–634.
20. Anastasi, E., A. F. Campese, D. Bellavia, A. Bulotta, A. Balestri, M. Pascucci, S. Checquolo, R. Gradini, U. Lendahl, L. Frati, et al. 2003. Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 171: 4504–4511.

21. Bailis, W., Y. Yashiro-Ohtani, T. C. Fang, R. D. Hatton, C. T. Weaver, D. Artis, and W. S. Pear. 2013. Notch simultaneously orchestrates multiple helper T cell programs independently of cytokine signals. *Immunity* 39: 148–159.
22. Palaga, T., L. Miele, T. E. Golde, and B. A. Osborne. 2003. TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-gamma production in peripheral T cells. *J. Immunol.* 171: 3019–3024.
23. Cho, O. H., H. M. Shin, L. Miele, T. E. Golde, A. Fauq, L. M. Minter, and B. A. Osborne. 2009. Notch regulates cytolytic effector function in CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 182: 3380–3389.
24. Maekawa, Y., Y. Minato, C. Ishifune, T. Kurihara, A. Kitamura, H. Kojima, H. Yagita, M. Sakata-Yanagimoto, T. Saito, I. Taniuchi, et al. 2008. Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat. Immunol.* 9: 1140–1147.
25. Kuijk, L. M., M. I. Verstege, N. V. Rekers, S. C. Bruijns, E. Hooijberg, B. O. Roep, T. D. de Gruijl, Y. van Kooyk, and W. W. Unger. 2013. Notch controls generation and function of human effector CD8⁺ T cells. *Blood* 121:2638–2646.
26. Sugimoto, K., Y. Maekawa, A. Kitamura, J. Nishida, A. Koyanagi, H. Yagita, H. Kojima, S. Chiba, M. Shimada, and K. Yasutomo. 2010. Notch2 signaling is required for potent antitumor immunity in vivo. *J. Immunol.* 184: 4673–4678.
27. Zhang, Y., A. R. Sandy, J. Wang, V. Radojicic, G. T. Shan, I. T. Tran, A. Friedman, K. Kato, S. He, S. Cui, et al. 2011. Notch signaling is a critical regulator of allogeneic CD4⁺ T-cell responses mediating graft-versus-host disease. *Blood* 117: 299–308.
28. Sandy, A. R., J. Chung, T. Toubai, G. T. Shan, I. T. Tran, A. Friedman, T. S. Blackwell, P. Reddy, P. D. King, and I. Maillard. 2013. T cell-specific notch inhibition blocks graft-versus-host disease by inducing a hyporesponsive program in alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 190: 5818–5828.
29. Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17–27.

30. Yang, X., R. Klein, X. Tian, H. T. Cheng, R. Kopan, and J. Shen. 2004. Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Dev. Biol.* 269:81–94.
31. McCright, B., J. Lozier, and T. Gridley. 2006. Generation of new Notch2 mutant alleles. *Genesis* 44: 29–33.
32. Bahjat, K. S., W. Liu, E. E. Lemmens, S. P. Schoenberger, D. A. Portnoy, T. W. Dubensky, Jr., and D. G. Brockstedt. 2006. Cytosolic entry controls CD8+ T-cell potency during bacterial infection. *Infect. Immun.* 74: 6387–6397.
33. Lacombe, M. H., M. P. Hardy, J. Rooney, and N. Labrecque. 2005. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8+ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J. Immunol.* 175: 4400–4407.
34. Ostiguy, V., E. L. Allard, M. Marquis, J. Leignadier, and N. Labrecque. 2007. IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *J. Leukoc. Biol.* 82: 645–656.
35. Mathieu, M., N. Cotta-Grand, J. F. Daudelin, S. Boulet, R. Lapointe, and N. Labrecque. 2012. CD40-activated B cells can efficiently prime antigenspecific naive CD8+ T cells to generate effector but not memory T cells. *PLoS One* 7: e30139.
36. Zheng, J., H. Watanabe, M. Wines-Samuelson, H. Zhao, T. Gridley, R. Kopan, and J. Shen. 2012. Conditional deletion of Notch1 and Notch2 genes in excitatory neurons of postnatal forebrain does not cause neurodegeneration or reduction of Notch mRNAs and proteins. *J. Biol. Chem.* 287: 20356–20368.
37. Mathieu, M., N. Cotta-Grand, J. F. Daudelin, P. The´bault, and N. Labrecque. 2013. Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8(+) T-cell activation. *Immunol. Cell Biol.* 91: 82–88.
38. Fiorini, E., E. Merck, A. Wilson, I. Ferrero, W. Jiang, U. Koch, F. Auderset, E. Laurenti, F. Tacchini-Cottier, M. Pierres, et al. 2009. Dynamic regulation of notch 1 and notch 2 surface expression during T cell development and activation revealed by novel monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 183: 7212–7222.

39. Tran, I. T., A. R. Sandy, A. J. Carulli, C. Ebens, J. Chung, G. T. Shan, V. Radojcic, A. Friedman, T. Gridley, A. Shelton, et al. 2013. Blockade of individual Notch ligands and receptors controls graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* 123: 1590–1604.
40. Obar, J. J., E. R. Jellison, B. S. Sheridan, D. A. Blair, Q. M. Pham, J. M. Zickovich, and L. Lefranc,ois. 2011. Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *J. Immunol.*187: 4967–4978.
41. Badovinac, V. P., K. A. Messingham, A. Jabbari, J. S. Haring, and J. T. Harty. 2005. Accelerated CD8⁺ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat. Med.* 11: 748–756.
42. Pham, N. L., V. P. Badovinac, and J. T. Harty. 2009. A default pathway of memory CD8 T cell differentiation after dendritic cell immunization is deflected by encounter with inflammatory cytokines during antigen-driven proliferation. *J.Immunol.* 183: 2337–2348.
43. Pipkin, M. E., J. A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M. G. Lichtenheld, M. J. Bevan, and A. Rao. 2010. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32: 79–90.
44. Maillard, I., L. Tu, A. Sambandam, Y. Yashiro-Ohtani, J. Millholland, K. Keeshan, O. Shestova, L. Xu, A. Bhandoola, and W. S. Pear. 2006. The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *J. Exp. Med.* 203: 2239–2245.
45. Adler, S. H., E. Chiffoleau, L. Xu, N. M. Dalton, J. M. Burg, A. D. Wells, M. S. Wolfe, L. A. Turka, and W. S. Pear. 2003. Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *J. Immunol.* 171: 2896–2903.
46. Intlekofer, A. M., N. Takemoto, E. J. Wherry, S. A. Longworth, J. T. Northrup, V. R. Palanivel, A. C. Mullen, C. R. Gasink, S. M. Kaech, J. D. Miller, et al. 2005. Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6: 1236–1244.
47. Intlekofer, A. M., A. Banerjee, N. Takemoto, S. M. Gordon, C. S. Dejong, H. Shin, C. A. Hunter, E. J. Wherry, T. Lindsten, and S. L. Reiner. 2008. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8⁺ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* 321: 408–411.

48. Messingham, K. A., V. P. Badovinac, A. Jabbari, and J. T. Harty. 2007. A role for IFN-gamma from antigen-specific CD8⁺ T cells in protective immunity to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 179: 2457–2466.
49. Pamer, E. G. 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 812–823.
50. Backer, R. A., C. Helbig, R. Gentek, A. Kent, B. J. Laidlaw, C. X. Dominguez, Y. S. de Souza, S. E. van Trierum, R. van Beek, G. F. Rimmelzwaan, et al. 2014. A central role for Notch in effector CD8⁽⁺⁾ T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 15: 1143–1151.
51. Takemoto, N., A. M. Intlekofer, J. T. Northrup, E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2006. Cutting edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8⁺ T cell differentiation. *J. Immunol.* 177:7515–7519.
52. Sinclair, L. V., D. Finlay, C. Feijoo, G. H. Cornish, A. Gray, A. Ager, K. Okkenhaug, T. J. Hagenbeek, H. Spits, and D. A. Cantrell. 2008. Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nat. Immunol.* 9: 513–521.
53. Cornish, G. H., L. V. Sinclair, and D. A. Cantrell. 2006. Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood* 108: 600–608.
54. Kim, E. H., J. A. Sullivan, E. H. Plisch, M. M. Tejera, A. Jatzek, K. Y. Choi, and M. Suresh. 2012. Signal integration by Akt regulates CD8 T cell effector and memory differentiation. *J. Immunol.* 188: 4305–4314.
55. Macintyre, A. N., D. Finlay, G. Preston, L. V. Sinclair, C. M. Waugh, P. Tamas, C. Feijoo, K. Okkenhaug, and D. A. Cantrell. 2011. Protein kinase B controls transcriptional programs that direct cytotoxic T cell fate but is dispensable for T cell metabolism. *Immunity* 34: 224–236.
56. Guy, C. S., K. M. Vignali, J. Temirov, M. L. Bettini, A. E. Overacre, M. Smeltzer, H. Zhang, J. B. Huppa, Y. H. Tsai, C. Lobry, et al. 2013. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat. Immunol.* 14: 262–270.
57. Dongre, A., L. Surampudi, R. G. Lawlor, A. H. Fauq, L. Miele, T. E. Golde, L. M. Minter, and B. A. Osborne. 2014. Non-canonical Notch signaling drives activation and differentiation of peripheral CD4⁽⁺⁾ T cells. *Front. Immunol.* 5: 54.

58. Shin, H. M., M. E. Tilahun, O. H. Cho, K. Chandiran, C. A. Kuksin, S. Keerthivasan, A. H. Fauq, T. E. Golde, L. Miele, M. Thome, et al. 2014. NOTCH1 can initiate NF- κ B activation via cytosolic interactions with components of the T cell signalosome. *Front. Immunol.* 5: 249.
59. White, D. W., and J. T. Harty. 1998. Perforine-deficient CD8⁺ T cells provide immunity to *Listeria monocytogenes* by a mechanism that is independent of CD95 and IFN- γ but requires TNF- α . *J. Immunol.* 160: 898–905.
60. Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2004. CD8⁺ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat. Immunol.* 5: 809–817.
61. Badovinac, V. P., A. R. Tvinnereim, and J. T. Harty. 2000. Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon- γ . *Science* 290: 1354–1358.

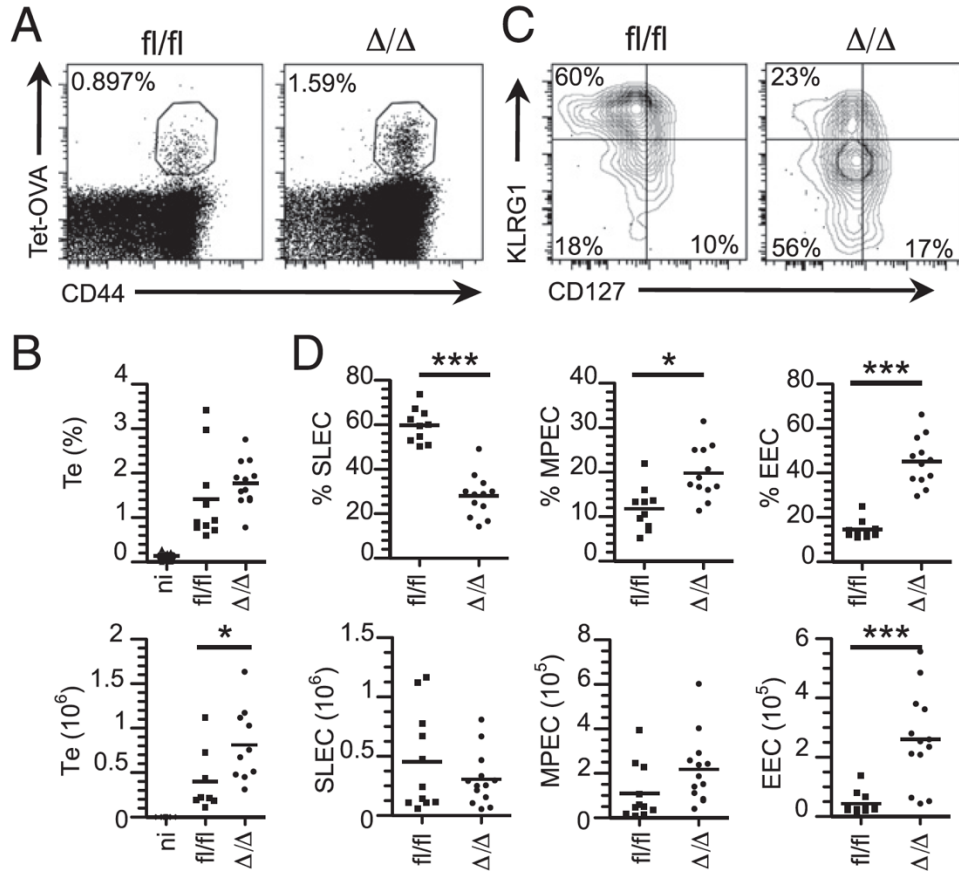


FIGURE 1. Notch signaling influences CD8⁺ T cell expansion and effector differentiation following infection with Listeria.

Notch-sufficient (fl/fl) and -deficient mice (Δ/Δ) were infected or not (not infected, ni) with Lm-OVA. Effector response was assessed in the spleen 7 d postinfection. (A) Representative FACS profiles (gated on CD8⁺ T cells) showing frequencies of OVA-specific CD8⁺ T cells (Tet-OVA⁺CD44^{high}). (B) Percentage (top panel) and numbers (bottom panel) of OVA-specific Te cells are shown. (C) Representative FACS plots showing frequencies of SLECs (KLRG1^{high} and CD127^{low}), MPECs (KLRG1^{low} and CD127^{high}), and EECs (KLRG1^{low} and CD127^{low}) within OVA-specific CD8⁺ T cells. (D) Percentage (top panels) and number (bottom panels) of SLECs (left panel), MPECs (middle panel), and EECs (right panel) are shown. Data are representative of four independent experiments with 2 mice per group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

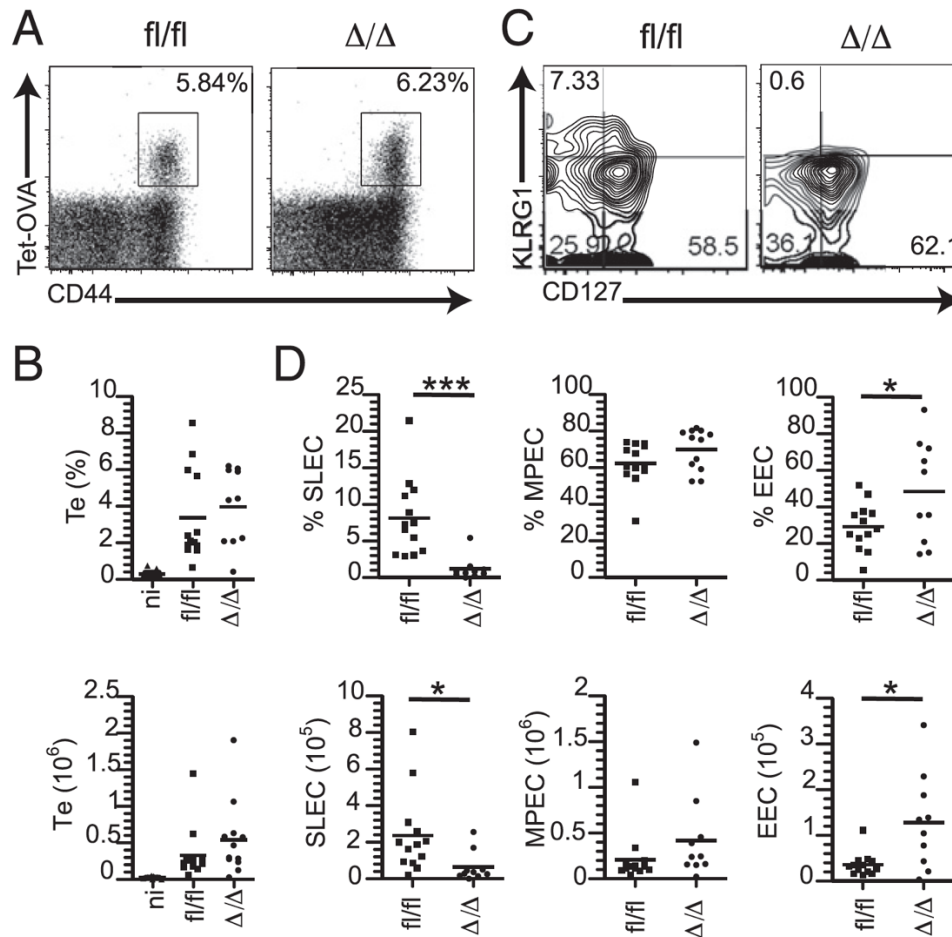


FIGURE 2. Notch deficiency impairs SLEC differentiation following DC vaccination.

Notch-sufficient (fl/fl) and -deficient mice (Δ/Δ) were immunized with DCs loaded or not (no immunization, ni) with the SIINFELK peptide. Effector response was assessed in the spleen 7 d postvaccination. (A) Representative FACS profiles (gated on CD8⁺ T cells) showing frequencies of OVA-specific CD8⁺ T cells (Tet-OVA⁺CD44^{high}). (B) Percentage (top panel) and numbers (bottom panel) of OVA-specific CD8⁺ Te cells are shown. (C) Representative FACS plots showing frequencies of SLECs (KLRG1^{high} and CD127^{low}), MPECs (KLRG1^{low} and CD127^{high}), and EECs (KLRG1^{low} and CD127^{low}) within OVA-specific CD8⁺ T cells. (D) Percentage (top panels) and number (bottom panels) of SLECs (left panel), MPECs (middle panel), and EECs (right panel) are shown. Data are representative of four independent experiments with 2 mice per group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

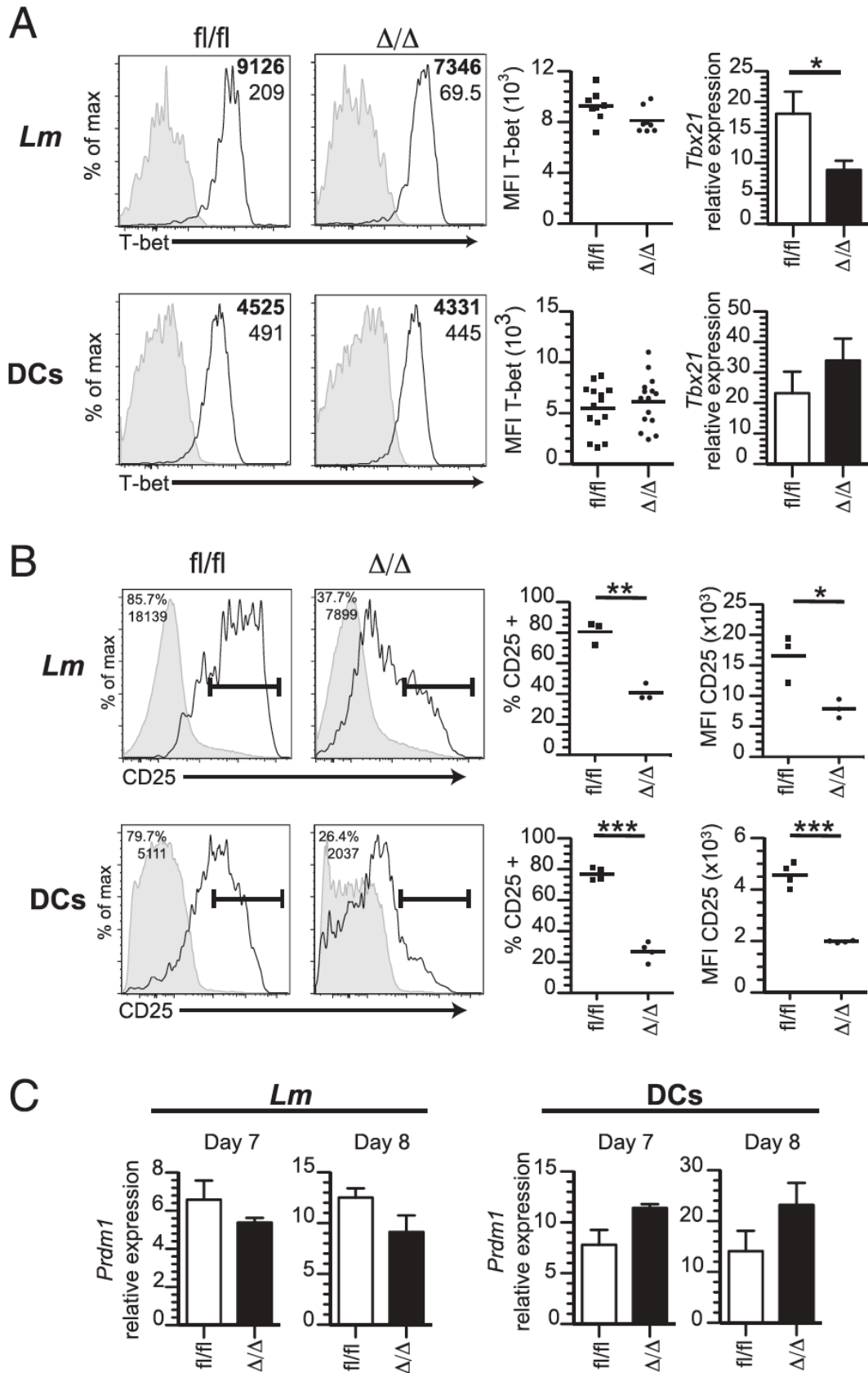


FIGURE 3. Notch-deficient CD8⁺ Te cells express reduced level of CD25, but normal level of T-bet and Blimp-1. (A) Expression of T-bet. Notch-sufficient (fl/fl) and -deficient (Δ/Δ) mice were infected with Lm-OVA (top panels) or immunized with DCs (bottom panels), as in Figs. 1 and 2. The expression of T-bet was assessed 7 d postinfection or postimmunization by flow cytometry and quantitative RT-PCR. The representative overlay histogram shows staining of OVA-specific CD8⁺ Te cells (TetOVA⁺CD44^{high}) with the isotype control Ab (filled histogram) or anti-T-bet Ab (black line). The mean fluorescence intensity (MFI) is shown on each overlay; the upper bold number indicates the MFI for the anti-T-bet Ab, and the lower number the MFI for the isotype control Ab staining of OVA-specific Te cells (CD8⁺TetOVA⁺CD44^{high}). The graphs show the compilation of MFI of T-bet and the relative mRNA expression level of Tbx21 on OVA-specific CD8⁺ Te cells. The flow cytometry data are representative of three (Lm infection) or four (DC immunization) independent experiments with 2 mice per group. The quantitative RT-PCR data are from two independent experiments with three mice per group. (B) Notch signaling is required for CD25 upregulation by Ag-specific CD8⁺ Te cells. B6SJL (CD45.1⁺) mice were transferred with 10⁴ Notch-sufficient (fl/fl) or -deficient (Δ/Δ) OT-1 CD8⁺ T lymphocytes (CD45.2⁺), followed by infection with Lm-OVA (top panels) or immunization with DC-OVA (bottom panels), as described in Figs. 1 and 2. The expression of CD25 on OT-1 T cells was determined 5 d postinfection or 4 d postvaccination. The representative histograms show the expression of CD25 on Notch-sufficient OT-1 (fl/fl) or Notch-deficient OT-1 (Δ/Δ) OT-1 CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺CD45.2⁺). The staining for endogenous CD8⁺ T cells (CD8⁺CD45.2²) is shown as a filled histogram. The percentage of CD25⁺ OT-1 T cells and their MFI are shown on each histogram. The graphs show compilation of the percentage of CD25⁺ OT-1 cells and their MFI for each mouse. Data are representative of one independent experiment with three or four mice per group. (C) Blimp-1 expression. The relative mRNA expression level of Prdm1 by sorted OVA-specific CD8⁺ T cells (day 7 or 8 postinfection/vaccination) was evaluated by quantitative RTPCR. The results from two independent experiments are shown (one at day 7 and one at day 8). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

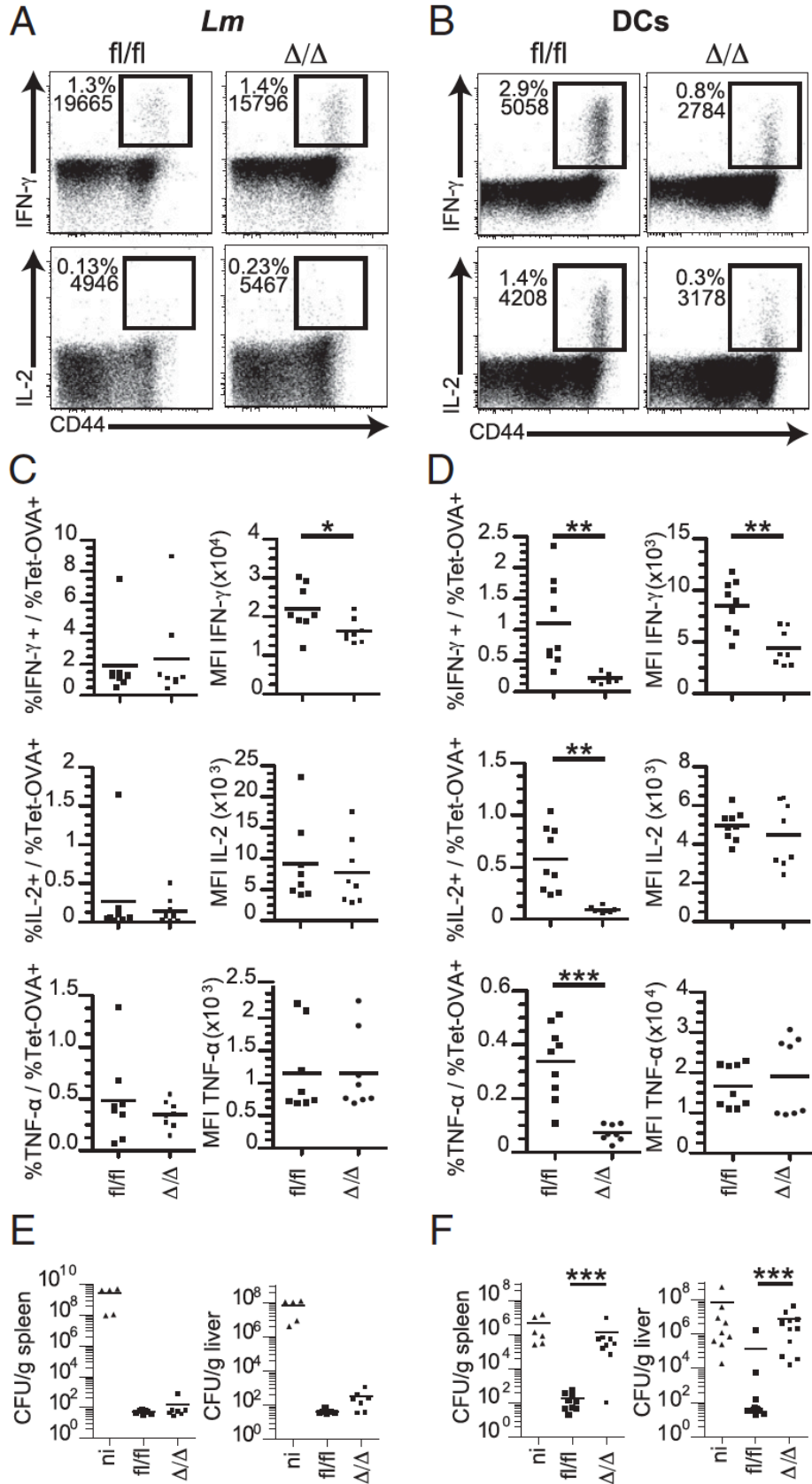


FIGURE 4. Ag-specific Notch-deficient CD8⁺ Te cells generated following DC vaccination have a more severe impairment in functionality than the one obtained following Listeria infection. Notch-sufficient (fl/fl) and -deficient mice (Δ/Δ) were infected with Lm-OVA (A, C, and E) or immunized with DCs (B, D, and F). Cytokine production was assessed on day 7 postinfection or postvaccination following a short in vitro restimulation with the OVA peptide. (A and B) Representative dot plots demonstrating the frequency of IFN- γ - or IL-2-producing CD8⁺ Te cells are shown. The percentage of CD8⁺ Te cells producing IFN- γ or IL-2 and their mean fluorescence intensity (MFI) are indicated on the respective dot plot. (C and D) Graphs represent the proportion of cells producing the cytokine (% cytokine+/% Tet-OVA+; left panel) and MFI (right panel) of IFN- γ (top panels)- or IL-2 (middle panels)- or TNF- α (bottom panels)-producing effectors. (E and F) Bacterial burden in spleen and liver at day 3 postchallenge with a lethal dose of Lm-OVA of mice that were infected 7 d before with Lm-OVA (E) or vaccinated with DC-OVA (F). Data are representative of two (E) or three independent experiments with 5 mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

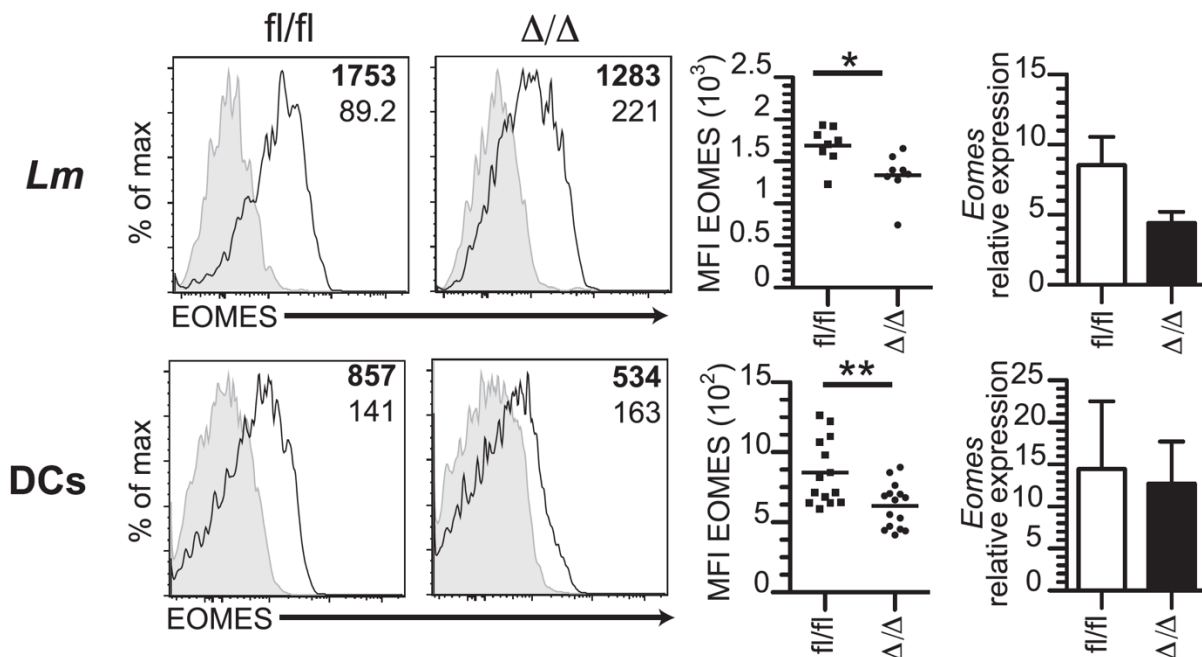


FIGURE 5. Notch-deficient CD8⁺ Te cells express decreased level of Eomes. Notch-sufficient (fl/fl) and -deficient (Δ/Δ) mice were infected with Lm-OVA (top panels) or immunized with DCs (bottom panels), as in Figs. 1 and 2. The expression of Eomes was assessed by flow cytometry 7 d postinfection or postimmunization. The representative overlay histogram shows Eomes expression by OVA-specific CD8⁺ Te cells (TetOVA⁺CD44^{high}) or isotype control staining (on OVA-specific CD8⁺ Te cells). The mean fluorescence intensity (MFI) is shown on each overlay; the upper bold number indicates the MFI of OVA-specific Te cells (TetOVA⁺CD44^{high}), whereas the lower number is the MFI for the isotype control staining. The graphs show compilation of MFI of Eomes expression (middle) or the relative mRNA expression level of Eomes by OVA-specific Te cells. Flow cytometry data are representative of three (Lm infection) or four (DC immunization) independent experiments with 2 mice per group, whereas the quantitative RT-PCR data are from two independent experiments with three mice per group. *p<0.05, **p<0.01.

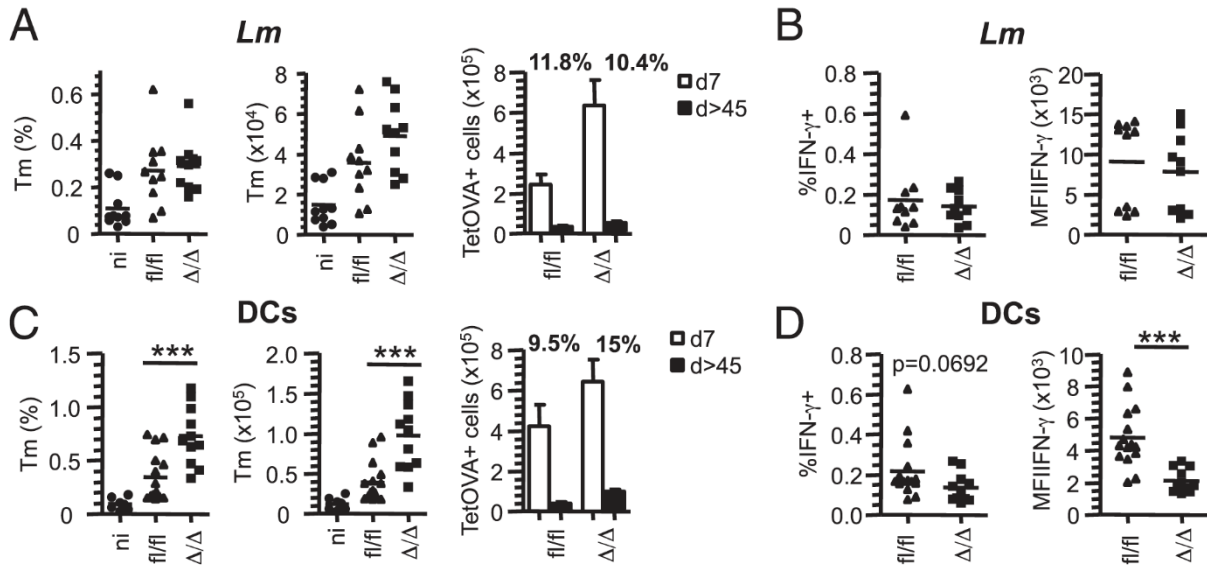


FIGURE 6. Notch is dispensable for memory generation. Notch-sufficient (fl/fl) and –deficient mice (Δ/Δ) were infected with Lm-OVA (A and B) or immunized with DCs (C and D), as described in Figs. 1 and 2. The generation of OVA-specific CD8⁺ Tm cells and their ability to produce IFN-γ were analyzed at 45–65 d postinfection or postimmunization. Cytokine production was measured after a short in vitro restimulation with the OVA peptide. (A and C) Graphs represent the percentage (left panel) of OVA-specific CD8⁺ Tm cells (Tet-OVA⁺CD44^{high}), the number of OVA-specific CD8⁺ Tm cells (Tet-OVA⁺CD44^{high}Ly6C^{high}; middle panel), and the yield of Tm cells (right panel). (B and D) Graphs show the percentage (left panel) and the mean fluorescence intensity (MFI) (right panel) of IFN-γ–producing OVA-specific CD8⁺ Tm cells. Data are representative of four independent experiments with 2 mice per group. ***p<0.001.

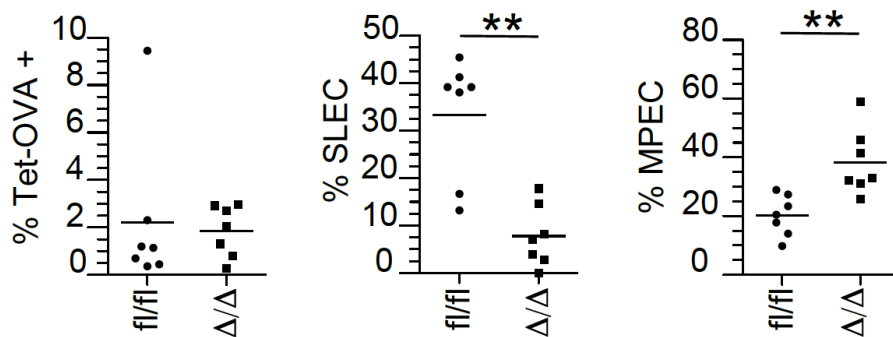


FIGURE S1. Notch signalling affects SLEC differentiation in a cell autonomous manner. Recipient mice (CD45.2⁺/CD45.1⁺) were lethally irradiated and reconstituted with a 50:50 mixture of bone marrow cells from Notch sufficient (B6SJL mice, CD45.1⁺ mice (CD45.2⁺)). Chimeras were infected with Lm-OVA and Ag-specific CD8⁺ T cell response was assessed in the spleen 7 days post-infection. (A) Frequencies of OVA-specific CD8⁺ T cells (Tet-OVA+CD44^{hi}) are shown. (B) Percentage of SLECs (left panel) and MPEC (right panel). Data are representative of two independent experiments with three or four mice per group. **p>0.01

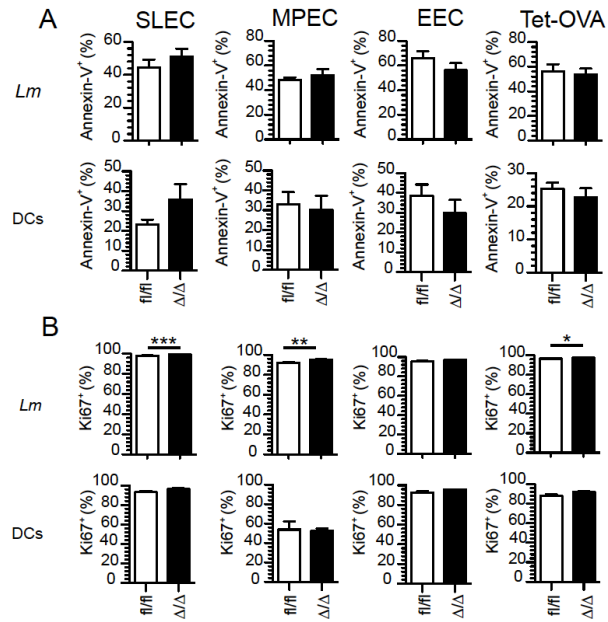


Figure S2. Notch signalling does not affect survival nor proliferation of CD8⁺ Te cells. Notch sufficient (fl/fl) and deficient (Δ/Δ) mice were either infected with Lm-OVA or immunized with DCs as in Figures 1 and 2. (A) The graphs show the percentage of Annexin V⁺ cells among OVA-specific CD8⁺ SLECs (KLRG1^{hi} and CD127^{lo}), MPECs (KLRG1^{lo} and CD127^{hi}), EECs (KLRG1^{lo} and CD127^{lo}) and total effectors. (B) The graphs show the percentage of Ki67⁺ cells among OVA-specific CD8⁺ SLECs (KLRG1^{hi} and CD127^{lo}), MPECs (KLRG1^{lo} and CD127^{hi}), EECs (KLRG1^{lo} and CD127^{lo}) and total effectors.

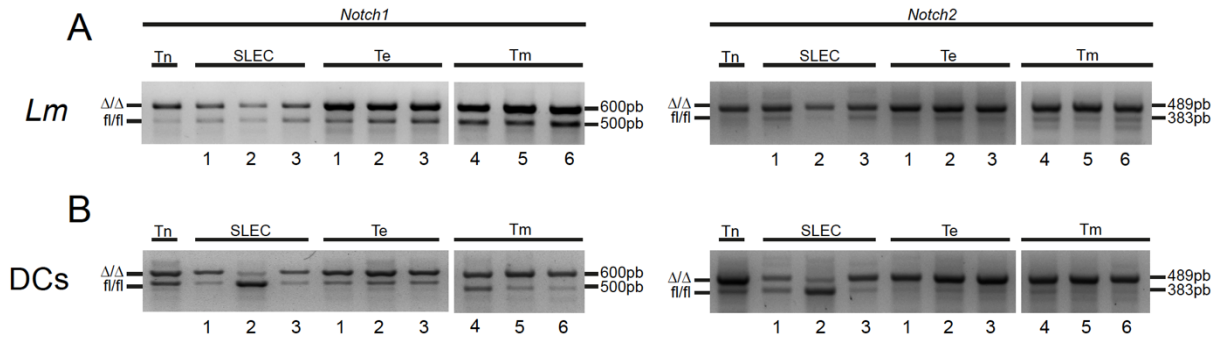


Figure S3. Measurement of the deletion of the floxed Notch alleles within CD8⁺ T cell populations. Genomic DNA was isolated from sorted naive (Tn; CD8⁺CD44⁻), SLECs (KLRG1^{hi} and CD127^{lo}), total effectors (CD8⁺CD44^{hi}Tet-OVA⁺) and memory CD8 T cells (CD8⁺CD44^{hi}Tet-OVA⁺) from Lm-OVA infected (A) or DC-OVA immunized (B) Notch-deficient mice. For Notch1, the deleted and floxed alleles respectively give rise to a PCR products of 500pb and 600pb. For Notch2, the deleted PCR product is 489pb while the floxed allele is 383pb. Δ/Δ; deleted alleles; fl/fl; floxed alleles. The number under the gels identify individual mouse that were used to sort the different T cell populations.

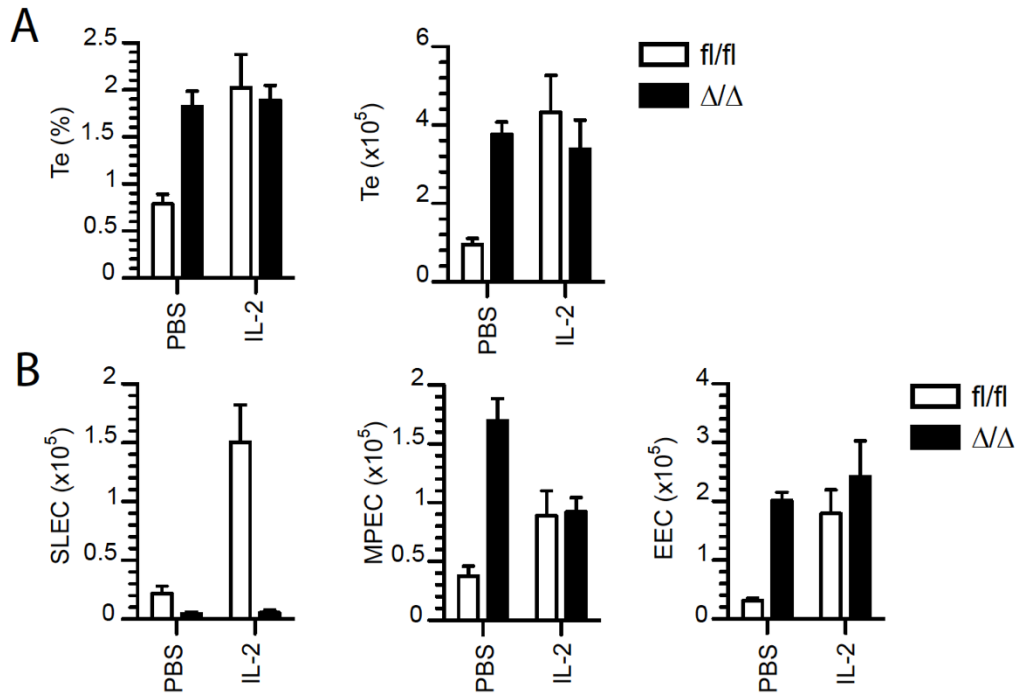


Figure S4. Increasing IL-2 bio-availability does not rescue SLEC generation in Notch-deficient mice. Mice were immunized with DC-OVA and were injected i.p. twice daily with PBS or rIL-2 (15,000 U per injection) until day 7, at which point mice were euthanized. (A) Effector response was assessed in the spleen 7 days post-vaccination. (B) Percentage of SLECs (KLRG1hi and CD127lo), MPECs (KLRG1lo and CD127hi) and EECs (KLRG1lo and CD127lo) within OVA-specific CD8+ T cells.

2. Études du rôle de la voie de signalisation Notch suite à une infection chronique

L'expression des ligands de la voie de signalisation Notch est induite par des signaux inflammatoires et par l'IL-2 tandis que la voie du RCT induit l'expression de Notch1 et Notch2^{473,526}. Or, lors d'une infection chronique, l'inflammation et la présence d'antigène sont persistantes, ce qui suggère que cette voie pourrait être activée de façon soutenue dans les LT CD8 répondant au pathogène⁵⁵⁸. De plus, il a déjà été démontré que la voie de signalisation Notch contrôle la différenciation des LT CD4 en contrôlant simultanément le programme transcriptionnel spécifique à chacun des sous types. De surcroît, nous avons découvert un rôle essentiel de la voie de signalisation dans la génération de LT CD8 différenciés de façon terminale (SLEC) suite à une infection aiguë (article 1)⁵⁵⁹. Enfin, notre étude ainsi que celles d'autres équipes ont démontré que cette voie de signalisation permet l'acquisition optimale des fonctions effectrices des cellules T CD8, en particulier lorsque la réponse s'effectue dans un milieu peu inflammatoire (article 1)^{473,509,515,526-528,531,534,536}. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que cette voie de signalisation qui contrôle la différenciation terminale des LT CD8 suite à une infection aiguë induit un programme transcriptionnel conduisant à un épuisement plus important des cellules T CD8 répondant à l'infection.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Souris et infection

Toutes les expériences ont été approuvées par le comité de protection des animaux du centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les souris B6.SJL et OT-1 déficientes pour Rag-1 ont été croisées à l'animalerie du centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les souris Notch1^{fl/fl} (B6.129 3 1-Notch1^{tm2Rko/GridJ})⁵⁶⁰, Notch2^{fl/fl} (B6.129SNotch2^{tm3Grid/J})⁵⁶¹ et E8I-Cre (C57BL/6-Tg(Cd8a-cre)1Itan/J) ont été achetées chez « The Jackson Laboratory » et rétrocroisées sur fond C57BL/6. Les souris Notch1, Notch2 et E8I-Cre ont été croisées entre elles pour obtenir des souris E8I-Cre^{+/-} Notch1^{fl/fl} Notch2^{fl/fl} (souris déficientes pour les récepteurs Notch1 et Notch2 uniquement dans les LT CD8 matures) ou des

souris Notch1^{fl/fl} Notch2^{fl/fl} (souris exprimant ces deux récepteurs à la surface des LT CD8 matures). Les souris ont été infectées de façon chronique avec le virus LCMVcl13. Elles ont reçu une dose de 2×10^6 particules virales par injection intraveineuse. Le poids de chacune des souris infectées, ainsi que leur état de santé, ont été évalué tout au long de l'infection pour s'assurer du bien-être des animaux.

2.2.2 Chimères hématopoïétiques

Les souris issues du croisement CD57BL/6 (CD45.2⁺) X B6.SJL (CD45.1⁺), CD45.1.2⁺ ont été irradiées à des doses létales (12Gy) et injectées le même jour avec un mix de moelle osseuse (50 :50; 5 millions de cellules totales) provenant de souris sauvage (B6.SJL, CD45.1⁺) et de souris E8I-Cre^{+/-} Notch1^{fl/fl} Notch2^{fl/fl}. Les souris ont été utilisées 8 semaines plus tard, le temps que le système hématopoïétique soit reconstitué.

2.2.3 Cytométrie

Les splénocytes ont été broyés mécaniquement à l'aide d'une lame de verre dépoli puis resuspendu à une concentration cellulaire de 30×10^6 cellules par ml dans du tampon de marquage. Le marquage tétramère (Tet-gp33) a été réalisé en premier, pendant 15 minutes à 37°C dans du tampon de marquage (DMEM sans rouge de phénol en poudre ; sérum de cheval 3% ; Hepes 30mM ; azide de sodum 1%), à l'abri de la lumière. Les monomères nous ont été fournis par le laboratoire d'Alain Lamarre que nous avons tétramérisé. Pour ce faire, pour chaque 250µg de monomères, nous avons ajouté 5 µL de la streptavidine couplée au fluorochrome phycoérythrine (Pe) au 5 minutes pour un total de 80µL sous agitation faible. Les tétramères ont été gardés toute la nuit sous agitation à 4°C et à l'abri de la lumière. Le lendemain matin, le tétramère est filtré à l'aide d'une colonne amicon® Ultra 0.5ml (UFC510024). Tous les autres marquages de surface ont été réalisés sur glace durant 15 minutes à l'obscurité. Les marquages intracellulaires ont été réalisés comme décrit dans le protocole de la trousse de marquage des facteurs de transcription de ebioscience™. Les anticorps suivants ont été utilisés : de la compagnie Biolegend™ : « Brillant violet » (BV510) anti-CD8α (53-6,7 ; 100752),

Allophycocyanine/Cy7 (APC/Cy7) anti-CD44 (IM7 ; 103028) ; « brillant violet » (BV421) anti-PD-1 (29F.1A12 ; 135221) ; phycoérythrine/Cy7 (PeCy7) anti-CD160 (7H1 ; 143010) ; Allophycocyanine (APC) anti-Tim-3 (RMT3-23 ; 119706) ; phycoérythrine (Pe) anti-IL-2 (JES6-5H4 ; 503808) ; « Pacific Blue » (PB) anti-Granzyme B (GB11 ; 515408). De la compagnie eBioscience™ : phycoérythrine (Pe) anti-Lag-3 (C9B7W ; 12-2231-81) ; Fluorescéine isothiocyanate (FITC) anti-2B4 (244F4 ; 11-2441) ; phycoérythrine/Cy7 (PeCy7) anti-T-bet (eBio4B10 ; 25-5825-82) ; « eFluor 660 » (EF660) anti-EOMES (Dan11mag ; 50-4875-82) ; Allophycocyanine (APC) anti-TNF- α (MP6-XT22 ; 17-7321-82). De la compagnie « Cell Signaling Technology », nous avons utilisé l'anticorps Alexa Fluor 488 (AF488) anti-TCF-1 (C63D9 ; 6444S). Enfin, nous avons utilisé l'anticorps Fluorescéine isothiocyanate (FITC) anti-IFN- γ (XMG1.2 ; RM9001) provenant de la compagnie « life technologies™ ».

2.2.4 Injection des anticorps bloquants

Pour revigorer la réponse des LT CD8, les souris ont reçu une dose de 200 μ g d'anticorps rat anti-souris PD-L1 ou 200 μ g d'anticorps témoin IgG2b (10F.5C5 ou 10F.9G2)⁵⁶² aux deux jours entre 23 et 35 jours post-infection par voie intrapéritonéale⁵⁶³. Le blocage des ligands de la voie de signalisation Notch s'est fait par l'injection intrapéritonéale d'une dose de 5mg/kg d'anti-DLL1 et d'anti-DLL4 aux temps indiqués. Les anti-DLL1 et anti-DLL4 nous ont été fournis grâce à une collaboration avec I Maillard (Université du Michigan) et avec C Siebel (Genentech)^{532,564-566}.

2.2.5 Restimulation des cellules de rate in vitro

Les cellules de la rate fraîchement isolées ont été resuspendues à une concentration de 15 millions de cellules par ml dans du RPMI complet (Fisher) et mis en culture avec 0,5 μ g/ml (final) de peptide GP33 (KAVYNFATC) (« New England Peptide », NEP) et 20 μ g/ml (final) de Brefeldine A (sigma) pendant 5 heures à 37°C et 5% CO₂. Les cellules ont ensuite été fixées avec de la paraformaldehyde 2% (sigma) finale.

2.2.6 Quantification de la charge virale

Des cellules MC57G (ATCC) à une concentration de 8×10^5 cellules/ml ont été cultivées à 37°C et 5% de CO₂ pendant 4 heures en présence de lysat cellulaire (volume d'infection de 60 µL) provenant des organes des souris infectées en plaque P24 adhérente à la suite de quoi nous avons ajouté 300 µl d'une solution d'« overlay » (MEM 1x ; méthylcellulose 2% ; sérum de veau fœtal 5% ; pénicilline et streptomycine à 100 µg/ml ; L-glutamine 50 µg/ml ; bicarbonate de sodium 1%). Deux jours plus tard, les cellules ont été lavées 2 fois avec du HBSS transparent avec calcium et magnésium et ont été fixées avec de la paraformaldehyde 4% pendant 30 minutes. Tous les lavages s'effectuent entre chaque étape avec du PBS 1x. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec du tritonX-100 0,5% dilué dans du HBSS rouge sans calcium ni magnésium. Les sites de liaison non spécifique ont été bloqués avec du sérum de cheval 10% dilué dans du PBS 1x. Les cellules sont ensuite recouvertes de 250 µL de surnageant cellulaire contenant de l'anti-VL4 pendant 90 minutes à la suite de quoi nous avons fait un marquage avec un anticorps de chèvre anti-rat couplé à la peroxydase dilué 1 :400 dans du HBSS rouge sans calcium ni magnésium pendant 60 minutes. Les cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps de singe anti-chèvre couplé à la peroxydase diluée 1 :750 dans du HBSS rouge sans calcium ni magnésium pendant 60 minutes. Enfin, nous avons incubé les cellules avec la solution « substrat » fraîchement préparée (Na₂HPO₄ à 0,05 molaire finale ; C₆H₅O₇ à 0,025 molaire finale ; ortho-phénylène diamine (OPD) à 0,4mg/ml ; H₂O₂ à 1,2% final) pendant 20 minutes, temps durant lequel l'OPD est oxydé. La charge virale par gramme d'organe et par µL de sang a été calculée comme suit :

(Nombre plage x volume dans lequel l'organe a été homogénéisé (ml)) = titre par g d'organe
(Dilution dans la plaque x volume d'infection (ml) x poids organe (g))

Nombre de plage = titre/µL de sang
(Dilution dans la plaque x volume d'infection (en µL))

2.2.7 Statistiques

Les données ont été analysées avec le logiciel GraphPad™ prism version 6 par des tests de « student » non-apparié avec un intervalle de confiance de 95%.

2.3 L'absence des récepteurs Notch1/2 corrèle avec une expansion clonale plus importante des LT CD8 lors d'une infection chronique

Il a déjà été démontré, par notre laboratoire et par d'autres, que l'expression des récepteurs Notch1 et Notch2 était fortement augmentée suite à une stimulation antigénique des LT CD8 tandis que les récepteurs Notch3 et Notch4 ne sont pas exprimés^{526,527,529,530,532}. Ainsi, la délétion génétique des récepteurs Notch1 et Notch2 est suffisante pour abolir l'activation de la voie de signalisation Notch au sein des LT CD8. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris dont l'exon 1 de Notch1 et l'exon 3 de Notch2 ont été flanqués par des séquences loxP reconnues par la recombinaison Cre, dont l'expression est contrôlée par le fragment E8I du promoteur de CD8. Or, ce fragment de promoteur est activé uniquement dans les LT CD8 suite à leur sortie du thymus, ce qui induit la délétion de ces récepteurs uniquement dans les LT CD8 matures naïfs⁵²⁶. Les souris sauvages (Notch^{1^{fl/fl}} Notch^{2^{fl/fl}}) sont identifiées fl/fl dans ce chapitre tandis que les souris dont les LT CD8 sont déficients pour Notch1 et Notch2 (E8I-Cre^{+/-} Notch1^{fl/fl} Notch2^{fl/fl}) sont identifiées Δ/Δ . Nous avons déjà démontré que l'efficacité de délétion est d'environ 90% dans les LT CD8 naïfs, effecteurs et mémoires sans que cela n'affecte les proportions des populations de LT CD8 périphériques ni leurs phénotypes (LTn, LTe, LTm)⁵⁶⁷.

Dans le but d'analyser le rôle de cette voie de signalisation dans la différenciation des LT CD8 épuisés, nous avons infecté ces souris avec la souche chronique du virus LCMV (LCMVcl13). Nous avons ensuite suivi, au cours du temps, la réponse lymphocytaire spécifique pour l'antigène de la glycoprotéine GP33 (KAVYNFATC) à l'aide d'un tétramère (Tet-GP33). Ainsi, nous avons analysé les proportions et les nombres des cellules CD8⁺CD44⁺Tet-GP33⁺ ainsi que la cellularité de la rate à différents stades de l'infection chronique. 8 Jours post-infection, un stade où la chronicité de l'infection n'est pas encore établie, la proportion et les nombres de LT CD8 spécifiques de l'antigène GP33 sont plus importants en l'absence de Notch tandis que la cellularité de la rate est similaire (Figure 13A). En revanche, plus tard dans la réponse, les pourcentages de réponses sont similaires tandis que les nombres de LT CD8 déficients restent plus élevés par rapport aux LT CD8 sauvages (Figure 13B, C). En accord avec

cela, la cellularité des rates est plus importante aux jours 15 et 30 post-infection dans les souris Δ/Δ .

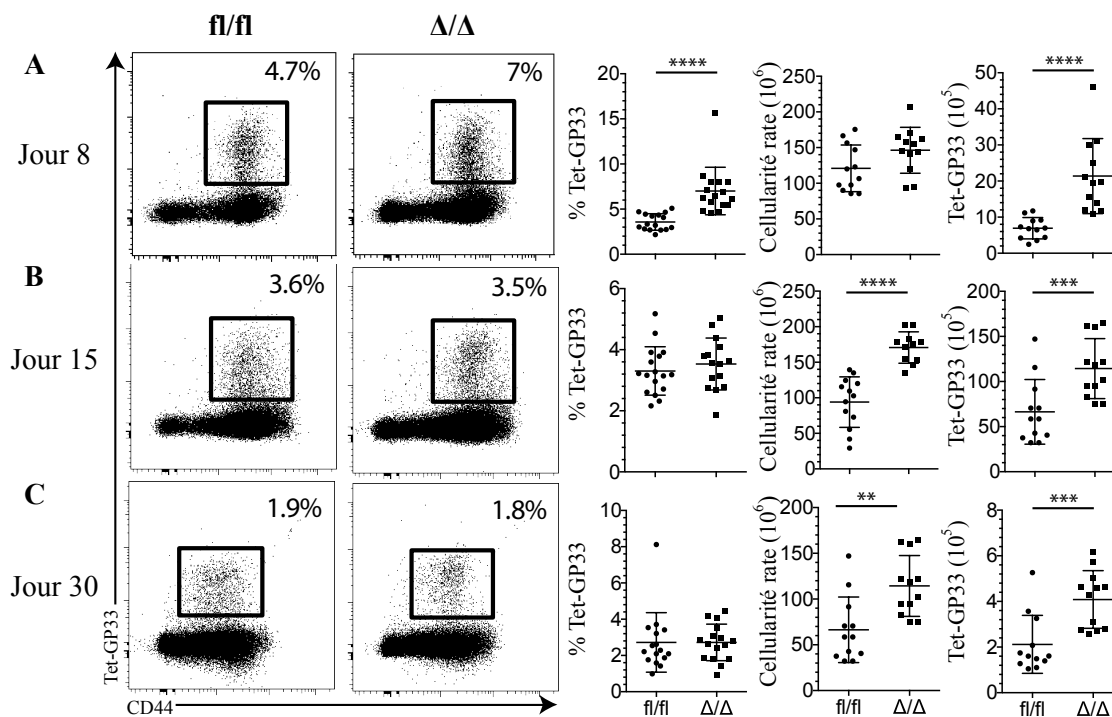


Figure 13. L'absence de Notch corrèle avec une plus forte expansion clonale des LT CD8 lors d'une infection chronique. Les souris ont été infectées avec 2×10^6 UFP du virus LCMVcl13 par voie intraveineuse. La réponse lymphocytaire CD8 spécifique pour l'antigène GP33 a été suivie au cours du temps à l'aide d'un tétramère de molécules du CMHI couplées au peptide GP33 aux jours 8 (A), 15 (B) et 30 (C) post-infection dans la rate des souris *fl/fl* ou Δ/Δ . Les profils de cytométrie ainsi qu'une compilation des pourcentages de réponse, des nombres de LT CD8 spécifiques pour l'antigène GP33 ($CD8^+CD44^+Tet-gp33^+$) ainsi que la compilation de la cellularité de la rate sont représentés. L'expérience a été répétée 4 fois avec 4 souris par groupe.

2.4 Les LT CD8 déficients pour les récepteurs Notch1 et Notch2 expriment plus fortement les récepteurs inhibiteurs PD-1 et Lag-3

Dans le but d'évaluer le rôle de la voie de signalisation Notch dans l'épuisement des LT CD8 suite à une infection chronique, nous avons commencé par analyser les profils

d'expression de plusieurs récepteurs inhibiteurs à la surface des LT CD8 Tet-GP33⁺ pendant la phase chronique de l'infection (Figure 14A, B). Les LT CD8^{ΔΔ} expriment plus fortement PD-1 à jour 15 post-infection, un moment où les premiers signes d'épuisement commencent à apparaître, comparé aux LT CD8 fl/fl (Figure 14A). Ces derniers semblent aussi exprimer plus fortement le RI Lag-3 bien que cela ne soit pas statistiquement significatif. Nous obtenons le même résultat 30 jours après l'infection à l'exception que les différences observées à jour 15 sont encore plus prononcées (Figure 14B). Enfin, les LT CD8^{ΔΔ} spécifiques de l'antigène GP33 co-expriment plus de récepteurs inhibiteurs différents à leurs surfaces en comparaison aux LT fl/fl (Figure 14C). Plus précisément, une plus grande proportion de cellules T CD8^{ΔΔ} co-expriment 5, 4 ou 3 RI à leur surface tandis que les cellules T CD8 sauvages en expriment majoritairement un ou deux (Figure 14C). Ces résultats suggèrent que l'absence de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 induit un état d'épuisement plus sévère des LT CD8 suite à une infection chronique, ce qui est surprenant puisqu'elle est requise pour favoriser la différenciation terminale des LT CD8 suite à une infection aiguë.

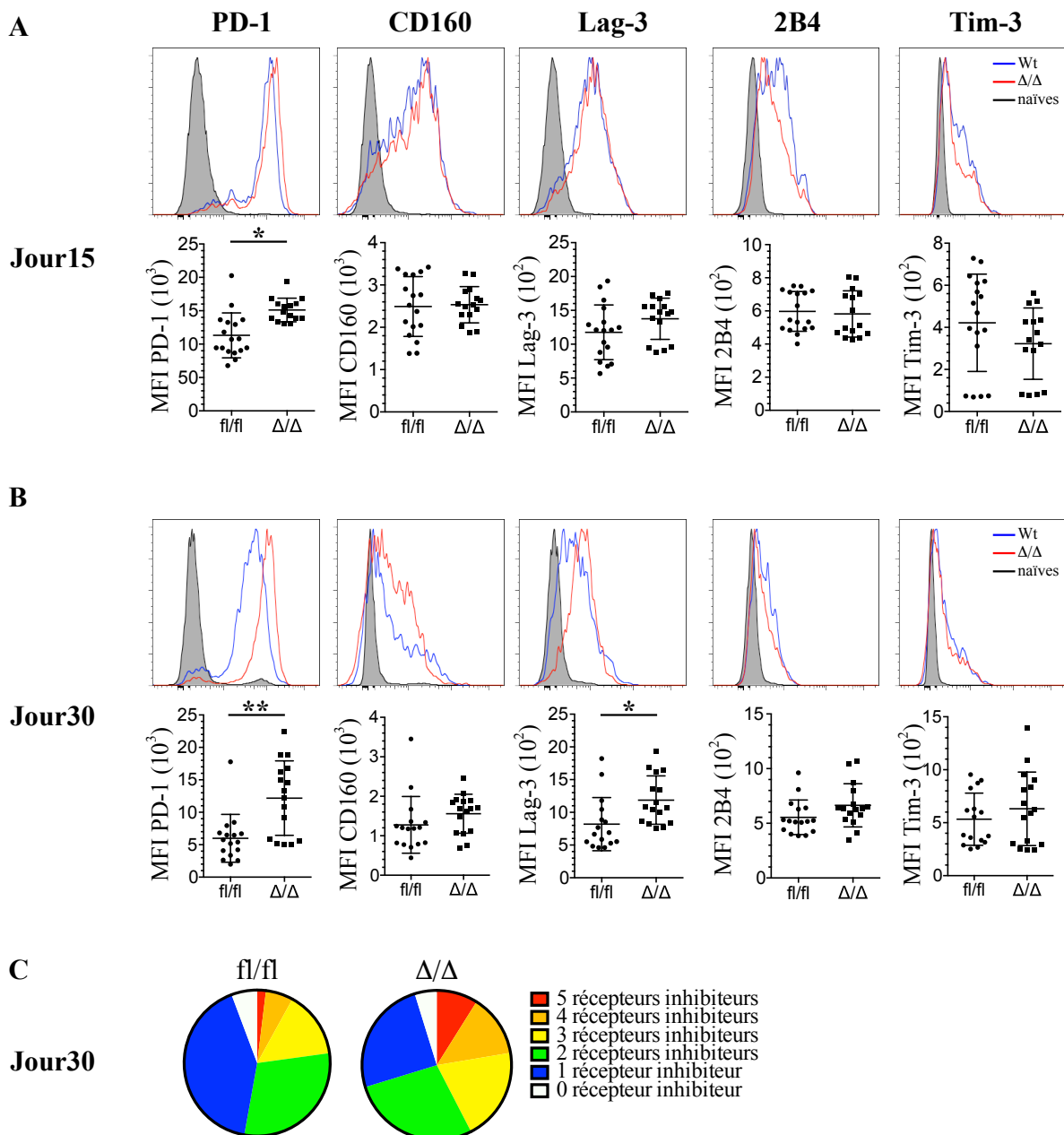


Figure 14. Les LT CD8 déficients pour les récepteurs Notch1 et Notch2 expriment plus fortement les RI PD-1 et Lag-3. Les souris ont été infectées telles que décrit précédemment. Les niveaux d'expression des marqueurs d'épuisement ont été évalués par cytométrie en flux sur les cellules CD8⁺CD44⁺Tet-GP33⁺ 15 jours (A) ou 30 jours (B) post-infection. Les profils de cytométrie sont représentés ainsi que les compilations de l'intensité moyenne de fluorescence de chacun des récepteurs inhibiteurs marqués. C) Représentation graphique des proportions de LT CD8 spécifique pour l'antigène GP-33 exprimant 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 récepteur inhibiteur à leur surface 30 jours post-infection. L'expérience a été réalisée 4 fois avec 4 souris par groupe.

2.5 Les LT CD8 déficients pour la voie de signalisation Notch sont fonctionnellement plus épuisés

L'inhibition de la voie de signalisation Notch dans des LT CD8 en cours d'activation conduit généralement à une diminution de la production de cytokines qui corrèle parfois avec une diminution de la lyse des cellules cibles^{526,527,534}. De plus, les résultats précédents suggèrent que l'absence de la voie de signalisation Notch induit un épuisement plus sévère des LT CD8 aux stades chroniques précoces et tardifs (jour 15 et jour 30 post-infection). C'est pourquoi nous avons analysé dans un premier temps la capacité des LT CD8 fl/fl ou Δ/Δ à produire des cytokines en réponse à une courte stimulation antigénique *in vitro*. 8 jours post-infection, les proportions de LT CD8 produisant de l'IFN- γ et du TNF- α sont similaires entre les LT CD8 fl/fl et Δ/Δ (Figure 15A). Cependant, il semblerait qu'un pourcentage plus faible de LT CD8 Δ/Δ expriment GrzmB bien que cela ne soit pas statistiquement significatif. En revanche, 15 et 30 jours post-infection, les proportions de LT CD8 déficients capables de produire de l'IFN- γ , du TNF- α et de la GrzmB sont plus faibles bien que ces résultats ne soient pas significatifs par rapport aux LT CD8 sauvages à jour 30 post-infection (Figure 15B, C).

En plus de leur capacité à produire des cytokines, nous avons aussi analysé les conséquences de l'absence de la voie Notch dans les LT CD8 sur la charge virale dans différents organes des souris infectées. En accord avec une expression similaire d'IFN- γ et de TNF- α entre les LT CD8 fl/fl ou Δ/Δ , nous n'observons pas de différence au niveau de la charge virale dans la rate et le cerveau dans le stade aigu et au stade précoce de l'épuisement (jour 8 et jour 15 post-infection) (Figure 15D). Alors que la charge virale diminue dans les souris fl/fl au cours du temps, la virémie reste stable et élevée dans la rate et le cerveau des souris Δ/Δ à partir de jour 15 post-infection. Ces résultats révèlent qu'en l'absence de la voie de signalisation Notch, les LT CD8 sont capables de contrôler la charge virale durant la phase aiguë (jour 8) et lors de l'établissement de l'état d'épuisement (jour 15), mais qu'ils perdent leur fonctionnalité dans les stades chroniques avancés (jour 30).

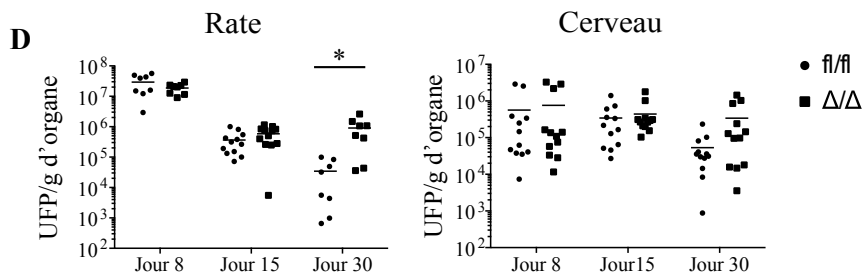
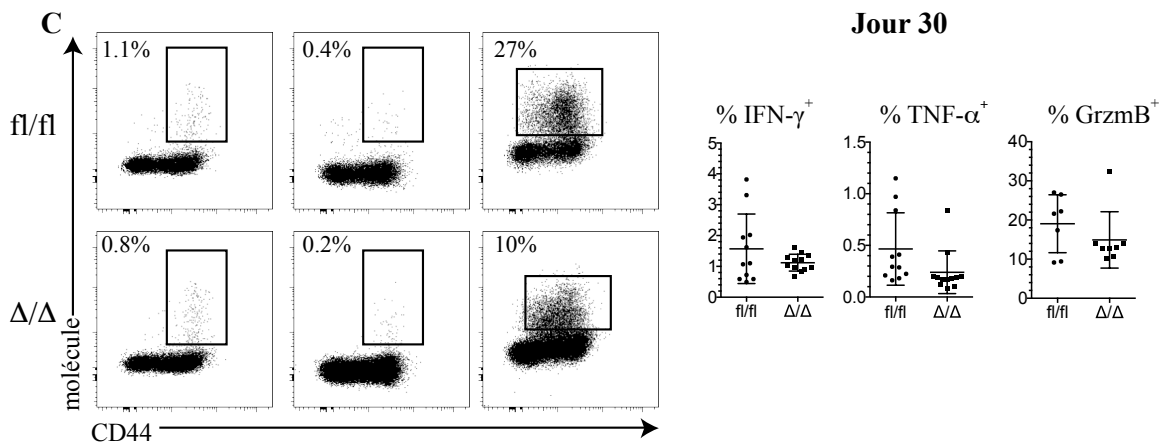
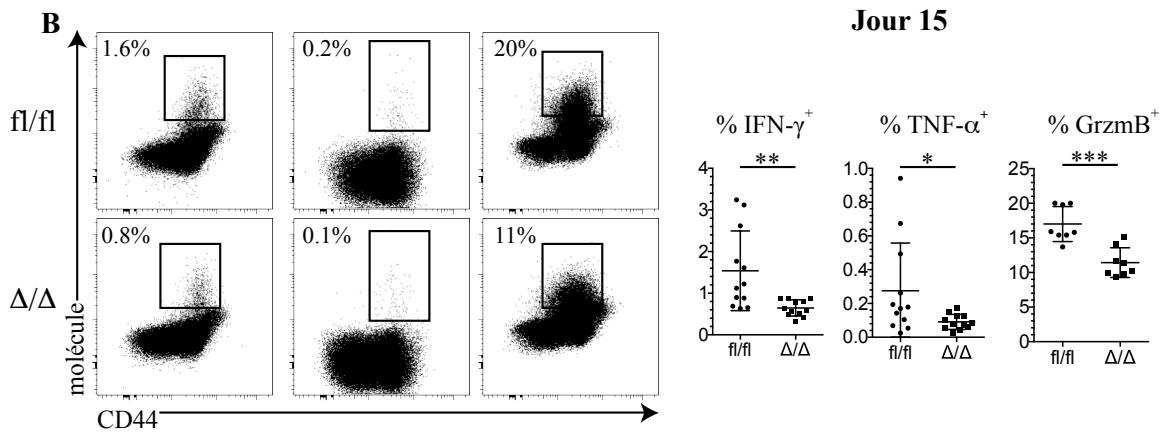
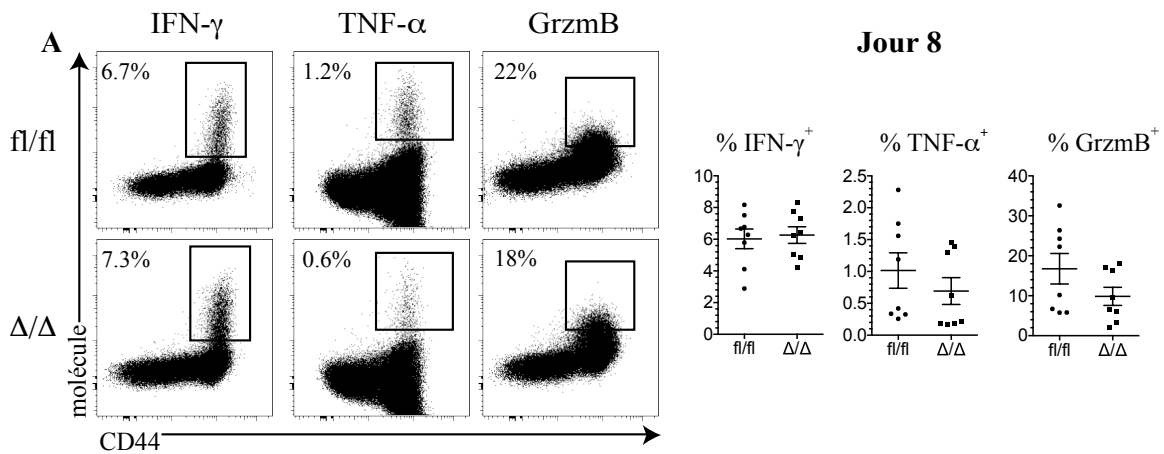


Figure 15. L'absence de la voie de signalisation Notch induit un épuisement fonctionnel plus sévère des LT CD8. Les cellules de la rate, issues de souris ayant été infectées 8 jours (A), 15 (B) ou 30 jours (C) auparavant, ont été restimulées *in vitro* avec le peptide GP33 pendant 5 heures en présence de la Brefaldine A. La production de cytokines a ensuite été évaluée sur la population CD8 α^+ CD44 $^+$. Les profils de cytométrie ainsi qu'une compilation de la fréquence des cellules produisant de l'IFN- γ , du TNF- α ou de la GzmB sont présentés. D) Détection immunologique du virus rapporté par gramme d'organe (rate ou cerveau) de souris sauvages ou déficientes pour Notch à jour 8, 15 ou 30 post-infection.

2.6 La voie de signalisation Notch est continuellement requise dans les LT CD8 suite à une infection chronique

Il a été démontré que la voie de signalisation Notch agissait uniquement à des temps très précoces (entre jour 0 et Jour 3) de la réponse des cellules T afin d'induire ses effets délétères lors de la réaction du greffon contre l'hôte ou lors d'une infection aiguë (résultat non publié)⁵⁶⁸. Or, étant donné qu'une stimulation du RCT induit l'expression des récepteurs Notch1 et Notch2 et que les ligands de la voie Notch sont induits par des signaux inflammatoires à la surface des CPA et des cellules stromales de la rate, cela suggère que la voie de signalisation Notch pourrait être induite continuellement dans les LT CD8 lors d'une infection chronique^{272,473,557}. C'est pourquoi nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la voie de signalisation Notch est requise tout au long de l'infection ou si elle est plutôt requise uniquement lors de l'activation des LT CD8 pour lutter contre l'épuisement de ces derniers. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé deux régimes différents de traitements avec des anticorps humanisés bloquant les ligands de la voie Notch, DLL1 et DLL4. Ces deux ligands sont les seuls à être responsable de l'activation de la voie de signalisation Notch dans les LT CD4 et CD8 suite à une réaction du greffon contre l'hôte et lors d'une infection aiguë (résultat non publié)^{532,533}. Ainsi, des souris sauvages infectées avec le virus LCMVcl13 ont été traitées avec les anticorps bloquants ou avec un anticorps contrôle de même isotype, une heure avant l'infection, 3 et 6 jours post-infection et sacrifiées à jour 9 (traitement précoce) (Figure 16A et B). Dans un second régime, les souris ont été traitées aux jours 21, 24 et 27 post-infection et sacrifiées 3 jours plus tard (traitement

tardif) (Figure 16C et D). Dans les deux régimes, l'expression de PD-1 augmente sensiblement après le traitement tandis que l'expression de Lag-3 n'est augmentée que suite à un traitement tardif. Ces résultats suggèrent que les deux ligands, DLL1 et DLL4, sont responsables de l'activation de la voie de signalisation Notch au sein les LT CD8 répondants à l'infection, ce qui contrôle l'épuisement de ces derniers. De plus, cette voie semble être activée tout au long de la réponse lymphocytaire pour prévenir un état d'épuisement trop important. Cependant, cette expérience ayant été faite qu'une seule fois, il est nécessaire de la répéter afin de pouvoir conclure sur ce résultat.

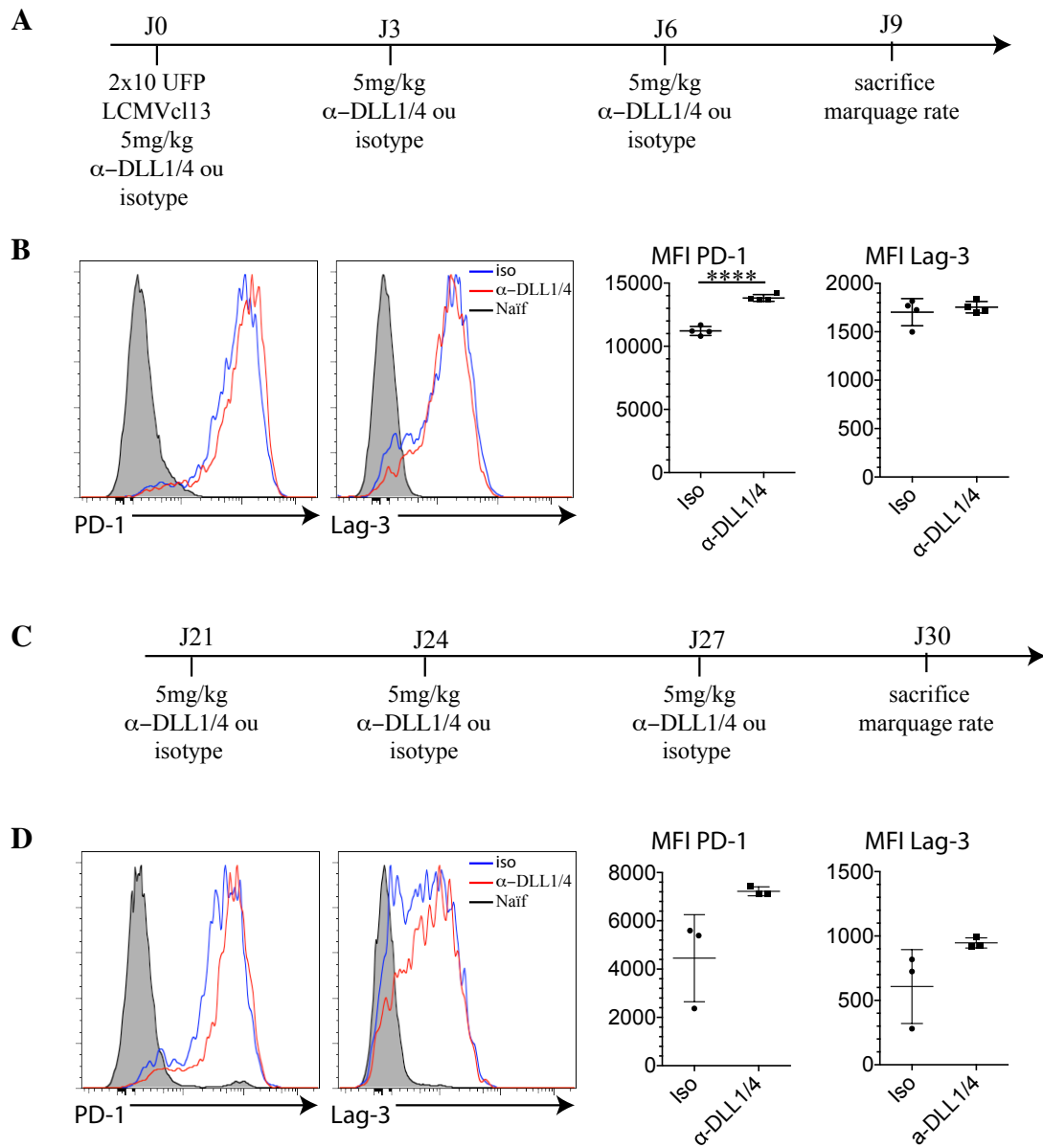


Figure 16. La voie de signalisation Notch est continuellement requise dans les LT CD8 répondant à une infection chronique. A) Schéma expérimental. Des souris sauvages ont été infectées comme précédemment décrit. Ces dernières ont été traitées avec des anticorps bloquant les ligands DLL1 et DLL4 de la voie de signalisation Notch une heure avant l'infection puis aux jours 3 et 6 post-infection et ont été sacrifiées 3 jours plus tard. B) Les niveaux d'expression de PD-1 et Lag-3 ont été analysés par cytométrie en flux sur les cellules CD8⁺CD44⁺Tet-GP33⁺. C) Schéma expérimental. Dans ce deuxième traitement, les souris ont été traitées aux jours 21, 24 et 27 post-infection et ont été

sacrifiées 3 jours plus tard. D) Analyse des niveaux d'expression des récepteurs inhibiteurs PD-1 et Lag-3 sur les cellules CD8⁺CD44⁺Tet-GP33⁺.

2.7 La voie de signalisation Notch contrôle la différenciation des LT CD8 épuisés

Nous avons déjà démontré que la voie de signalisation Notch contrôle la différenciation des LTe suite à une infection aiguë. De plus, tous les résultats suggèrent que la voie de signalisation agit en luttant contre l'épuisement des LT CD8. Or, il existe deux sous-populations de LT CD8 épuisés : les progéniteurs qui ont gardé la capacité de proliférer ainsi qu'une partie de leur fonctionnalité et les cellules T CD8 épuisées de façon terminale^{283,356}. Ainsi, il est possible que la voie Notch contrôle ces événements de différenciation. De plus, l'une des caractéristiques des cellules différenciées de façon terminale est d'exprimer plus fortement les RI et de les exprimer en plus grand nombre à leur surface, ce qui est le cas des LT CD8 déficients pour la voie Notch. Enfin, la voie Notch est connue pour contrôler l'expression de T-bet, EOMES et PD-1, les trois molécules définissant les sous-populations de LT CD8 épuisés^{272,515,526,531,567,569}. En effet, les progéniteurs expriment fortement T-bet et de façon intermédiaire PD-1 tandis que les cellules épuisées de façon terminale expriment fortement EOMES et PD-1. Pour évaluer le rôle de cette voie dans la différenciation des LT épuisés, nous avons réalisé un marquage de ces 3 molécules sur les LT CD8 spécifiques de l'antigène GP33 à jour 15 et 30 post-infection (Figure 17A, B). L'absence de la voie de signalisation Notch favorise une différenciation terminale des LT CD8 (EOMES^{fort}PD-1^{fort}) au détriment de la sous-population des progéniteurs (T-bet^{fort}PD-1^{int}) et ce, 15 et 30 jours post-infection. Toutefois les différences observées sont plus marquées lorsque l'épuisement est avancé à jour 30 post-infection (Figure 17B).

Des études plus récentes ont mis en évidence une autre sous-population de LT CD8 épuisés appelée LT CD8 folliculaires^{249,359-362}. Ils expriment le marqueur des LT CD4 folliculaires CXCR5 et se trouvent au sein des follicules B et dans la zone des LT des ganglions de patients atteints du VIH ou dans les ganglions de souris infectées avec le virus LCMVcl13

^{249,359,360}. Cette sous-population est caractérisée par le fait qu'elle retienne la capacité de proliférer et que, ce faisant, elle peut se différencier en LT CD8 non-folliculaires différenciés de façon terminale. De plus, suite à une immunothérapie bloquant la voie PD-1, cette sous-population est la seule à pouvoir améliorer sa capacité de prolifération ainsi que ces fonctions effectrices. Elle est distincte des progéniteurs définis par l'équipe de Wherry puisqu'il existe en son sein des cellules exprimant fortement EOMES tandis que d'autres expriment fortement Tbet²⁴⁹. En revanche, les LT CD8 folliculaires expriment tous TCF-1, un facteur de transcription essentiel à leur génération et qui régule négativement l'épuisement des LT CD8^{249,360,362,570}. Étant donné que Notch contrôle directement l'expression de TCF-1 dans les thymocytes et qu'en l'absence de Notch les LT CD8 sont plus épuisés, nous avons émis l'hypothèse que les LT CD8 déficients pour les récepteurs Notch1 et Notch2 sont incapables de se différencier en LT folliculaires⁵⁴⁸. Cependant, la proportion de LT CD8 Δ/Δ exprimant TCF-1 est plus importante en absence de la voie de signalisation Notch et ce, à tous les stades de l'infection (Figure 17C). Ce résultat suggère que la voie de signalisation Notch ne contrôle pas l'expression de TCF-1 dans les LT CD8 épuisés. Le mécanisme moléculaire expliquant comment l'absence de la voie de signalisation Notch conduit à une plus forte génération de LT CD8 folliculaires n'est pas encore compris.

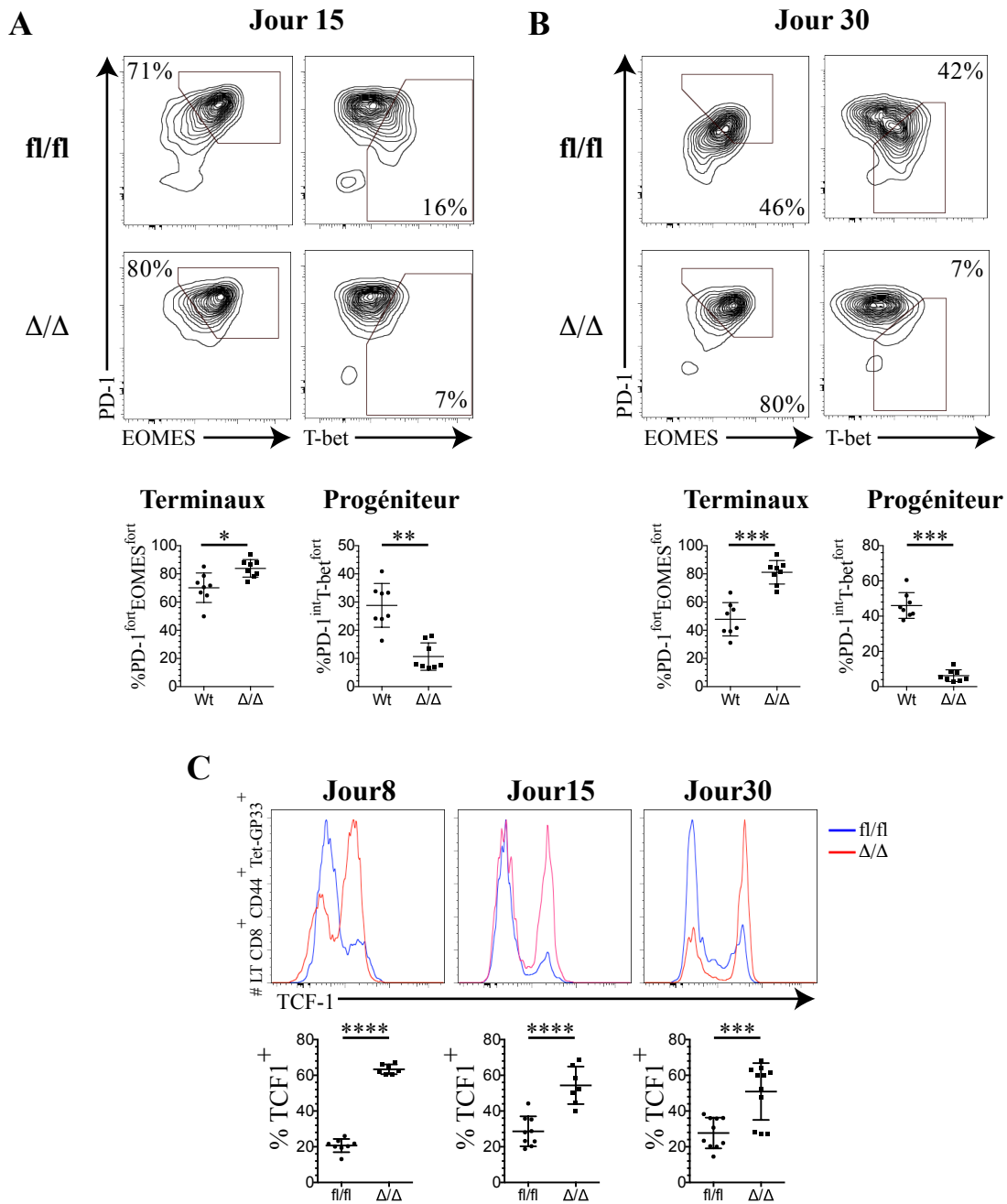


Figure 17. La voie de signalisation Notch contrôle la différenciation des LT CD8 épuisés suite à une infection chronique. Profil de cytométrie représentant les proportions de progéniteurs ($T\text{-bet}^{\text{fort}}PD\text{-1}^{\text{int}}$) et de LT CD8 différenciés de façon terminale ($EOMES^{\text{fort}}PD\text{-1}^{\text{fort}}$) générée à 15 (A) ou 30 (B) jours post-infection dans des souris fl/fl ou Δ/Δ . Des compilations des proportions de ces sous-populations sont aussi représentées. C) Profil de cytométrie représentant l'expression du facteur de transcription TCF-1 aux jours 8, 15 et 30 post-infection et compilation du pourcentage de cellules TCF-1⁺ au sein de la population CD8⁺CD44⁺Tet-GP33⁺.

2.8 Le rôle de la voie de signalisation Notch est intrinsèque aux lymphocytes T CD8

La charge virale étant plus importante dans les souris Δ/Δ entre le jour 15 et le jour 30, cela pourrait influencer l'inflammation dans l'environnement de ces derniers et, par conséquent, pourrait être à l'origine de l'épuisement plus sévère observé. Pour évaluer le rôle intrinsèque de la voie Notch dans les LT CD8, nous avons réalisé une expérience de chimère hématopoïétique mixte. Ainsi, des souris sauvages (CD45.1.2) irradiées à des doses létales ont été injectées avec un mélange (50 :50) de moelle osseuse provenant de souris sauvages (B6.SJL, CD45.1) ou de souris dont les LT CD8 sont déficients pour les récepteurs Notch1 et Notch2 (C57BL/6, CD45.2). Une fois le système hématopoïétique de ces souris reconstitué, elles ont été infectées par le virus LCMVcl13 et nous avons analysé l'épuisement des LT CD8 30 jours plus tard. Outre le fait que ces cellules partagent le même environnement, les LT CD8 Δ/Δ expriment plus fortement le RI PD-1 tandis qu'ils expriment des niveaux similaires de Lag-3 par rapport aux lymphocytes T fl/fl (Figure 18A). De plus, l'absence de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 favorise leur différenciation en cellules T différenciées de façon terminale au détriment des progéniteurs (Figure 18B). Enfin, la déficience de la voie Notch dans les cellules T CD8 conduit à une plus faible production d'IFN- γ chez les LT Δ/Δ (Figure 18C). Ces résultats confirment donc le rôle intrinsèque de la voie Notch dans l'épuisement des LT CD8 suite à une infection chronique.

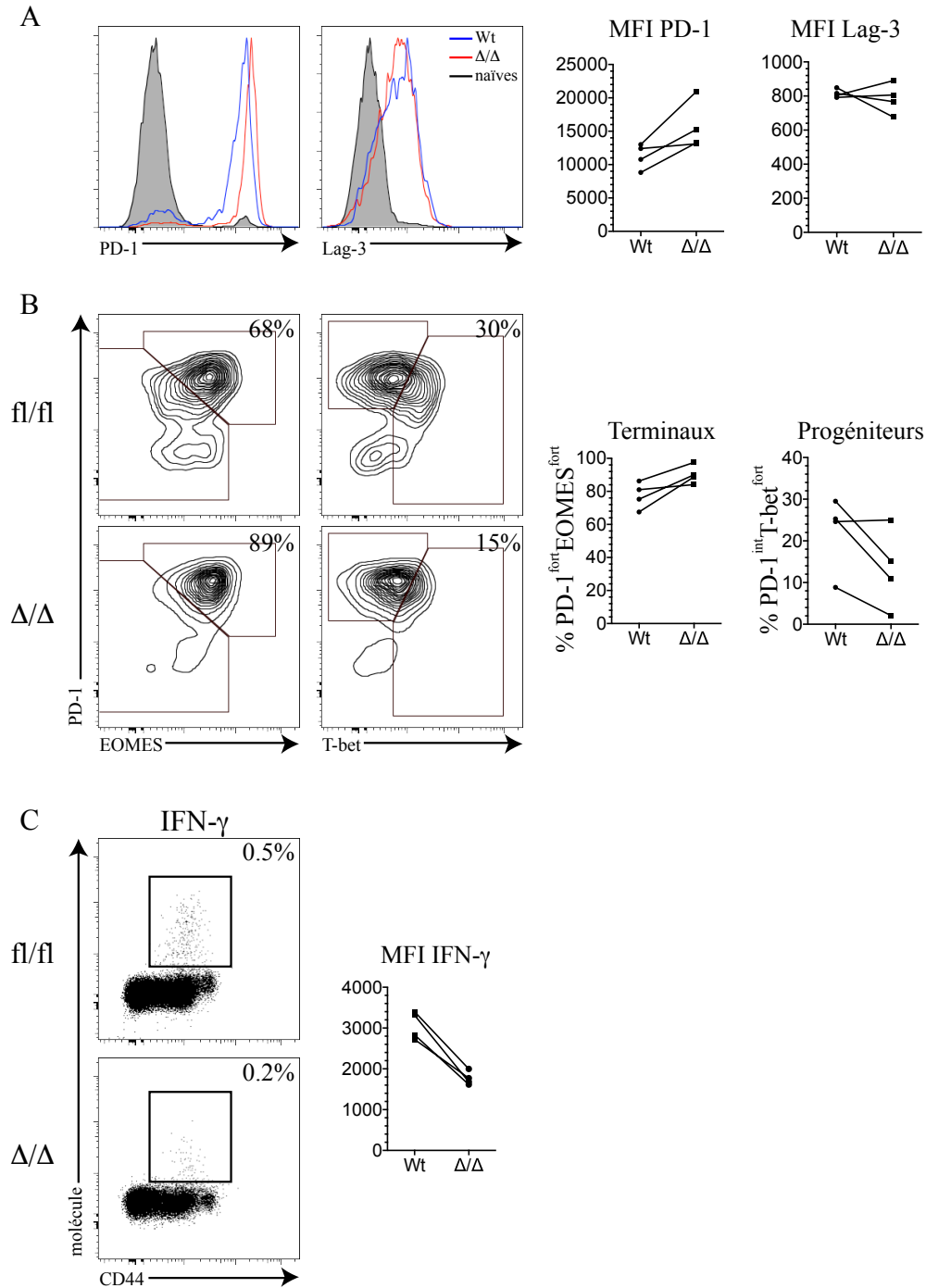


Figure 18. La voie de signalisation Notch affecte l'épuisement des LT CD8 de façon intrinsèque aux LT CD8. A) Des souris CD45.1.2⁺ ayant été irradiées à des doses létales ont été injectées le même jour avec un mélange (50 :50) de moelle osseuse provenant de souris sauvages (CD45.1⁺) ou de souris E8I-Cre^{+/-} Notch1^{fl/fl} Notch2^{fl/fl} (CD45.2⁺). 8 semaines plus tard, ces souris ont été infectées avec 2x10⁶ UFP du virus LCMVcl13 par voie intraveineuse et ont été euthanasiées 30 jours post-infection. A) Profil de cytométrie représentant les niveaux d'expression des récepteurs inhibiteurs PD-1 et Lag-3 sur les

cellules CD8⁺CD44⁺Tet-GP33⁺ CD45.1⁺ (LT sauvages) ou CD45.2⁺ (LT Δ/Δ) et compilation des intensités moyenne de fluorescence. Le trait reliant les LT CD8 sauvages des LT CD8 Δ/Δ représente les échantillons appariés puisqu'ils proviennent de la même souris. B) Profil de cytométrie représentant les proportions de progéniteurs et des LT CD8 différenciés de façon terminale et compilation des proportions de ces sous-populations au sein des LT CD8 Tet-GP33⁺. C) Analyse de la capacité des LT CD8 sauvages ou déficients à produire des cytokines suite à une courte restimulation *in vitro*.

2.9 La délétion génétique des récepteurs Notch1 et Notch2 ne permet pas de restaurer la fonctionnalité des LT CD8 suite à un traitement bloquant la voie PD-1, mais l'activation de la voie Notch n'est pas requise simultanément au traitement

Il a déjà été démontré que, suite à un traitement bloquant le ligand PD-L1 de la voie PD-1, seuls les progéniteurs définis par l'équipe de Wherry (T-bet^{fort}PD-1^{int}) sont capables de proliférer et de regagner leur fonctionnalité²⁸³. Cependant, d'autres équipes ont démontré plus récemment que seuls les LT CD8 folliculaires étaient capables de proliférer et de voir leur fonctionnalité restaurée suite à une immunothérapie bloquant la voie PD-1^{249,359,362}. Or, en absence de Notch la différenciation terminale des LT CD8 (EOMES^{fort}PD-1^{fort}) est favorisée de même que la génération de LT CD8 folliculaires. C'est pourquoi nous avons voulu savoir s'il était possible de restaurer la fonctionnalité des LT CD8 déficients pour les récepteurs Notch. Pour ce faire, nous avons traité des souris sauvages ou des souris dont les LT CD8 sont déficients pour les récepteurs Notch1 et Notch2 à l'aide d'anticorps bloquant le ligand PD-L1 aux deux jours entre le jour 23 et le 35 post-infection. La charge virale a été analysée 2 jours plus tard (jour 37 post-infection) dans le sang et le foie (Figure 19A). Suite au traitement, la charge virale devient indétectable dans la rate et le sang des souris sauvages tandis qu'elle reste forte dans les organes de souris Δ/Δ (Figure 19A).

Le résultat précédent suggère que la voie de signalisation Notch est requise pour restaurer la fonctionnalité des LT CD8, mais nous ne savons pas si elle est requise simultanément au traitement. Pour répondre à cette question, nous avons traité des souris

sauvages à l'aide d'anticorps bloquant le ligand PD-L1 comme précédemment décrit. Cependant, certaines souris ont aussi reçu des anticorps bloquant les ligands DLL1 et DLL4 de la voie Notch suivant le même régime que pour l'anti-PD-L1. Des anticorps témoins ont été injectés comme contrôle. Tel qu'attendu, le traitement des souris avec l'anticorps bloquant PD-L1 conduit à une élimination totale de la charge virale dans le sang (Figure 19B). Au contraire, l'injection d'anticorps bloquants la voie de signalisation Notch n'a pas d'effet sur la virémie des souris bien que celle-ci semble un peu plus élevée que celle des souris contrôles. Enfin, le double traitement des souris ne semble pas empêcher de restaurer la fonctionnalité des LT CD8 puisque trois des quatre souris ont éliminé le virus dans le sang. Cette expérience n'ayant été faite qu'une seule fois, il est important de la répéter afin de pouvoir confirmer ces résultats.

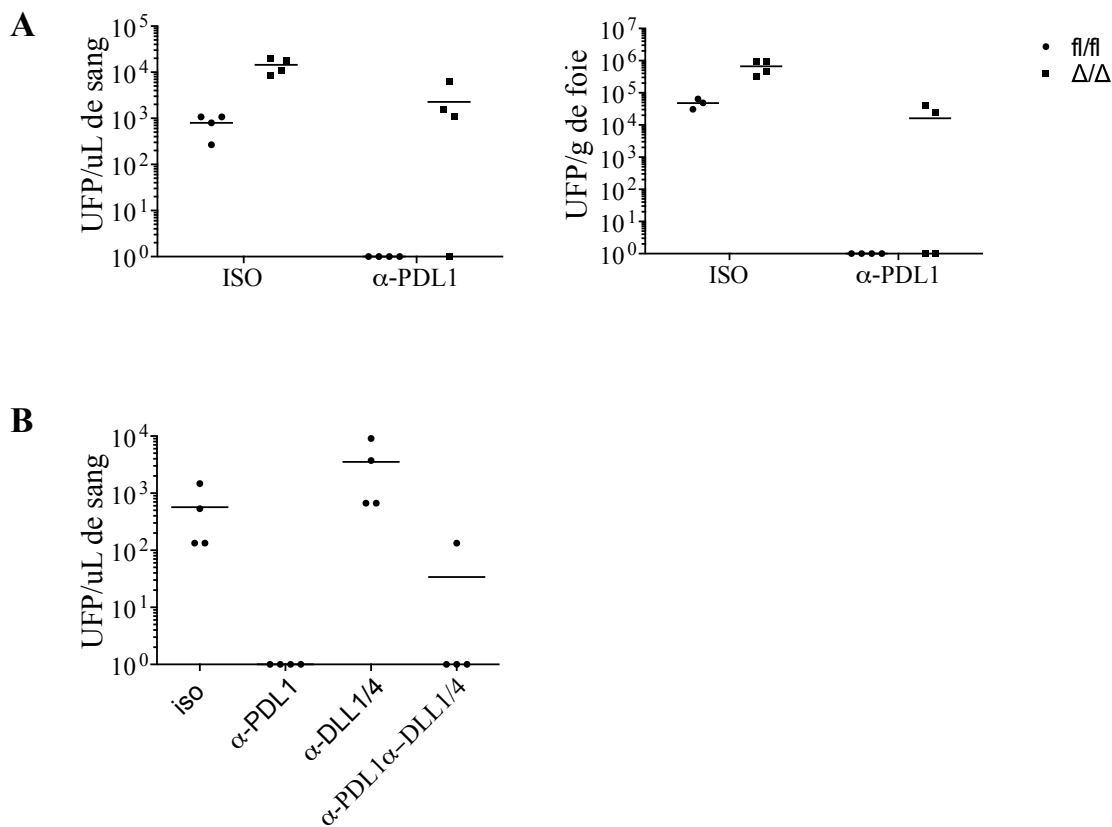


Figure 19. La délétion génétique des récepteurs Notch1 et Notch2 empêche de restaurer la fonctionnalité des LT CD8 suite à un traitement bloquant la voie de signalisation PD-1 mais n'est pas requise durant le traitement. A) Des souris sauvages ou des souris dont les LT CD8 sont déficients pour la voie Notch ont été infectées comme décrit précédemment avec le virus LCMVcl13. Elles ont ensuite été traitées soit avec des anticorps bloquant le

ligand PD-L1 soit avec un anticorps témoins aux deux jours, entre le jour 23 et le jour 35 post-infection. Les souris ont été sacrifiées 2 jours plus tard. Le nombre d'UFP par μL de sang ou par gramme de foie est représenté. B) Même expérience qu'en A) à l'exception que seules des souris sauvages ont été utilisées. Celles-ci ont été traitées avec des anticorps bloquant les ligands DLL1 et DLL4 avec ou sans traitement anti-PD-L1. Le nombre d'UFP par μL de sang est représenté.

Discussion

3. Rôle de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 lors d'une réponse aiguë

Nous avons choisi de réaliser notre étude avec le modèle d'infection par *L. monocytogenes*, car c'est l'un des modèles les plus utilisés pour étudier la biologie des lymphocytes T et en particulier pour étudier tous les événements moléculaires s'effectuant depuis l'activation des LT CD8 jusqu'à leur différenciation en LTm⁵⁷¹. Il a en effet été démontré que ce sont les cellules T qui sont responsables d'éliminer ce pathogène⁵⁷². Ceci s'explique par le fait que *L. monocytogenes* est une bactérie intracellulaire, elle se réplique dans le cytoplasme des cellules hôtes, ce qui conduit la présentation des antigènes par le CMHI, permettant ainsi une réponse lymphocytaire CD8 robuste. Cette réponse T a très bien été caractérisée, ce qui est un atout important pour étudier le rôle d'une molécule dans la réponse des LT CD8. Cependant, bien que cette bactérie intracellulaire soit aussi responsable d'infecter les êtres humains, il est possible que la voie d'injection par intraveineuse dans notre cas ne reflète pas parfaitement ce qui se passerait chez d'autres mammifères. En effet, chez l'homme, la bactérie doit être ingérée et elle doit passer la barrière intestinale avant d'infecter les organes internes, ce qui induit une gastro-entérite. Au contraire, dans notre cas, la bactérie est directement injectée dans le sang conduisant à une infection systémique, ce qui pourrait induire des différences importantes dans la réponse lymphocytaire T.

L'infection aiguë induite par Lm-OVA ou la vaccination de souris fl/fl ou Δ/Δ a révélé un rôle essentiel de cette voie de signalisation dans la différenciation terminale des LTe CD8 et dans l'acquisition des fonctions effectrices. De plus, grâce à l'utilisation de ces deux modèles d'immunisation, nous avons découvert que cette voie de signalisation est particulièrement importante pour la production de cytokines dans un contexte où l'inflammation est faible. Ainsi, ce premier article a permis de répondre partiellement à mon premier objectif de thèse. En effet, si nous avons découvert le rôle de cette voie dans la réponse lymphocytaire CD8, nous ne savons pas par quels mécanismes moléculaires cette voie agit.

3.1 La voie de signalisation Notch dans la réponse effectrice des LT CD8

3.1.1 Choix de différenciation SLEC/MPEC

Il existe trois sous-populations majeures de LT CD8 au pic de la réponse : les EEC, qui ont été activés récemment et qui n'ont pas encore fait le choix de se différencier en SLEC ou en MPEC, les SLEC, qui meurent par apoptose durant la phase de contraction, et les MPEC, qui survivent et se différencient au cours du temps en LTm^{60,69}. Nous avons découvert que l'absence de la voie de signalisation au sein des LT CD8 conduit à une diminution drastique de la génération de SLEC suite à une infection et qu'elle est quasiment abolie lors d'une vaccination. Cette diminution de SLEC est accompagnée par une augmentation des proportions de EEC, suggérant que cette voie est essentielle pour induire le programme transcriptionnel permettant la transition des EEC en SLEC. Or, nous savons que la génération des SLEC est proportionnelle à l'inflammation induite par le pathogène. En effet, les cytokines IL-2 et IL-12 induisent l'expression des facteurs de transcription T-bet et Blimp-1, tous deux essentiels pour induire le programme génétique spécifique aux SLEC^{124,171,172,573,574}. Nos différentes hypothèses de travail seront discutées ci-dessous.

Un signal important pour la génération des SLEC est l'activation soutenue de la voie de signalisation à l'IL-2. En effet, l'IL-2 est principalement produite par les LT CD4 et LT CD8 tandis que l'expression de la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2 (CD25) est rapidement induite suite à une stimulation antigénique. Il a par ailleurs été montré que les cellules qui maintiennent l'expression de CD25 au cours du temps sont celles qui se différencient en SLEC^{124,210}. L'activation de la voie de signalisation de l'IL-2 induit notamment l'expression du facteur de transcription Blimp-1, favorisant ainsi la différenciation des EEC en SLEC^{170-172,212,574}. Enfin, de nombreuses évidences suggèrent que Notch contrôle directement l'expression de CD25 dans les thymocytes immatures ainsi que dans les cellules T^{512,549,559}. Nous avons donc analysé l'expression de CD25 avant le pic de la réponse lymphocytaire CD8 (jour4 ou jour5 post-vaccination ou infection). La proportion de cellules exprimant CD25 est

grandement diminuée 4 jours post-infection ou 3 jours post-vaccination en l'absence de la voie de signalisation Notch (article 1). De plus, les cellules qui l'expriment en expriment de plus faibles quantités par rapport au LT CD8 sauvages. Ces résultats suggèrent que Notch contrôle la génération de SLEC en contrôlant l'expression de CD25. Ainsi, une plus faible activation de la voie à l'IL-2 conduirait à une plus faible induction de l'expression de Blimp-1, ce qui empêcherait la mise en place du programme transcriptionnel spécifique au SLEC. Cependant, restaurer l'expression de CD25 dans les LT CD8^{ΔΔ} n'est pas suffisant pour restaurer la génération des SLEC (résultats non publiés), suggérant que la voie Notch, en plus de contrôler l'expression de CD25, agit par un autre mécanisme pour contrôler la génération des SLEC.

Étant donné que la voie de signalisation à l'IL-2 semble plus faiblement activée dans les LT CD8 déficients pour la voie de signalisation Notch, nous nous attendions à avoir une plus faible expression du facteur de transcription Blimp-1. De plus, il existe plusieurs évidences suggérant que le NICD contrôle directement l'expression de T-bet, ce qui pourrait être un second mécanisme par lequel la voie Notch contrôle la génération de SLEC^{515,528,569}. Pour tester cela, nous avons tout d'abord démontré que l'expression de T-bet, au pic de la réponse, est un peu plus faible dans les LTe déficients pour la voie Notch suite à une infection alors que son expression est inchangée lors d'une vaccination. Or, il a déjà été démontré qu'il faut une diminution d'expression d'environ 50% de T-bet pour observer un effet sur la génération de SLEC⁵⁷⁵. Ainsi, le fait que son expression ne soit que faiblement diminuée suite à une infection tandis qu'elle reste stable lors d'une immunisation suggère que la voie de signalisation Notch contrôle la génération des SLEC indépendamment de T-bet. Ces résultats sont en accord avec deux études précédentes dans lesquelles l'absence de la voie de signalisation Notch n'affecte pas l'expression de T-bet au sein des LT CD4 et CD8, dans le cadre de la réaction du greffon contre l'hôte^{535,536}. De la même façon, nous avons évalué les niveaux d'expression du facteur de transcription Blimp-1. Cependant, la délétion génétique des récepteurs Notch1 et Notch2 dans les LT CD8 n'induit aucune différence d'expression de ce facteur de transcription, ce qui suggère que la voie Notch ne contrôle pas la génération de SLEC en induisant l'expression de Blimp-1. Ce résultat est surprenant compte tenu du fait que la voie de l'IL-2 est plus faiblement exprimée dans les LT CD8 déficients pour Notch. Cependant, d'autres signaux sont capables d'induire l'expression de Blimp-1 tel que l'IL-12 qui est capable de compenser l'absence d'IL-

2 pour induire Blimp-1 et T-bet¹⁷³. Le fait que la voie de signalisation Notch contrôle la génération des SLEC sans affecter l'expression des deux facteurs de transcription essentiels à leur génération est intrigant. Cela suggère soit que la voie de signalisation Notch pourrait contrôler l'expression d'un facteur de transcription encore inconnu et essentiel à la génération de SLEC, soit que le NICD agit en collaborant aux promoteurs des gènes cibles avec les facteurs de transcription T-bet et/ou Blimp-1 pour induire le programme transcriptionnel induisant la différenciation SLEC. De tels mécanismes de collaboration sont déjà connus entre les FT EOMES, NFκB et le NICD au promoteur de l'IFN-γ pour induire son expression maximale dans les LT CD8^{509,526,527}. Il a aussi été montré que le NICD est responsable du recrutement du facteur de transcription CREB-1 au promoteur de la perforine pour induire son expression⁵²⁶. La présence des deux facteurs de transcription est requise pour une expression maximale.

Il est aussi possible que la voie de signalisation Notch contrôle la génération des SLEC via son action sur le métabolisme des cellules. En effet, suite à leur activation, les LT CD8 prolifèrent massivement et acquièrent leurs fonctions effectrices. Pour ce faire, elles doivent adapter leur métabolisme de la bêta oxydation des acides gras à la glycolyse⁵⁷⁶. Ainsi, les cellules ont besoin d'augmenter leur apport en glucose, en acides aminés et en métaux. Les signaux provenant du RCT, de la costimulation et de diverses cytokines telles que l'IL-2 ou l'IL-12 permettent l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR, permettant ainsi le changement de métabolisme des LT CD8 en cours d'activation. Or, la voie de signalisation Notch peut affecter plusieurs aspects des mécanismes permettant ce changement de métabolisme et sont discutés ci-après.

Il a été démontré que la voie de signalisation Notch contrôle directement l'expression du transporteur de glucose (Glut1), du transporteur de la transferrine CD71 ainsi que du transporteur d'acide aminé CD98 chez la drosophile et dans les cellules T murines^{508,577-580}. De plus, la voie de signalisation Notch contrôle aussi l'expression de deux enzymes impliquées dans la glycolyse, l'hexokinase A (hex-A) et la lactate deshydrogénase (impl3), chez la drosophile tandis que la suractivation de la voie Notch augmente la glycolyse de cellules tumorales, ce qui favorise leur croissance^{579,581}. Ainsi, l'absence de Notch dans les LT CD8 pourrait être responsable d'une activité glycolytique diminuée, ce qui ne permettrait pas une différenciation terminale de ces derniers.

Le changement de métabolisme est initié, en partie, par l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR. Or, l'absence de la voie de signalisation Notch corrèle avec une plus faible activation de cette voie dans les LT CD8 lors d'une infection aiguë induite par Lm-OVA ou par le virus de la grippe (résultat non publié)⁴⁷³. Ce phénotype pourrait s'expliquer par le fait que la protéine PTEN, exprimée par les LT CD8 naïfs, est responsable d'inhiber l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR. Il est en effet connu que la voie Notch régule négativement l'expression de PTEN dans les thymocytes. En effet, la voie Notch induit l'expression de Hes-1, un facteur de transcription capable de réprimer l'expression de PTEN, ce qui favorise la signalisation du pré-RCT, conduisant ainsi à la différenciation des thymocytes⁵⁸². En absence de la voie Notch, la protéine Hes-1 ne serait donc pas induite et PTEN resterait fortement exprimée, ce qui pourrait inhiber l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR, essentielle à la différenciation terminale des LT CD8. Cependant, les niveaux d'expression de PTEN sont diminués de façon similaire entre les LT CD8 fl/fl et Δ/Δ à jour 3 post-infection comparés aux LTn (résultat non publié). De plus, l'infection de souris dont les LT CD8 sont spécifiquement déficients pour Hes-1 ne conduit pas à une plus faible génération de SLEC (résultat non publié). Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation Notch n'impacte pas l'activation de la voie PI3K-mTOR-Akt en contrôlant l'expression de PTEN. De plus, la protéine Hes-1, qui est une cible transcriptionnelle de Notch n'est pas impliquée dans la génération des SLEC.

La génération de SLEC est fortement diminuée dans les LT CD8 Δ/Δ suite à une infection aiguë, mais est quasiment abolie lors d'une vaccination (article 1). Dans le cas d'une infection, l'inflammation générée par le pathogène est très importante, ce qui pourrait compenser l'absence de la voie Notch. En effet, l'inflammation induite par l'infection et notamment l'IL-12 et l'IL-2 sont responsable de la forte induction des FT T-bet et BLIMP-1 dont on connaît l'importance pour la génération de SLEC^{124,170,172,210}. Or, lors d'immunisation avec les CD, la production d'IL-12 et d'IL-2 ainsi que l'induction des FT T-bet et BLIMP-1 sont moins importantes, ce qui pourrait augmenter la nécessité du NICD pour générer des SLEC.

3.1.2 Notch contrôle les fonctions effectrices des LT CD8

Nous avons démontré un rôle important de la voie de signalisation Notch dans la fonctionnalité des LT CD8 (article 1). En effet, l'absence de cette voie conduit à une plus faible production d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2 suite à une vaccination tandis que seule l'IFN- γ est légèrement diminuée lors d'une infection aiguë. Cela a des conséquences fonctionnelles puisque la capacité à éliminer l'infection bactérienne est diminuée suite à une vaccination uniquement. Ces résultats suggèrent un rôle de la voie Notch plus important dans des modèles où l'inflammation est faible. En effet, l'absence de signaux inflammatoires pourrait limiter l'activation de facteurs de transcription importants pour l'expression des cytokines et plus particulièrement l'IL-2 et le TNF- α , les deux cytokines dont l'expression est affectée uniquement suite à une vaccination. L'infection induite par Lm est connue pour induire l'expression de l'IL-12 par les cellules de l'immunité innée. Or, cette cytokine induit l'activation des protéines STAT4 et induit l'expression de T-bet, deux protéines connues pour induire l'expression de l'IFN- γ . De plus, il est connu que le NICD, EOMES et T-bet collaborent au promoteur de l'IFN- γ pour induire son expression^{42,77,509,526,527,545,556,583,584}. Ainsi, l'expression maximale de cette cytokine pourrait être la conséquence d'un effet collaboratif de ces FT. Ainsi, dans un environnement inflammatoire, la présence de Notch n'est que faiblement requise pour l'induction maximale de l'IFN- γ . Cependant, dans le cas de vaccination par des CD, la production d'IL-12 est beaucoup plus faible, ce qui corrèle avec une plus faible expression de T-bet dans les LT CD8^{573,585}. Ainsi, la présence de T-bet et de STAT4 au promoteur de l'IFN- γ pourrait être limitante. Ainsi, la présence du NICD au promoteur de l'IFN- γ serait plus importante pour induire son expression. Dans le but de tester cette hypothèse, nous souhaiterions immuniser des souris fl/fl ou Δ/Δ avec des CD chargées avec le peptide OVA en présence ou non d'une infection avec la souche sauvage de Lm n'exprimant pas l'ovalbumine. Si notre hypothèse est validée, l'expression de l'IFN- γ devrait être plus forte dans les souris Δ/Δ immunisée avec des CD en présence de l'infection comparée à des souris Δ/Δ immunisées, mais non infectées. Dans le but d'identifier plus précisément le rôle de l'IL-12, il est envisageable d'infecter des souris fl/fl ou Δ/Δ avec Lm-OVA et de bloquer la voie de l'IL-12 avec des anticorps. Ainsi, les LT CD8 des souris traitées avec l'anticorps bloquant ne percevraient plus

ce signal. Nous nous attendons donc à une expression plus faible de l'IFN- γ dans le cas des souris traitées.

3.1.3 Notch et la génération de LT mémoires

L'absence de la voie de signalisation Notch n'empêche pas la génération de LTm fonctionnels suite à une infection aiguë et conduit même à un taux de génération de LTm plus élevé lors d'une vaccination des souris. Cependant, ces derniers sont incapables de produire de l'IFN- γ en réponse à une courte restimulation *in vitro*. Ces résultats sont intrigants, car au pic de la réponse, la déficience de Notch corrèle avec une plus forte expansion clonale et une plus grande proportion de MPEC suite à une infection tandis que l'expansion clonale et les proportions de MPEC sont similaires aux LT CD8 sauvages suite à la vaccination. Une explication possible de cette plus forte génération de LTm pourrait être que les LTe déficients pour Notch produisent moins d'IFN- γ . Cette cytokine est en effet responsable de la mort de ces derniers lors de la phase de contraction^{81,586}. Une autre possibilité qui pourrait expliquer la plus forte génération de LT mémoires réside dans le fait que les LT CD8 déficients pour Notch sont plus protégés des anticorps anti-CD8 injectés par voie intraveineuse que les LT CD8 sauvages lors d'une infection par le virus de la grippe dans la rate⁴⁷³. Cela suggère qu'ils se situent majoritairement dans la pulpe blanche tandis qu'une plus forte proportion des LT CD8 sauvages se localisent dans la pulpe rouge^{139,587,588}. Or, il a été démontré que les LT CD8 destinés à mourir par apoptose (SLEC) localisent préférentiellement dans la pulpe rouge tandis que les cellules qui survivent à long terme (MPEC) localisent préférentiellement dans la zone des cellules T, au sein de la pulpe blanche⁵⁸⁹. En effet, la localisation des MPEC vers la zone T de la pulpe blanche est la conséquence de la plus forte expression du récepteur CCR7 à leur surface. Ce récepteur peut alors interagir avec les chimiokines CCL-19 et CCL-21 produites par les cellules stromales gp38⁺ présentes dans la zone T. Or, ces dernières produisent aussi le facteur de survie IL-7, ce qui pourrait les avantager pour leur survie. Ainsi la voie de signalisation Notch favorise la localisation des LT CD8 dans la pulpe blanche, probablement en contrôlant l'expression du récepteur au chimiokine CCR7, favorisant ainsi la survie des LTe permettant ainsi la génération de LT CD8 mémoires⁵⁹⁰.

Il est surprenant que l'absence de la voie de signalisation n'empêche pas la génération de LT CD8 mémoires puisqu'il a été démontré que la voie canonique de Notch est essentielle à la maintenance des LTm CD4⁵⁸⁰. En effet, la délétion de la protéine RBPJ κ dans les LT CD4 n'empêche pas la génération de LTe suite à une immunisation avec de l'adjuvant de Freund contenant le peptide OVA, mais leur nombre commence à décliner à partir de jour 10 post-immunisation. Les auteurs ont démontré que la voie Notch contrôlait la survie des LTm CD4 par le contrôle transcriptionnel direct du transporteur de glucose Glut1. De façon intéressante, l'absence de la voie de signalisation Notch n'affecte pas la signalisation de la voie de l'IL-7 ni la voie de mTOR⁵⁸⁰.

Il a été démontré que les facteurs de transcription Bcl-6 et Ikaros peuvent réprimer sélectivement certains gènes normalement induits par la voie de signalisation Notch (Figure 20)⁵⁹¹⁻⁵⁹⁴. En effet, une étude démontre que Bcl-6 est capable d'interagir directement avec le NICD. Cette interaction exclut la protéine Maml1 du complexe NICD-RBPJ κ et favorise le recrutement de la déacétylase Sirt1 (Figure 20). Cela a pour conséquence de réprimer l'expression de Hes-5, une cible directe du NICD⁵⁹¹. Alors même que la voie Notch est activée, le gène Hes-5 est spécifiquement réprimé lors de la neurogenèse en présence de Bcl-6. Cette protéine pourrait ainsi être responsable d'inhiber les gènes responsables de la différenciation terminale (SLEC) induite par la voie Notch, en plus de favoriser l'expression de gènes essentielle à la génération des LTm. Le choix de différenciation SLEC/MPEC pourrait donc être, en partie la conséquence d'une balance entre le NICD et Bcl-6. En accord avec cela, il a été démontré que l'expression de Bcl-6 est rapidement diminuée suite à l'activation des LT CD8 et que la voie de signalisation de l'IL-2 régule négativement son expression²¹⁰. Or, les récepteurs Notch sont rapidement induits et le NICD peut alors permettre la mise en place des fonctions effectrices et induire la différenciation des LT CD8. Ainsi, on s'attendrait à ce que les cellules qui maintiennent leur expression de CD25 au cours de la réponse n'expriment que de faible quantité de Bcl-6. Parallèlement à cela, la voie de l'IL-2 permet l'expression de Blimp-1, ce qui conduira avec la collaboration du NICD à l'induction du programme transcriptionnel spécifique des SLEC.

Le facteur de transcription Ikaros est capable de se fixer aux mêmes séquences d'ADN que celle de RBPJ κ et inhiber la transcription de gènes cibles spécifiques de la voie Notch

(Figure 20)⁵⁹²⁻⁵⁹⁴. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure un rôle positif d'Ikaros dans la génération de LTm. En accord avec cela, l'expression d'Ikaros est diminuée dans les LTE en présence d'IL-2 ou d'IL-12 et est fortement exprimée dans les LTn, les LTm et les MPEC⁵⁹⁵. L'absence d'activité de cette protéine a les effets opposés à ceux que l'on observe en l'absence de Notch, notamment une plus forte expression de CD25, de l'IL-2, de l'IFN- γ et de la GrzmB, ce qui corrèle avec un meilleur contrôle de la charge bactérienne suite à une infection par Lm ou à un meilleur contrôle de la croissance tumorale^{595,596}. Tous ces éléments suggèrent que, comme pour Bcl-6, l'expression d'Ikaros est diminuée en réponse à un environnement inflammatoire permettant à la voie de signalisation Notch d'être activée de façon optimale pour diriger la génération des SLEC. Au contraire, une plus forte expression d'Ikaros dans les MPEC permettrait d'inhiber l'action de la voie de signalisation Notch favorisant ainsi la génération de LTm.

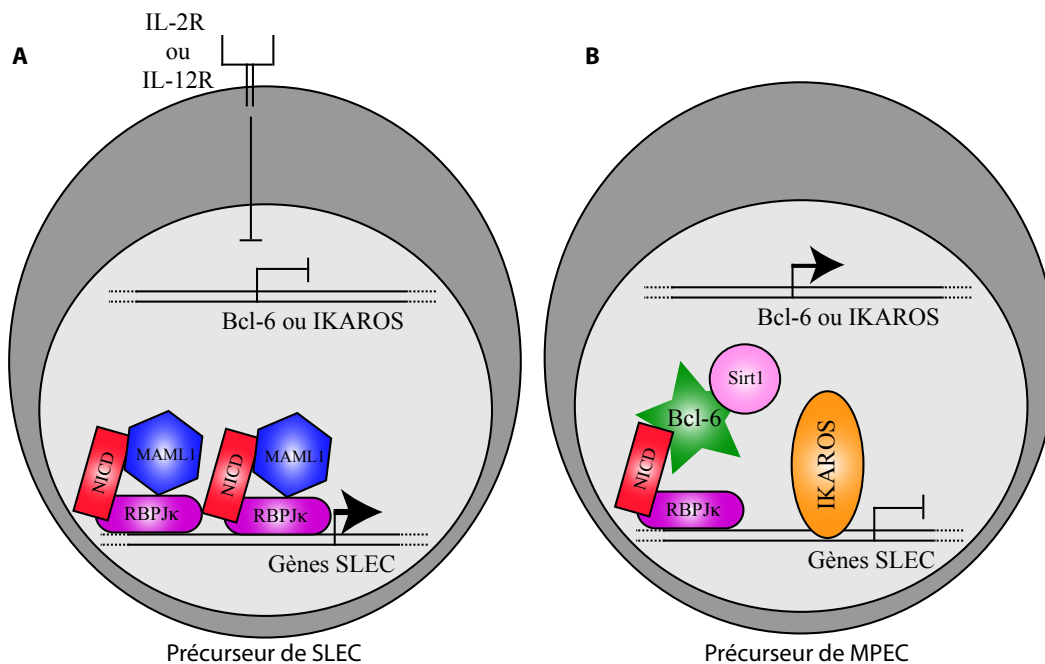


Figure 20. Modèle hypothétique de la régulation de la voie de signalisation Notch par Bcl-6 et IKAROS dans les LT CD8 en cours d'activation. A) Le maintien de l'expression de CD25 ainsi que la signalisation de l'IL-12R inhibe l'expression de Bcl-6 et IKAROS dans les précurseurs de SLEC. Simultanément, la voie de signalisation Notch est activée et le NICD induit l'expression de gènes cibles importants pour la génération des SLEC. B) En l'absence de signaux induits par l'IL-2R ou l'IL-12R, Bcl-6 et IKAROS sont induits. Bcl-6 peut alors se fixer au NICD ce qui exclut MAML1 et les co-activateurs de

la transcription, mais recrute la déacétylase Sirt1 ce qui empêche la transcription des gènes cibles de la voie Notch. Par ailleurs, la protéine IKAROS peut entrer en compétition avec RBPJK pour lier l'ADN, un mécanisme qui empêche aussi la transcription des gènes cibles de Notch.

3.1.4 Modèle du rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation SLEC/MPEC

Notre équipe ainsi que celle du Dr Amsen a démontré un rôle essentiel de la voie Notch dans la génération des SLEC suite à une vaccination ou à une infection aiguë (article1)⁴⁷³. Ce défaut de différenciation n'est pas la conséquence d'une plus faible expression de T-bet ou Blimp-1, les deux facteurs de transcription connus comme étant essentiels pour induire le programme transcriptionnel spécifique des SLEC. Cependant, nous avons démontré que la proportion de LT CD8^{ΔΔ} qui expriment CD25 est grandement diminuée à jour 4 et 5 post-vaccination ou post-infection respectivement, ce qui suggère une plus faible activation de la voie PI3K-Akt-mTOR. Or, l'activation de cette voie est essentielle pour le changement de métabolisme nécessaire pour supporter la prolifération et la fonctionnalité des cellules T différenciées de façon terminale^{597,598}. De plus, notre laboratoire ainsi que celui du Dr Amsen a démontré que cette voie est plus faiblement activée dans les LT CD8^{ΔΔ} suite à une infection aiguë (résultat non publié) (Figure 21)⁴⁷³. Cependant, surexprimer la protéine CD25 dans les LT CD8^{ΔΔ} n'est pas suffisante pour restaurer la génération de SLEC (résultat non publié). De plus, augmenter la biodisponibilité de l'IL-2 lors de la vaccination des souris ne permet pas non plus de restaurer la génération de SLEC (article 1). Il serait nécessaire de vérifier que la surexpression de CD25 conduit bien à une activation de la voie à l'IL-2, car il est possible que la surexpression de CD25 ne permette pas de former des récepteurs fonctionnels à la surface des cellules (stress du réticulum endoplasmique par exemple). Il est aussi possible que l'expression induite par le vecteur codant CD25 ne soit pas suffisamment forte pour avoir un effet biologique suffisant. Il est possible que la plus faible activation de la PI3K-Akt-mTOR ne soit pas uniquement la cause d'une plus faible activation de la voie à l'IL-2 puisque de nombreux signaux conduisent à l'activation de cette dernière. Ainsi, il est possible que l'absence de la voie de signalisation Notch affecte négativement d'autres voies dont on ne sait pas encore qu'elles sont régulées par

Notch et qui participent à l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR. En plus de son rôle dans la transition métabolique nécessaire à la génération de SLEC, il est possible que la voie Notch affecte la glycolyse des cellules T par le contrôle transcriptionnel direct des transporteurs de glucose (Glut1), d'acides aminés (CD98) et du transporteur de transferrine (CD71) (Figure 21). Enfin, la voie Notch pourrait être responsable de réguler directement l'expression d'un FT encore inconnu et essentiel à l'établissement du programme transcriptionnel spécifique des SLEC ou encore que le NICD agissent directement aux promoteurs des gènes cibles en collaborant avec les FT T-bet et Blimp-1 (Figure 21). Ainsi, la voie de signalisation pourrait agir comme une clé de voûte de la génération de SLEC en contrôlant différents aspects essentiels à la génération des SLEC.

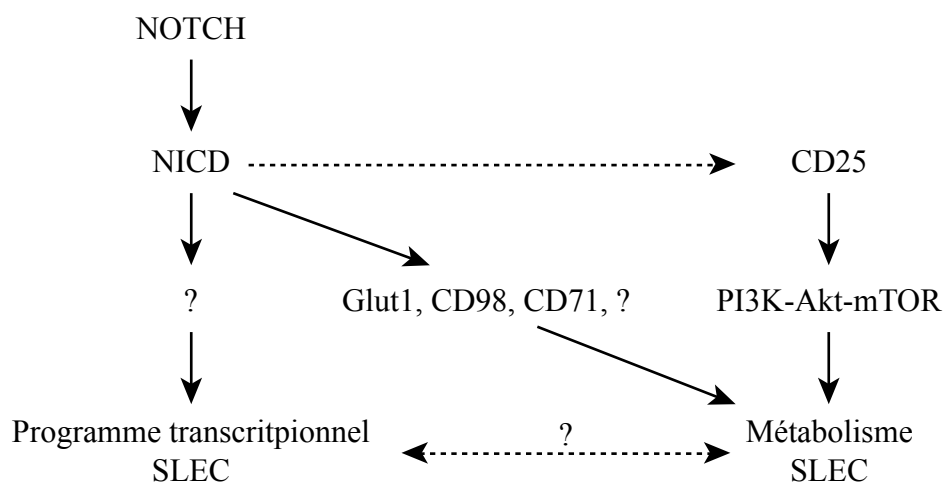


Figure 21. Schématisation du rôle de la voie de signalisation Notch dans la génération des SLEC suite à une infection aiguë. Suite à l'activation de la voie de signalisation Notch, le NICD migre jusqu'au noyau où il peut induire l'expression d'un FT encore inconnu et essentiel à la génération de SLEC ou agir directement en collaborant avec T-bet et Blimp-1 pour induire le programme transcriptionnel SLEC (panel de gauche). Le NICD pourrait aussi contrôler l'expression de Glut1, CD98, CD71 ou d'une autre protéine encore non identifiée ce qui favorisera un métabolisme favorable à la génération des SLEC (panel du milieu). À droite, le NICD pourrait contrôler directement l'expression de CD25 ce qui améliorera grandement l'activation de la voie à l'IL-2. Cela aura pour conséquence d'activer la voie PI3K-Akt-mTOR ce qui favorisera l'adaptation métabolique nécessaire au SLEC (panel de droite).

3.1.5 Perspectives

3.1.5.1 Mécanistique

Nous avons découvert un rôle essentiel de la voie de signalisation Notch dans la différenciation terminale ainsi que dans l'acquisition des fonctions effectrices des LTe CD8. Concernant son rôle dans l'établissement de la fonctionnalité des cellules T, il est facile d'imaginer que cette voie contrôle directement l'expression des cytokines et des molécules effectrices telles que la granzyme B ou la perforine par fixation directe du NICD à leurs promoteurs tel que cela a déjà été décrit dans d'autres types cellulaires bien que cela soit encore à prouver pour certaines de ces molécules dans les LT CD8. Cependant, son rôle dans le choix de différenciation des LT CD8 reste obscur. En effet, la diminution drastique de la génération de SLEC en absence de la voie Notch ne s'accompagne pas d'une diminution de l'expression des deux facteurs de transcription connus pour être indispensables à ce mécanisme. Cela suggère que cette voie de signalisation induit l'expression d'une protéine encore inconnue et qui serait capitale dans la différenciation terminale des SLEC. Une autre hypothèse implique que le NICD collabore avec d'autres facteurs de transcription tels que T-bet et Blimp-1 pour induire la transcription optimale du programme transcriptionnel SLEC. Ainsi, pour comprendre comment la voie de signalisation Notch contrôle ce choix de différenciation, nous souhaiterions déterminer quelles sont les cibles transcriptionnelles directes et indirectes de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 à des temps précoces de la réponse, avant que ces choix de différenciation ne soient effectués. Pour ce faire, nous allons réaliser le séquençage et la quantification de tous les ARNm (RNA-séq) présents dans les LT CD8 3 jours post-infection pour déterminer le profil transcriptionnel induit par la déficience de la voie de signalisation Notch. Ainsi, il sera possible d'identifier parmi les gènes différentiellement exprimés ceux qui pourraient être impliqués dans la génération des SLEC. Nous avons déterminé que le jour 3 post-infection est cohérent puisque le blocage de la voie Notch par des anticorps bloquant les ligands DLL1 et DLL4 à jour 0 et 3 conduit à une diminution de la génération des SLEC similaires à celle observée dans les LT CD8 Δ/Δ tandis qu'un blocage de ces ligands uniquement à jour 3,5 post-infection n'a plus d'effet sur la génération des SLEC (résultats non publiés).

Ainsi, ces résultats suggèrent que la voie Notch agit entre le jour 0 et le jour 3,5 pour induire son effet sur la génération de SLEC. Le rôle de gènes identifiés par le RNA-séq sera testé par surexpression ou invalidation de leur expression dans des LT CD8 activés. Cette expérience permettra aussi d'identifier quelles sont les molécules effectrices, mais aussi quelles sont les voies (métabolique, glycolytique par exemple) qui sont contrôlées par la voie de signalisation. Il sera aussi possible de savoir si la voie de signalisation semble affecter la migration des LT CD8 en déterminant si celle-ci contrôle l'expression de récepteurs aux chimiokines notamment. Une telle expérience de RNA-séq a déjà été effectuée dans des LT CD8 sauvages et déficients pour les récepteurs Notch1 et Notch2 suite à une infection de la grippe chez la souris⁴⁷³. Cependant, ce dernier ayant été réalisé au pic de la réponse, après que les événements de différenciations aient eu lieu, il ne met en évidence que les conséquences d'un défaut de différenciation en SLEC et non les causes. En effet, cette expérience révèle que plus de 40% des gènes spécifiquement exprimés dans les SLEC sont plus faiblement représentés des LT CD8^{ΔΔ} tandis que 36% des gènes signature des MPEC sont plus fortement exprimés en l'absence de Notch comparé aux LT CD8 sauvages.

Les cibles transcriptionnelles directes de la voie de signalisation Notch pourraient être identifiées par une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'anticorps dirigés contre le NICD et RBPJκ suivi du séquençage à haut débit (Chip-séq). Cette expérience sera effectuée à des temps précoces suite à l'activation *in vitro* des LT CD8 en présence de ligands pour la voie de signalisation Notch. La comparaison des résultats des expériences de RNA-séq et de Chip-séq nous permettra de nous assurer que la liaison du NICD à l'ADN est bien responsable de la régulation transcriptionnelle du gène identifié. Il sera aussi possible de savoir si CD25 est une cible transcriptionnelle directe de Notch. De plus, l'analyse bio-informatique des résultats générés par l'expérience de Chip-séq nous permettra d'identifier la présence de séquences spécifiquement reconnues par d'autres facteurs de transcription aux alentours de celles spécifiques du complexe NICD-RBPJκ. Cela permettra d'identifier d'éventuels événements de collaboration entre le NICD et d'autres FT tels que T-bet et Blimp-1 pour induire la transcription de gènes cibles. Dans le cas où des séquences consensus spécifiques d'autres FT seraient trouvées proches de celui spécifique au NICD, nous testerons l'effet collaboratif de ces FT en supprimant l'expression de chacun de ces FT individuellement

et simultanément. Nous analyserons aussi l'effet collaboratif sur la transcription à l'aide d'un rapporteur luciférase contenant le fragment de promoteur identifié.

Étant donné que la voie de signalisation Notch influence positivement l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR, nous souhaiterions analyser l'effet de l'absence des récepteurs Notch1 et Notch2 sur le métabolisme des LT CD8⁴⁷³. Dans un premier temps, nous allons vérifier que dans nos modèles d'infection et de vaccination, la voie PI3K-Akt-mTOR est moins activée par cytométrie en flux. Des résultats préliminaires effectués sur des effecteurs à jour 3 post-infection suggèrent une plus faible expression de la forme phosphorylée de la protéine S6, du transporteur d'acides aminés CD98, du transporteur de transferrine CD71 (résultats non publiés). Ensuite, nous souhaitons analyser les conséquences biologiques de la diminution d'activation de cette voie en comparant les taux de consommation d'oxygène (respiration cellulaire) ainsi que le taux d'acidification extracellulaire (glycolyse).

Enfin, la génération des SLEC est influencée par la localisation des LT CD8 au sein de la rate. Or, la déficience de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 impacte la localisation de ces derniers dans la rate puisqu'ils sont en plus grand nombre dans la pulpe blanche. Ainsi, il serait intéressant d'analyser le rôle de la voie Notch sur l'expression de récepteurs aux chimiokines. L'expérience de RNA-séq décrite ci-dessus répondra à cette question.

3.1.5.2 Modalités d'activation de la voie de signalisation Notch

Nous ne savons que peu de choses sur les événements conduisant à l'activation de la voie de signalisation Notch. Néanmoins, l'équipe du Dr Maillard a mis en évidence que, lors d'une réaction du greffon contre l'hôte, les ligands DLL1 et DLL4, exprimés à la surface des cellules stromales des organes lymphoïdes secondaires, sont responsables de l'activation de la voie Notch au sein des cellules T CD4 et CD8^{533,535,536,557}. Leurs études démontrent que Notch n'est pas requis tout au long de la réponse lymphocytaire pour induire son effet lors de la réaction du greffon contre l'hôte⁵³². Au contraire, l'activation de la voie est requise tôt, dans les deux premiers jours, pour affecter durablement la réponse des LT. Enfin, il a été démontré que c'est la voie canonique (dont les effets sont la conséquence de l'induction de la transcription de

gènes cibles par l'association du NICD avec RBPJ κ aux promoteurs de ces dernières suites à l'activation de la voie par les ligands) qui est responsable des effets induits par la voie Notch dans les LT CD8 dans le cadre d'une réaction du greffon contre l'hôte ou d'une infection virale par le virus de la grippe^{473,536}. Cependant, il serait intéressant de comprendre les modalités de l'activation de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8, suite à une infection bactérienne aiguë. Nous souhaiterions évaluer lequel des deux récepteurs Notch1 ou Notch2 est important dans la réponse lymphocytaire ou si ces deux récepteurs ont des rôles redondants ou distincts. L'étude du Dr Amsen démontre que ces deux récepteurs, Notch1 et Notch2, ont des rôles redondants dans la génération de SLEC, Notch1 ayant un rôle prédominant. L'infection de souris dont les LT CD8 seraient déficientes pour Notch1 uniquement ou pour Notch2 uniquement permettra de répondre à cette question. L'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre chacun des ligands, seuls ou en combinaisons, et à différents moments de la réponse lymphocytaire nous permettra de déterminer quels sont les ligands responsables de l'activation de la voie et le moment où cette dernière doit être activée pour induire ses effets au sein des LTe. Enfin, l'infection de souris exprimant une forme tronquée de la protéine MAML, empêchant ainsi son interaction avec le NICD et donc d'induire la transcription de gènes cibles, permettra de comprendre si les effets induits par la voie Notch dans les LT CD8 est la conséquence de l'activation de la voie canonique ou non de Notch.

Mieux connaître les modalités de l'activation de la voie de signalisation Notch est important pour permettre l'établissement de stratégie thérapeutique visant à activer ou supprimer son activation.

3.2 Rôle de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 lors d'une infection chronique

Nous avons choisi le modèle d'infection chronique induit par le virus LCMVcl13 pour étudier le rôle de la voie de la voie de signalisation Notch dans l'épuisement des LT CD8, car c'est le modèle le mieux caractérisé et le plus utilisé pour comprendre les mécanismes conduisant à la dysfonction des cellules T. Ceci s'explique par le fait qu'il existe deux souches

du virus LCMV, la première appelée Armstrong induit une infection aiguë induisant une forte réponse lymphocytaire CD8 tandis que la seconde nommée clone 13, qui dérive de la première, est responsable d'induire une infection chronique qui persiste environ 3 mois dans la souris et qui conduit à un fort épuisement des LT CD8. Ainsi, ces deux souches ont été largement utilisées pour étudier les mécanismes conduisant à l'épuisement des cellules T. Si c'est dans ce modèle que l'épuisement des cellules T a été initialement décrit, il a rapidement été constaté que ce phénomène se produit dans d'autres modèles animaux comme dans l'hépatite virale murine, l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne chez les primates, les infections causées par l'hépatite B ou C chez l'humain ou encore dans le cas du virus de l'immunodéficience humaine, mais aussi dans les cas de cancer⁵⁹⁹⁻⁶⁰⁶. Dans tous ces modèles, la cause de l'épuisement des LT CD8 est la persistance de l'antigène et de l'inflammation et se manifeste par l'expression de récepteurs inhibiteurs, ce qui conduit à la perte graduelle de leur fonctionnalité³⁵⁸. Ce modèle d'infection chronique est particulièrement intéressant puisqu'il a non seulement permis de comprendre comment l'épuisement des LT s'établit, mais a aussi permis le développement de stratégies thérapeutiques pour combattre les infections chroniques et les cancers^{558,563,607,608}. Cependant, ce modèle n'est pas suffisant à lui seul pour comprendre comment s'établit les mécanismes d'épuisement. En effet, l'environnement tumorale est très différent d'un organe infecté, ce qui peut conduire à des divergences importantes dans la réponse des Lt CD8.

3.2.1 La voie de signalisation Notch, l'expansion clonale des LT CD8 et la structure de la rate

Nous avons démontré que suite à une infection chronique, la fréquence et le nombre de LT CD8 déficients pour Notch répondant spécifiquement à l'infection en cours sont plus élevés à jour 8 post-infection. Cependant, plus tard dans la réponse, la fréquence de ces populations est similaire entre les LT CD8 sauvages et déficients pour Notch tandis que les nombres sont toujours plus importants en l'absence de la voie Notch. Ceci s'explique par le fait que le volume (résultat non montré) ainsi que les nombres cellulaires des rates des souris sauvages ont diminué entre le jour 8 et le jour 30 post-infection, ce qui n'est pas le cas des rates de souris dont les LT

CD8 sont déficients pour la voie Notch. Or, il est maintenant bien connu que le virus LCMVcl13 peut infecter les cellules réticulées fibroblastiques (FRC) des organes lymphoïdes secondaires, ce qui conduit à une destruction de ces dernières par les LT CD8 répondants à l'infection, provoquant ainsi une hypertrophie de la rate notamment⁶⁰⁹⁻⁶¹¹. Cela suggère que la perte de fonctionnalité des LT CD8 au cours du temps suite à l'infection permet de protéger la cellularité et la structure de la rate. Néanmoins, les LT CD8 déficients pour Notch ont une fonctionnalité similaire à celles des LT CD8 sauvages aux temps précoces après l'infection. Une autre possibilité réside dans le fait que les FRC infectés expriment de forts niveaux d'expression du ligand PD-L1, ce qui les protège des LT CD8 activés. Ainsi, les LT CD8 déficients, qui expriment de plus forts niveaux d'expression du RI PD-1, seraient plus sensibles aux signaux transmis par ce dernier, conduisant ainsi à une plus forte inhibition des cellules T qui interagissent avec les FRC, préservant ainsi l'architecture et la cellularité de la rate. Il est possible que le maintien de cette architecture favorise une meilleure activation des LT CD8, ce qui pourrait expliquer le nombre plus important de LT CD8 spécifiques de l'infection en cours à des temps plus tardifs.

Le fait qu'il y ait plus de LT CD8^{ΔΔ} répondants à l'infection en cours est surprenant puisqu'il a été démontré que la voie Notch régule négativement l'apoptose dans certaines lignées cancéreuses humaines et dans les cellules T (Jurkat)^{547,612}. Premièrement, la voie de signalisation Notch induit l'expression de gène dont les protéines ont un effet anti-apoptotique tel que Bcl-2 et la « Flice-like inhibitor protein » FLIP⁵⁴⁷. Deuxièmement, la protéine Notch1 est capable d'interagir avec la protéine src kinase p56^{Lck} et la protéine PI3K pour activer la voie Akt/PKB, ce qui s'oppose à l'induction de l'apoptose bien que le mécanisme exact ne soit pas bien compris⁵⁴⁷. Troisièmement, il a été démontré dans les thymocytes immatures que Notch1 et Notch4 induisent directement l'expression de c-myc, responsable d'induire l'expression de la survivine et de l'inhibiteur de l'apoptose IAP⁶¹³. Enfin, dans les LT CD8, l'absence de Notch corrèle avec une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro*^{527,528}. Ainsi, il est difficile d'expliquer comment l'absence de la voie de signalisation Notch peut conduire à une expansion clonale plus importante.

3.2.2 La voie de signalisation Notch et l'expression des récepteurs inhibiteurs

Nous avons découvert un rôle essentiel de la voie de signalisation Notch dans la lutte contre l'épuisement des LT CD8. En effet, l'absence de cette voie dans les cellules T CD8 conduit à une plus forte expression des RI PD-1 et Lag-3 à des temps tardifs de l'infection (jour 15 post-infection et plus) suggérant que ces derniers sont plus épuisés. Or, il est déjà bien connu que l'expression des RI est l'une des causes de l'état d'épuisement des LT CD8 puisque les traitements utilisant des anticorps bloquant ces voies conduisent à un gain de fonctionnalité des cellules T, ce qui conduit à une diminution de la charge virale ou de la croissance tumorale^{244,283,316,368,369,563,614-618}. De plus, la co-expression de Lag-3 et PD-1 identifie les LT CD8 sévèrement épuisés et dysfonctionnels dans différents types de cancers, dont le cancer de l'ovaire chez l'Homme⁶¹⁹⁻⁶²¹. En accord avec cela, un traitement bloquant les deux voies synergisent pour améliorer la fonctionnalité des LT CD8⁶²². Parmi les mécanismes induisant l'expression des différents RI lors d'une infection chronique, ceux contrôlant l'expression de PD-1 sont les mieux connus. Il est surprenant d'observer une augmentation de l'expression de PD-1 dans des LT CD8 déficients pour la voie Notch puisqu'il a déjà été démontré par notre laboratoire que cette voie contrôle directement l'expression de PD-1 lors de l'activation *in vitro* des cellules T²⁷². Néanmoins, nous savons aussi que Notch contrôle l'expression de T-bet et nous observons de plus une forte diminution de l'expression de ce dernier dans les LT épuisés déficients pour Notch suite à une infection chronique^{515,545,569}. Or, ce facteur de transcription est connu pour réprimer l'expression de PD-1 en se liant à son promoteur³⁵⁵. De plus, la diminution de T-bet dans les LT CD8 épuisés conduit à une plus forte expression des RI Lag-3, CD160 et BTLA-4 en plus de PD-1, ce qui suggère que ce FT contrôle négativement leur expression bien que nous ne sachions pas s'il se fixe directement au promoteur de chacun de ces RI³⁵⁵. Ainsi, l'absence de Notch induirait une plus faible expression de T-bet, conduisant alors à une plus forte expression de PD-1 et Lag-3.

Il est aussi connu que l'un des facteurs de transcription responsable de l'expression de PD-1 est FoxO1 dont l'activité est régulée négativement par la voie PI3K-Akt-mTOR²⁰¹. En effet, une forte activation de la voie PI3K-Akt-mTOR conduit à la phosphorylation de FoxO1 par Akt, ce qui entraîne sa dégradation et empêche ou diminue l'expression de PD-1. Or, il a été

démontré que la voie de signalisation Notch favorise l'activation de la voie PI3K-Akt dans diverses lignées de cellules cancéreuses ainsi que dans les cellules T^{473,489,547,578,612,623,624}. Notamment, Notch1 favorise l'activation d'Akt en interagissant directement avec PI3K et en favorisant l'activation de mTORC2 bien que les mécanismes moléculaires précis ne soient pas encore bien compris^{547,612,623,625}. En accord avec cela, une étude récente a démontré que l'absence de la voie de signalisation Notch corrèle avec une plus faible activation de la voie mTOR-Akt dans les LT CD8 répondants à une infection par le virus de la grippe⁴⁷³. En plus d'une activation plus faible de cette voie, les LT CD8^{ΔΔ} expriment de plus faibles niveaux d'expression de la forme phosphorylée (inactive) de la protéine FoxO1, suggérant que celle-ci est plus active pour induire la transcription de gènes cibles⁴⁷³. Ainsi, l'expression plus importante de PD-1 dans les LT CD8 déficients pour Notch pourrait être la conséquence d'une plus faible activation de la voie PI3K-mTOR-Akt permettant ainsi une activité soutenue de FoxO1 au promoteur de PD-1 pour induire son expression. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi l'absence de Notch corrèle avec une augmentation de l'expression de PD-1 alors que nous avons démontré que le NICD peut se fixer directement au promoteur de ce dernier pour induire son expression²⁷².

3.2.3 La fonctionnalité des LT CD8 et la voie de signalisation Notch

En plus d'exprimer de plus forts niveaux d'expression de PD-1 et Lag-3, les LT CD8 déficients pour Notch produisent moins d'IFN- γ , de TNF- α et de GrzmB à des temps tardifs de l'infection tandis que seule la GrzmB est moins exprimée au stade aigu de la maladie (jour 8 post-infection). Ainsi, il semblerait que la voie de signalisation Notch contrôle directement l'expression de la GrzmB, comme cela a déjà été démontré dans les cellules T CD8^{526,528,531}. Malgré qu'il soit connu que cette voie contrôle aussi l'expression de l'IFN- γ , il semblerait que ça ne soit pas le mécanisme expliquant la plus faible expression de celui-ci puisque son expression ne diminue que tardivement dans la réponse (jour 15 et jour 30 post-infection)^{513,515,516,519,526-528,531,536,545,553}. En effet, les signaux inflammatoires de l'infection semblent être suffisants pour compenser l'absence de Notch au pic de la réponse pour induire l'expression de l'IFN- γ . Ainsi, cette perte graduelle d'expression ainsi que celle du TNF- α seraient la

conséquence de l'épuisement des LT CD8. Cette diminution d'expression de cytokines pourrait être la conséquence de l'action négative des RI PD-1 et Lag-3 exprimés plus fortement à la surface des LT CD8 déficients pour Notch. Il est en effet connu que le blocage de ces deux voies synergisent pour améliorer la fonctionnalité des LT CD8 et en particulier leur capacité à produire de l'IFN- γ ⁶²². Cependant, le blocage de la voie PD-1 ne permet pas de restaurer la sécrétion de cytokines dans les LT CD8 $\Delta\Delta$. Étant donné que T-bet est capable de se lier directement au domaine CNS22 du promoteur de l'IFN- γ pour induire son expression, il est possible que la plus faible expression de cette cytokine soit la conséquence de la diminution d'expression de T-bet en l'absence de Notch⁵⁴⁵. Enfin, il est connu que le NICD est capable de séquestrer p50 et c-Rel dans le noyau des cellules et plus précisément au promoteur de l'IFN- γ , ce qui a pour conséquence de soutenir son expression au cours du temps⁵⁰⁹. Ainsi, l'absence de Notch empêcherait la rétention nucléaire de NF κ B, ce qui conduirait à une plus faible expression de cette cytokine.

3.2.4 Notch contrôle la différenciation des LT CD8 épuisés

Nous avons démontré un rôle important de la voie de signalisation Notch dans la différenciation des LT CD8 épuisés. La voie de signalisation Notch contrôle l'expression de T-bet, ce qui pourrait expliquer la plus faible proportion de progéniteurs définie par E. John Wherry (T-bet^{fort}PD-1^{int}) en son absence⁵⁴⁵. Par ailleurs, l'absence de Notch dans les LT CD8 améliore l'expression du FT EOMES, ce qui est contradictoire avec le fait que cette voie contrôle directement son expression, mais corrèle avec une étude faite dans le cadre de la maladie du greffon contre l'hôte⁵³⁶. La plus forte expression de EOMES a pour conséquence l'augmentation des proportions des LT CD8 terminalement différenciés (EOMES^{fort}PD-1^{fort}). Cependant, il est aussi possible que le contrôle de l'expression de T-bet et EOMES par Notch soit indirect. En effet, cette voie affecte positivement l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR⁴⁷³. Or, il est connu que cette voie est responsable d'inhiber la forme active de FoxO1 en phosphorylant ce dernier. Ainsi, l'absence de Notch serait responsable d'une plus faible activation de la voie PI3K-Akt-mTOR, ce qui favoriserait l'activité du FT FoxO1. Or, FoxO1 est connu pour réprimer l'expression de T-bet tandis qu'il induit l'expression d'EOMES⁶²⁶. Ce

mécanisme expliquerait comment la voie de signalisation Notch contrôle la différenciation des LT CD8 épuisés en favorisant la génération de LT CD8 différenciés de façon terminale au détriment des progéniteurs.

De plus, la plus forte activité du FT FoxO1 dans les LT CD8 déficients pour Notch conduirait à une plus forte expression de la molécule TCF-1, un FT essentiel à la génération des LT CD8 folliculaires. En effet, TCF-1 se lie au promoteur de Bcl-6 pour induire son expression³⁶¹. Or, Bcl-6 est aussi essentiel à la génération des LT CD8 folliculaires puisque sa délétion empêche la génération de ces derniers³⁶⁰⁻³⁶². De plus, TCF-1 se lie aussi aux promoteurs de *prdm1*, *Havcr2* et *Cish*, codant pour les protéines Blimp-1, Tim3 et Cish pour réprimer leur expression, ce qui permet la génération des LT CD8 folliculaires⁵⁷⁰. Ainsi, la plus forte expression de TCF-1 dans les LT CD8^{ΔΔ} serait suffisante pour favoriser la génération de LT CD8 folliculaires.

Une autre possibilité pouvant expliquer comment l'absence de Notch favorise la génération de LT CD8 folliculaires réside dans le fait que la voie de signalisation des IFN de type I empêche la génération de ces derniers. Ainsi, il est possible que l'absence de Notch induise un défaut d'activation de la voie aux IFN de types I, en régulant directement l'expression de son récepteur par exemple, favorisant ainsi la génération de LT CD8 folliculaires³⁶¹.

Enfin, une autre possibilité réside dans le fait que la différenciation des LT CD8 folliculaires en LT CD8 épuisés de façon terminale (TCF-1⁻) requiert l'activation de la voie de signalisation Notch. Ainsi, en absence de Notch les LT CD8 folliculaires proliféreraient, mais ne pourraient pas se différencier de façon optimale en LT CD8 épuisés de façon terminale (TCF-1⁻).

Il est intéressant de constater que deux sous-populations de LT CD8 épuisés (LT CD8 folliculaires et progéniteurs définis par E. John Wherry T-bet^{fort}PD-1^{int}) ont été identifiées comme ayant gardé certaines de leurs fonctions en plus d'être encore capables de proliférer en réponse ou non à un traitement bloquant la voie de PD-1^{249,283,356,359-362}. En effet, les progéniteurs définis par l'équipe du Dr E. John Wherry (T-bet^{fort}PD-1^{int}EOMES^{faible}) sont en partie distincts des LT CD8 folliculaires (TCF-1⁺) puisque parmi ces derniers, certaines cellules expriment fortement T-bet tandis que la majorité exprime fortement EOMES, le marqueur des LT CD8

différenciés de façon terminale selon le Dr Wherry²⁴⁹. Une explication possible permettant de réconcilier ces données réside dans le fait que, parmi les LT CD8 folliculaires, seules les cellules exprimant fortement T-bet (TCF-1⁺T-bet^{fort}) seraient capables d'être revigorées. Étant donné que T-bet réprime l'expression de PD-1, ces cellules exprimeraient des niveaux intermédiaires de ce dernier et seraient les seules cellules à répondre à un traitement bloquant la voie PD-1.

Nous proposons un modèle permettant d'expliquer comment Notch contrôle la différenciation des LT CD8 épuisés (figure 22). L'activation de la voie de signalisation Notch permet l'induction de l'expression de la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2, CD25, ce qui rend les cellules plus sensibles aux signaux induits par l'IL-2. L'activation de la voie de l'IL-2 conduit à l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR, ce qui favorise la phosphorylation du FT FoxO1 et entraîne sa dégradation par le protéasome. À l'inverse, en absence de la voie de signalisation Notch, CD25 n'est que faiblement exprimé, ce qui pourrait être responsable de la plus faible activation de la voie PI3K-Akt-mTOR. Ainsi, l'activité du FT FoxO1 est plus importante, ce qui lui permet d'induire l'expression des gènes EOMES, PD-1 et TCF1 tandis qu'il réprime l'expression de T-bet. Ainsi, en l'absence de Notch, on génère plus efficacement des LT CD8 folliculaires et des LT CD8 différenciés de façon terminale EOMES^{fort}PD-1^{fort} au détriment des progéniteurs T-bet^{fort}PD-1^{int} (Figure 22).

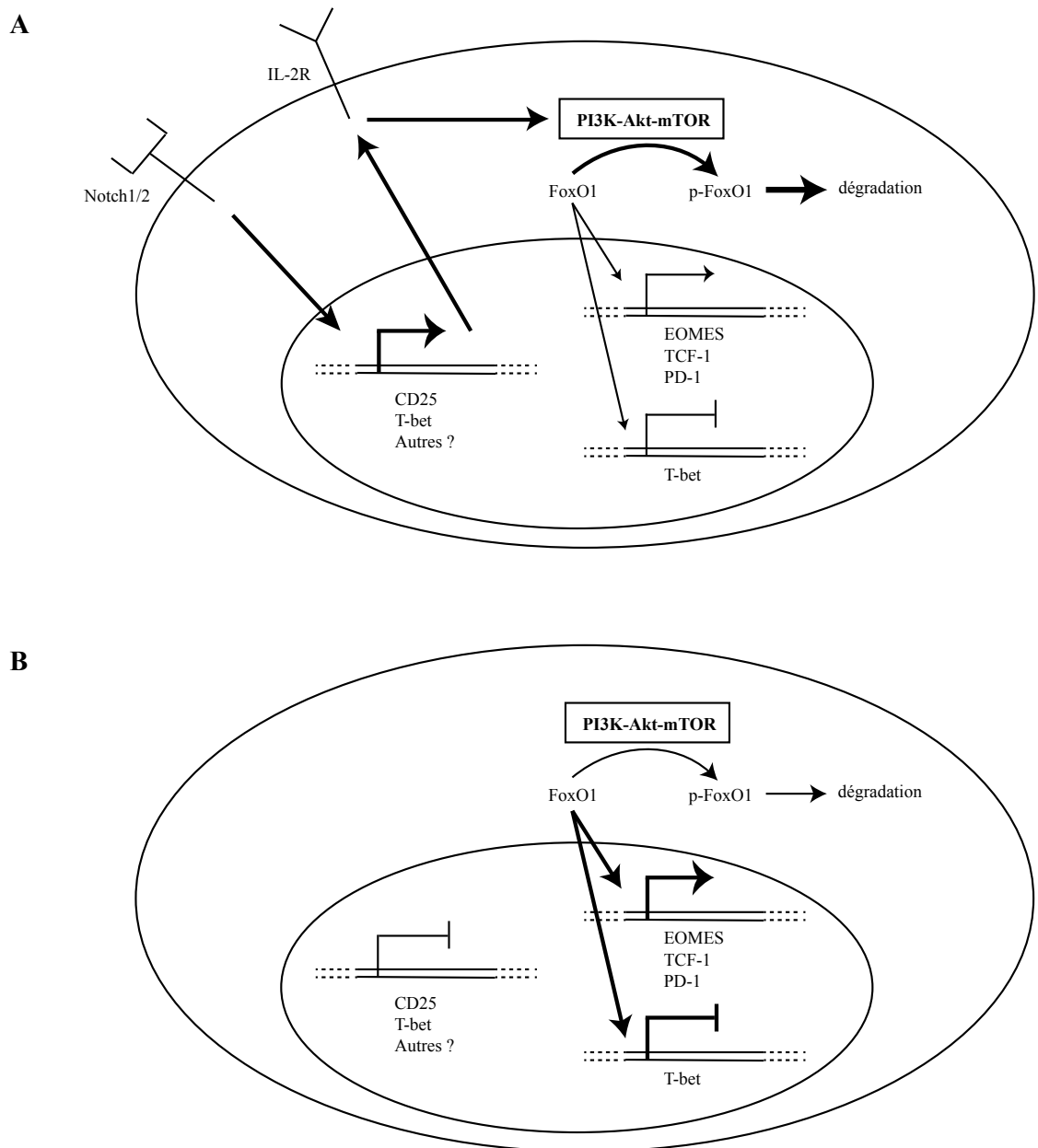


Figure 22. Modélisation du rôle de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 épuisés. A) Différenciation des LT CD8 épuisés en présence de la voie de signalisation Notch. L'engagement des récepteurs Notch1 ou Notch2 libère le NICD conduit à l'expression de la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2 et de T-bet. La voie de l'IL-2 induit fortement l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR. Cette voie phosphoryle le FT FoxO1 qui est alors dégradé par le protéasome. B) En absence de la voie de signalisation Notch, CD25 n'est que très peu exprimée conduisant à une faible activation

de la voie PI3K-Akt-mTOR. Akt étant peu activée, elle ne peut réaliser la phosphorylation de FoxO1. Celui-ci peut alors migrer au noyau où il peut activer la transcription de EOMES, TCF-1 et PD-1 tandis qu'il peut réprimer l'expression de T-bet.

3.2.5 La délétion génétique des récepteurs Notch ne permet pas de restaurer la fonctionnalité des LT CD8 suite à une immunothérapie bloquant la voie PD-1

Il était déjà connu que seules certaines sous-populations de LT épuisés, telles que les progéniteurs (T-bet^{fort}PD-1^{int}) définis par l'équipe de E. John Wherry et les LT CD8 folliculaires, pouvaient être revigorées par un traitement bloquant la voie PD-1^{246,249,356,359}. Or, la voie de signalisation Notch contrôle la différenciation de ces deux sous-populations, notamment en favorisant la génération de progéniteurs tandis qu'elle restreint la génération de cellules T CD8 folliculaires. De façon intéressante, nous avons démontré que l'absence de la voie de signalisation ne permettait pas de restaurer la fonctionnalité des LT CD8 suite à un traitement bloquant la voie de PD-1 et ce, malgré une plus forte proportion de LT CD8 folliculaires. Ce résultat est intrigant, car il a été démontré que la prolifération induite par un blocage de la voie PD-1 est dépendante de l'expression de TCF-1^{249,362}. Il est possible que la déficience de Notch favorise une proportion plus importante de cellules T CD8 folliculaires différenciées de façon aberrante ayant perdu certaines caractéristiques qui leur sont propres. Cependant, étant donné que la voie de signalisation Notch contrôle directement l'expression de molécules effectrices des LT CD8 (Perforine, GrzmB, IFN- γ , etc...), il est possible que la restauration de leur fonctionnalité nécessite l'activation de la voie de signalisation Notch. Néanmoins, bloquer la voie de signalisation Notch simultanément au traitement de la voie PD-1 ne semble pas empêcher de restaurer la fonctionnalité des cellules T CD8, suggérant que cette voie de signalisation est requise précocement pour permettre la restauration de la fonctionnalité des LT CD8.

3.2.6 La voie de signalisation Notch et son implication dans l'épuisement des LT CD8 lors d'un cancer

Nos résultats suggèrent un rôle important de la voie de signalisation Notch dans la lutte de l'épuisement des LT CD8 suite à une infection chronique. Or, plusieurs études démontrent un rôle similaire de la voie Notch dans le cas de cancer. En effet, il a été démontré que la présence de cancer chez le patient ou chez la souris conduit à une diminution de l'expression des ligands DLL1 et DLL4 dans la moelle osseuse⁶²⁷. Cette diminution d'expression à la surface des cellules hématopoïétiques est la conséquence de la forte concentration de VEGF produite par les tumeurs. Les auteurs ont montré que cela avait un impact important sur la réponse lymphocytaire CD8 puisque la surexpression du ligand DLL1 dans les précurseurs de cellules de moelle osseuse conduit à une meilleure fonction des cellules T et à une diminution importante de la croissance tumorale⁶²⁷. De plus, l'activation de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 par la transduction du NICD1 ou par l'injection de ligand DLL1 sous forme oligomérisés ou enfin par le traitement avec du bortézomib conduit dans tous les cas à une plus forte expression de CD25, une plus forte production de cytokines et de molécules effectrices (IFN- γ , GrzmB, perforine), ce qui corrèle avec une meilleure capacité cytolytique et une diminution importante de la croissance tumorale⁶²⁸⁻⁶³⁰. Parallèlement à cela, l'activation de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 augmente l'expression des FT T-bet et EOMES, ce qui pourrait affecter leur différenciation bien que cette question n'ait pas été adressée lors de cancer^{629,630}. Enfin, il a été démontré qu'activer la voie Notch permet de contrer les effets immunosuppresseurs induits par le TGF- β ⁶³⁰. Tous ces résultats sont en accord avec ceux obtenus à la suite d'une infection chronique et suggèrent que l'activation de la voie Notch dans les LT CD8 lutte contre l'épuisement des LT CD8 en augmentant leur fonctionnalité.

3.2.7 Modèle du rôle de la voie Notch dans l'épuisement des LT CD8

La voie de signalisation Notch semble contrôler différents aspects de la réponse lymphocytaire CD8 suite à une infection chronique. Nous proposons qu'en plus de son rôle direct dans l'expression de T-bet, l'absence de la voie Notch induit une plus faible activation de

la voie PI3K-Akt-mTOR conduisant à une plus forte activité du FT FoxO1. Ce dernier serait alors responsable de la répression transcriptionnelle de T-bet tandis qu'il induit l'expression des FT TCF-1 et EOMES et du RI PD-1. Ainsi, la différenciation des LT CD8 déficients pour Notch favoriserait la génération de cellules T différenciées de façon terminale et des LT CD8 folliculaires au détriment de la sous-population de progéniteur. Ce modèle est en accord avec le fait que l'absence de Notch dans les LT CD8 épuisés induit un important défaut d'expression de la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2, CD25 (résultat non montré). Or, cette voie, comme celles de plusieurs cytokines dans les LT CD8, permet l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR⁶³¹. Il est aussi possible que d'autres voies capables d'activer la voie PI3K-Akt-mTOR soient affectées en l'absence de Notch.

3.2.8 Perspectives

3.2.8.1 Le rôle de la voie de signalisation Notch dans l'expansion clonale

Nous avons démontré que l'expansion clonale est plus importante en absence de la voie de signalisation Notch. Cela pourrait être la conséquence d'une plus forte prolifération ou encore d'une meilleure survie des LT CD8^{ΔΔ}. Ainsi, il serait intéressant d'analyser la prolifération de ces derniers par l'utilisation de bromodésoxyuridine (BrdU). Nous avons déjà réalisé un marquage de la protéine Ki67 qui identifie les cellules dans les phases G1, S, G2 et M à différents temps post-infection (résultats non publiés). De façon surprenante, la proportion de cellules positives pour le marquage Ki67 est plus faible dans les LT CD8^{ΔΔ} à jour 8 post-infection alors qu'elle est similaire aux LT CD8 fl/fl à jour 15 et jour 30. Ce résultat suggère qu'en absence de Notch, une plus faible proportion de LTe prolifère, ce qui suggère que la voie Notch contrôlerait la survie de ces derniers puisqu'ils sont plus nombreux tout au long de l'infection. La survie des LT CD8 sera évaluée à l'aide de marquage de l'annexine V et 7-aminoactinomycin D (7-AAD) qui identifie les cellules en apoptose et en nécrose respectivement. Cela nous permettra de comprendre par quel mécanisme la voie Notch agit pour freiner l'expansion clonale.

3.2.8.2 Le rôle de la voie Notch dans l'expression des récepteurs inhibiteurs

Nous avons démontré qu'en absence de la voie de signalisation Notch, les LT CD8 épuisés expriment de plus forts niveaux d'expression des RI PD-1 et Lag-3, ce qui pourrait être à l'origine de l'épuisement plus sévère de ces derniers. De plus, ce phénotype s'accompagne d'une diminution de l'expression du facteur de transcription T-bet, lequel est connu pour réprimer l'expression de PD-1. De surcroît, il est connu que Notch contrôle directement l'expression de T-bet dans les cellules T^{515,545,569}. Ainsi, l'absence de la voie de signalisation Notch ne permettrait pas l'expression optimale de T-bet, conduisant à une dérégulation de l'expression de PD-1, ce qui pourrait être la cause d'un épuisement plus sévère des LT CD8. Il serait donc intéressant de restaurer l'expression du facteur de transcription T-bet dans les LT CD8 déficients pour la voie de signalisation Notch pour évaluer le rôle de la plus faible expression de T-bet sur l'expression de PD-1 et d'évaluer son impacte global dans l'épuisement des LT CD8 déficients pour la voie de signalisation Notch.

Étant donné que l'absence des récepteurs Notch1 et Notch2 corrèle avec une plus forte expression de récepteurs inhibiteurs conduisant à un état d'épuisement plus important des LT CD8, il serait intéressant de surexprimer le NICD dans des cellules T sauvages pour déterminer si cela prévient l'épuisement des cellules T CD8. Nous souhaiterions aussi évaluer le potentiel thérapeutique de l'activation de la voie de signalisation Notch suite à l'injection de la molécule méthylhèmeanthidine chloride (NMHC) ou suite à l'injection de ligands DLL1 oligomérisés ou encore par le traitement des souris avec le bortézomib^{629,630,632}. La molécule NMHC a été découverte comme inhibant la croissance tumorale de la leucémie myéloïde aiguë en activant la voie de signalisation Notch. En effet, cette molécule se lie à Notch1 dans le domaine NRR et il est supposé que cette interaction a les mêmes effets que les mutations induisant l'activation constitutive de la voie Notch⁶³². Le bortézomib est un antinéoplasique utilisé dans le traitement contre le cancer et il a été découvert que cette molécule favorise l'activation de la voie de signalisation Notch, notamment dans les LT CD8 bien que le mécanisme permettant cela n'est pas encore compris⁶³⁰.

3.2.8.3 Rôle de la voie Notch dans la différenciation des LT CD8 épuisés

La déficience de la voie de signalisation Notch favorise la différenciation de LT CD8 TCF-1⁺ folliculaires. Cependant, les LT CD8 folliculaires ont pour caractéristique d'avoir gardé une partie de leur fonctionnalité, mais ont aussi la capacité d'être revigorés suite à une immunothérapie ciblant la voie PD-1. Or, ce n'est pas le cas des LT CD8^{ΔΔ} folliculaires. C'est pourquoi il sera intéressant d'analyser plus en profondeur les phénotypes des LT CD8 folliculaires déficients pour la voie Notch et de les comparer avec ce qui est connu dans la littérature afin de s'assurer que les LT CD8^{ΔΔ} exprimant fortement TCF-1 sont bien des LT CD8 folliculaires. Analyser leur localisation dans les organes lymphoïdes secondaires serait intéressant pour s'assurer que ces derniers sont bien présents dans les follicules B bien que leur localisation précise dans l'OLS est encore controversée^{249,359,360}. Dans le but de tester l'hypothèse selon laquelle la voie Notch contrôle la différenciation des LT CD8 épuisés en contrôlant l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR, nous souhaitons dans un premier temps vérifier que cette dernière est bien plus faiblement activée dans les LT CD8 épuisés déficients pour Notch. Pour ce faire, nous réaliserons des marquages des formes totales et phosphorylées des protéines Akt, S6 et FoxO1. Si nous observons une plus faible activation de cette voie dans les LT CD8^{ΔΔ}, nous souhaiterions transduire les LT CD8 déficients pour Notch avec une forme constitutivement active de la protéine Akt⁶³³. Ainsi, si notre hypothèse est la bonne, nous nous attendons à restaurer la génération de progéniteurs (T-bet^{fort}PD-1^{int}) tandis que les LT CD8 folliculaires (TCF-1⁺) et cellules terminalement différenciées (EOMES^{fort}PD-1^{fort}) sont présentes en plus faibles proportions suite à la surexpression de la forme constitutivement active d'Akt. Il sera aussi intéressant d'analyser l'effet de la surexpression de la forme constitutive d'Akt sur la fonctionnalité des LT CD8 déficients pour Notch (production de cytokines et analyse de la charge virale) 30 jours post-infection.

Il sera aussi intéressant de trier les LT CD8 folliculaires déficients pour Notch à un stade avancé (>40 jours) de l'infection pour les transférer dans des souris infectées depuis 40 jours dans le but d'évaluer si la déficience de la voie Notch empêche ces cellules de proliférer comme elles le devraient, mais aussi pour tester leur fonctionnalité avec ou sans immunothérapie^{249,359,362}. Pour ce faire, nous utiliserons les marqueurs de surface KLRG1 et Slamf6 pour discriminer les cellules CD8 folliculaires (KLRG1⁺Slamf6^{fort}) des cellules

différenciées de façon terminale (KLRG1⁺Slamf6^{int})^{249,359,360}. Enfin, cette expérience nous permettra de valider l'hypothèse selon laquelle la voie de signalisation est requise pour la différenciation des LT CD8 folliculaires en LT CD8 épuisés de façon terminale (TCF-1⁻Slamf6^{int}). En plus de cette expérience, pour confirmer le rôle éventuel de la voie Notch dans la différenciation des LT CD8 folliculaires (TCF-1⁺) en LT CD8 différenciés de façon terminale (TCF-1⁻), nous bloquerons la voie Notch avec des anticorps bloquant dans les souris allant recevoir les cellules les LT CD8 folliculaires de type sauvages pour voir si cela empêche la différenciation en cellules T différenciées de façon terminale (TCF-1⁻).

3.2.8.4 La voie de signalisation Notch et l'épuisement des LT CD8

Les mécanismes moléculaires conduisant à un épuisement plus sévère des LT CD8 en absence de la voie de signalisation ne sont pas encore compris et peuvent être multiples. Tester la surexpression de T-bet à lui seul ne permettrait sûrement pas d'expliquer tous les phénotypes observés en absence de la voie Notch. Ainsi, il serait intéressant d'identifier toutes les cibles transcriptionnelles de la voie de signalisation Notch, ce qui nous permettrait de découvrir le programme transcriptionnel induit par Notch dans les LT CD8 épuisés, mais aussi de découvrir des voies connues pour influencer l'épuisement des LT CD8. La manipulation de ces voies, notamment le blocage ou la suractivation de celles-ci, nous permettra d'évaluer le rôle de chacune dans l'établissement de l'épuisement plus sévère des LT CD8 en absence de Notch. Cette expérience permettra d'identifier toutes les voies contrôlées par Notch et connues pour activer la voie PI3K-Akt-mTOR. Il sera ainsi possible de comprendre comment la voie de signalisation Notch contrôle et lutte contre l'épuisement des LT CD8, ce qui permettra peut-être le développement de stratégies thérapeutiques visant à réduire l'épuisement des LT.

3.2.8.5 Modalité d'activation de la voie de signalisation Notch

Nous ne savons que peu de choses sur les modalités d'activation de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 épuisés. Nous savons que les récepteurs Notch1 et Notch2 sont les seuls récepteurs de la voie à être exprimés dans les LT CD8^{473,526,527,567}. L'utilisation d'anticorps bloquants les ligands DLL1 et DLL4 simultanément permet de récapituler les effets

observés en absence des récepteurs Notch1 et Notch2, ce qui suggère qu'ils sont majoritairement responsables d'induire la voie de signalisation au sein des LT CD8 épuisés. Il serait intéressant de savoir si c'est la voie canonique de Notch qui est requise dans les LT CD8. Pour évaluer le rôle de l'association de Notch avec RBJk au promoteur de gènes cibles afin d'induire leur expression, nous utiliserons des souris exprimant une forme négative dominante de la protéine MAML1. Nous souhaiterions aussi identifier quelles sont les cellules qui expriment les ligands de Notch et qui sont responsables de l'activation de la voie. Pour ce faire, nous allons dans un premier temps réaliser des chimères hématopoïétiques dans des souris sauvages ayant été irradiées à des doses létales avec de la moelle osseuse de souris déficientes pour les ligands DLL1 DLL4. Cela nous permettra d'évaluer le rôle des cellules hématopoïétiques, telles que les CPA, dans l'activation de la voie Notch dans les LT CD8. Enfin, il serait intéressant d'utiliser des souris, dont certains exons de DLL1 et DLL4 seraient flanqués de séquence loxp et qui exprimeraient la recombinaison Cre sous le contrôle du promoteur contrôlant l'expression de CCL-19⁶³⁴. Ainsi, il serait possible de savoir si ce sont les mêmes cellules qui permettent l'activation de la voie Notch dans les LT CD8 suite à une maladie du greffon contre l'hôte ou suite à une infection chronique.

Nous avons démontré que la voie Notch semble continuellement active dans les LT CD8 épuisés. Seulement, nous avons aussi observé que le blocage de la voie Notch, simultanément à un traitement bloquant PD-1, n'empêche pas de restaurer la fonctionnalité des LT CD8. Cela pose la question du moment où il est important de recevoir le signal Notch pour permettre de restaurer la fonctionnalité des CD8 suite à une immunothérapie. Ainsi, il serait intéressant de bloquer la voie Notch au stade aigu de l'infection (de jour 0 à jour 8), puis de traiter les souris plus tard avec un anticorps bloquant PD-L1 pour déterminer si la voie Notch est requise précocement pour permettre de revigorer les LT CD8.

3.2.9 Inter-relation entre les rôles de la voie Notch suite à une infection aiguë ou chronique

Notre laboratoire a découvert des rôles essentiels et opposés de la voie de signalisation Notch lors de la réponse lymphocytaire CD8 selon le type d'infection aiguë ou chronique. Cette

voie est en effet indispensable à la génération de LT CD8 différenciés de façon terminale (SLEC) suite à une infection aiguë tandis que son activation permet la génération des progéniteurs (T-bet^{fort}PD-1^{int}) et lutte contre l'épuisement terminal des cellules T suite à une infection chronique. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la voie de signalisation Notch est activée que de façon transitoire lors d'une réponse lymphocytaire aiguë tandis que la persistance de l'antigène et de l'inflammation semble contribuer à une activation continue de la voie lors d'une réponse chronique⁵⁵⁷. Ainsi, nous savons que lors d'une réponse aiguë, celle-ci n'est active que durant les 3 premiers jours suivant l'activation pour induire le programme transcriptionnel spécifique des SLEC notamment et permettre l'adaptation du métabolisme. Au contraire, lors d'une infection chronique, la voie semble être active tout au long de la réponse pour lutter contre l'épuisement des cellules T. Dans les deux cas, la voie Notch sensibilise les cellules au signal induit par l'IL-2 en contrôlant l'expression de CD25. Cependant, il est probable que Notch affecte d'autres voies de signalisation qui pourraient notamment affecter l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR suite à une infection chronique ou aiguë. Or, lors d'une infection aiguë, la voie PI3K-Akt-mTOR au stade effecteur permettrait l'adaptation du métabolisme, favorisant la génération de SLEC tandis qu'une activation soutenue de cette voie lors d'une infection chronique permettrait une meilleure expression de T-bet qui corrèlerait avec une plus faible expression d'EOMES et PD-1, favorisant ainsi la génération de progéniteurs capables d'être revigorés suite à un traitement par des immunothérapies bloquant les récepteurs inhibiteurs.

3.3 Applications thérapeutiques chez l'humain

3.3.1 Contexte d'une réponse immunitaire aiguë

Notre laboratoire a découvert un rôle essentiel de la voie de signalisation Notch dans la différenciation des LT CD8 lors d'une réponse immunitaire aiguë ou chronique. Suite à une vaccination à l'aide de cellules dendritiques chargées avec le peptide OVA (SIINFEKL) ou suite à une infection par Lm-OVA, les LT CD8 déficients pour la voie Notch produisent moins des cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2 par rapport à des LT sauvages. Par ailleurs, la déficience de Notch impacte profondément la différenciation des LT CD8. L'absence de Notch empêche la génération de SLEC et favorise au contraire la génération de EEC et de MPEC.

Ainsi, il serait important de vérifier que tous ces résultats s'appliquent chez l'humain. Cela semble être le cas en ce qui concerne le rôle de la voie de signalisation Notch dans l'acquisition des fonctions effectrices⁵²⁸. Dans le cas de la vaccination, où l'inflammation induite est relativement faible, il serait nécessaire de s'assurer que le mode de vaccination permet l'activation de la voie de signalisation. Si ce n'est pas le cas, il serait intéressant de forcer l'activation de la voie de signalisation Notch afin de s'assurer de générer des LT CD8 pleinement fonctionnels capables de produire et sécréter des cytokines. De la même façon, il serait peut-être intéressant de forcer l'activation de la voie de signalisation Notch lors de l'activation des LT CD8 dans les protocoles de transfert adoptif de LT CD8 éduqué pour reconnaître les cellules tumorales des patients. Cependant, il faudra s'assurer que ce traitement ne conduise pas à la différenciation terminale des cellules. Étant donné que la fenêtre d'activation de la voie Notch lors d'une réponse T aiguë semble être très précoce⁵⁶⁸, il est possible d'utiliser la molécule N-méthylhèmeanthidine chlorure (NMHC), connu pour activer la voie de signalisation Notch, ou encore d'utiliser le ligand DLL1 sous forme de multimères, dans la culture utilisée pour activer les LT CD8 avant leur injection aux patients^{635,636}. À l'inverse, dans le cas de pathologies induites par l'activité des LT CD8, il serait bénéfique de bloquer l'activation de la voie de signalisation Notch. En effet, le blocage de la voie Notch apparaît comme étant très intéressant dans le cas de la maladie du greffon contre l'hôte. Le blocage de la voie Notch dans le cas d'une greffe de moelle osseuse d'une souris B6 dans une souris BALB/c conduit à une plus faible production d'IFN- γ et d'IL-2 par les LT CD8 répondants ce qui, non seulement empêche l'apparition de GVHD tout en permettant l'élimination de cellules leucémiques⁵³². Ainsi, dans le cas de pathologies induites par l'activité des LT CD8, comme c'est le cas dans certaines maladies auto-immunes par exemple, le blocage de la voie de signalisation semble être intéressant. Pour ce faire, il est possible d'injecter des anticorps humanisés bloquants soit les récepteurs, soit les ligands, seul ou en combinaison. Étant donné que l'absence de la voie Notch favorise une différenciation des LTe en EEC et MPEC, il serait intéressant d'analyser l'effet du blocage total ou partiel de la voie dans les LT CD8 humains afin de déterminer s'il est possible d'obtenir de grande quantité de LTm fonctionnelle et à longue durée de vie.

3.3.2 Contexte d'une réponse immunitaire chronique

Lors d'une infection chronique, la voie de signalisation est constitutivement active et lutte contre l'épuisement des LT CD8. En effet, son absence induit une plus forte expression des récepteurs inhibiteurs PD-1 et Lag-3 qui corrèle avec une plus faible expression de cytokines et de granzyme B. Cela a des conséquences fonctionnelles importantes puisque les souris dont les LT CD8 sont déficients pour Notch ne parviennent pas à contrôler la charge virale à des temps tardifs (Jour 30 et plus post-infection). Par ailleurs, l'absence de Notch favorise la différenciation terminale des LT CD8 au détriment de la sous-population de progéniteur. En revanche, l'absence de Notch favorise aussi la différenciation des LT CD8 folliculaires. Ces derniers sont décrits comme étant la sous population de LT CD8 épuisés capables de proliférer et ce faisant de renouveler les populations de cellules T terminalement différenciées^{249,361,362}. C'est aussi la seule sous population capable de proliférer suite à une immunothérapie bloquant PD-L1. Toutefois, l'immunothérapie bloquant le ligand de PD-1 ne permet pas d'observer une prolifération des LT CD8 déficients pour Notch suggérant qu'en absence de Notch, les LT CD8 folliculaires ont perdu leurs capacités prolifératives.

Conclusion

La réponse lymphocytaire permet la protection de l'organisme contre les cancers et les infections. Les LTe sont responsables d'éliminer l'agent infectieux ou les cellules tumorales alors que les LTm permettent la protection à long terme de l'organisme contre une réinfection par le même pathogène ou lors d'une rechute dans le cas de cancer. La manipulation du système immunitaire permet déjà la protection d'individus contre certaines infections et certains cancers. Notamment, la vaccination permet de sauver des millions de vies par an tandis que les premiers essais de thérapies cellulaires contre le cancer donnent des résultats prometteurs. Cependant, mieux comprendre les mécanismes moléculaires dirigeant la différenciation des LT CD8 permettrait d'améliorer les stratégies de vaccination et celles des thérapies cellulaires pour favoriser la formation de LTm fonctionnels et à longue durée de vie. Or, notre laboratoire a découvert un rôle essentiel de la voie de signalisation Notch dans les événements de différenciation des LT CD8 périphériques.

À la suite d'une infection aiguë, nous avons découvert que la voie de signalisation Notch contrôle la fonctionnalité des LT CD8 de paires avec d'autres signaux inflammatoires. En effet, lors d'une immunisation avec des cellules dendritiques chargées avec un peptide antigénique, la voie de signalisation Notch est particulièrement importante pour induire l'expression de cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2. Cette diminution de production de cytokines a des effets sur la fonctionnalité des LT CD8 puisque ces derniers sont moins efficaces pour l'élimination de Lm. En revanche, lors d'une infection, l'inflammation générée par cette dernière permet de compenser l'absence de la voie Notch pour induire l'expression de cytokines. Nous avons aussi découvert que la voie de signalisation Notch est essentielle à la génération des LT CD8 différenciés de façon terminale (SLEC) suite à une réponse lymphocytaire aiguë. En effet, l'absence de la voie Notch empêche la génération de SLEC suite à une vaccination ou une infection révélant un rôle encore complètement inconnu auparavant. Enfin, l'absence de la voie de signalisation Notch n'empêche pas la génération de LTm, cependant la fonctionnalité de ces derniers sera affectée et en particulier la capacité de produire de l'IFN- γ suite à une restimulation antigénique. Ainsi, activer la voie de signalisation Notch pourrait permettre de favoriser l'activation de LT CD8 hautement fonctionnels capables de générer des LTm, ce qui serait bénéfique dans le cadre de la vaccination ou lors de transfert adoptif de LT activés dans le cadre d'une thérapie cellulaire dirigée contre une tumeur. Au contraire, il est envisageable de bloquer

la voie de signalisation Notch dans le cas de maladie auto-immune pour diminuer la physiopathologie induite par l'activation des LT CD8.

De la même manière, nous avons découvert un rôle essentiel de la voie de signalisation Notch dans les LT CD8 répondant à une infection chronique. Cette voie lutte en effet contre l'état d'épuisement induit par la persistance antigénique et la persistance de l'inflammation. Son absence corrèle avec une perte plus importante des fonctions effectrices des LT CD8 conduisant à une perte de contrôle de la virémie à des stades tardifs de la maladie. De plus, cette voie contrôle la différenciation des LT CD8 épuisés en favorisant la différenciation des progéniteurs tandis qu'elle limite la génération de LT CD8 folliculaires. Ces résultats suggèrent qu'activer la voie de signalisation Notch lors d'infection chronique permettrait de lutter contre l'épuisement des LT CD8 ce qui pourrait améliorer le contrôle de la charge infectieuse ou la croissance tumorale dans le cas de cancer.

Bibliographie

1. Obar, J. J., Khanna, K. M. & Lefrançois, L. Endogenous naive CD8⁺ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* **28**, 859–869 (2008).
2. Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H. K. W., Hasan, M. & Albert, M. L. Enumeration of human antigen-specific naive CD8⁺ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* **115**, 3718–3725 (2010).
3. Blattman, J. N. *et al.* Estimating the Precursor Frequency of Naive Antigen-specific CD8 T Cells. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 657–664 (2002).
4. Van Braeckel-Budimir, N. *et al.* A T Cell Receptor Locus Harbors a Malaria-Specific Immune Response Gene. *Immunity* **47**, 835–847.e4 (2017).
5. Cantrell, D. A. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* **105**, 369–374 (2002).
6. Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P. & Samelson, L. E. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**, 83–92 (1998).
7. Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E. & Weiss, A. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**, 617–626 (1998).
8. Paz, P. E. *et al.* Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem. J.* **356**, 461–471 (2001).
9. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 591–619 (2009).
10. Purbhoo, M. A. *et al.* Dynamics of subsynaptic vesicles and surface microclusters at the immunological synapse. *Science Signaling* **3**, ra36–ra36 (2010).
11. Saito, T. & Yokosuka, T. Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells. *Current Opinion in Immunology* **18**, 305–313 (2006).
12. Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T. & Dustin, M. L. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* **25**, 117–127 (2006).
13. Yokosuka, T. *et al.* Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nature Immunology* **6**, 1253–1262 (2005).
14. Dustin, M. L. Stop and go traffic to tune T cell responses. *Immunity* **21**, 305–314 (2004).

15. Lillemeier, B. F. *et al.* TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation. *Nature Publishing Group* **11**, 90–96 (2010).
16. Fooksman, D. R. *et al.* Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 79–105 (2010).
17. Smith, A. *et al.* A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol* **170**, 141–151 (2005).
18. Kaizuka, Y., Douglass, A. D., Varma, R., Dustin, M. L. & Vale, R. D. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 20296–20301 (2007).
19. Cochran, J. R., Cameron, T. O. & Stern, L. J. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity* **12**, 241–250 (2000).
20. D'Oro, U. & Ashwell, J. D. Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J Immunol* **162**, 1879–1883 (1999).
21. Dustin, M. L. Making a little affinity go a long way: a topological view of LFA-1 regulation. *Cell Adhes. Commun.* **6**, 255–262 (1998).
22. Huppa, J. B. & Davis, M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology* **3**, 973–983 (2003).
23. Lafferty, K. J. & Woolnough, J. The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunol. Rev.* **35**, 231–262 (1977).
24. Mueller, D. L., Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 445–480 (1989).
25. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334 (2003).
26. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology* **13**, 227–242 (2013).
27. Tuosto, L. & Acuto, O. CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement. *European Journal of Immunology* **28**, 2131–2142 (1998).
28. Howland, K. C., Ausubel, L. J., London, C. A. & Abbas, A. K. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *J Immunol* **164**, 4465–4470 (2000).
29. Sperling, A. I. *et al.* CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J Immunol* **157**, 3909–3917 (1996).
30. Frauwirth, K. A. *et al.* The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* **16**, 769–777 (2002).

31. Janardhan, S. V., Praveen, K., Marks, R. & Gajewski, T. F. Evidence implicating the Ras pathway in multiple CD28 costimulatory functions in CD4+ T cells. *PLoS ONE* **6**, e24931 (2011).
32. Croft, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature Reviews Immunology* **9**, 271–285 (2009).
33. Cox, M. A., Harrington, L. E. & Zajac, A. J. Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends Immunol.* **32**, 180–186 (2011).
34. Cui, W., Joshi, N. S., Jiang, A. & Kaech, S. M. Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. *Vaccine* **27**, 2177–2187 (2009).
35. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. **22**, 333–340 (2010).
36. Schmidt, C. S. & Mescher, M. F. Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* **163**, 2561–2567 (1999).
37. Schmidt, C. S. & Mescher, M. F. Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. *J Immunol* **168**, 5521–5529 (2002).
38. Pearce, E. L. & Shen, H. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J Immunol* **179**, 2074–2081 (2007).
39. Welsh, R. M., Bahl, K., Marshall, H. D. & Urban, S. L. Type 1 interferons and antiviral CD8 T-cell responses. *PLoS Pathog* **8**, e1002352 (2012).
40. Curtsinger, J. M. *et al.* Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **162**, 3256–3262 (1999).
41. Starbeck-Miller, G. R., Xue, H.-H. & Harty, J. T. IL-12 and type I interferon prolong the division of activated CD8 T cells by maintaining high-affinity IL-2 signaling in vivo. *J. Exp. Med.* **211**, 105–120 (2014).
42. Vignali, D. A. A. & Kuchroo, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Publishing Group* **13**, 722–728 (2012).
43. Li, Q., Eppolito, C., Odunsi, K. & Shrikant, P. A. IL-12-Programmed Long-Term CD8+ T Cell Responses Require STAT4. *J Immunol* **177**, 7618–7625 (2006).
44. Samuel, C. E. Antiviral Actions of Interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 778–809 (2001).
45. González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M. & Raz, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews Immunology* **12**, 125 (2012).
46. Keppler, S. J., Rosenits, K., Koegl, T., Vucikujja, S. & Aichele, P. Signal 3 cytokines as modulators of primary immune responses during infections: the interplay of type I IFN and IL-12 in CD8 T cell responses. *PLoS ONE* **7**, e40865 (2012).

47. Keppler, S. J., Theil, K., Vucikujja, S. & Aichele, P. Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: Role of direct IL-12 signals for cell fate decision of CD8(+) T cells. *European Journal of Immunology* **39**, 1774–1783 (2009).
48. Xiao, Z., Casey, K. A., Jameson, S. C., Curtsinger, J. M. & Mescher, M. F. Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *J Immunol* **182**, 2786–2794 (2009).
49. Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D. & Mescher, M. F. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* **174**, 4465–4469 (2005).
50. Aichele, P. *et al.* Cutting Edge: CD8 T Cells Specific for Lymphocytic Choriomeningitis Virus Require Type I IFN Receptor for Clonal Expansion. *J Immunol* **176**, 4525–4529 (2006).
51. Kolumam, G. A., Thomas, S., Thompson, L. J., Sprent, J. & Murali-Krishna, K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 637–650 (2005).
52. Sercan, O., Hämmerling, G. J., Arnold, B. & Schüler, T. Cutting Edge: Innate Immune Cells Contribute to the IFN- γ -Dependent Regulation of Antigen-Specific CD8+ T Cell Homeostasis. *J Immunol* **176**, 735–739 (2006).
53. Whitmire, J. K., Tan, J. T. & Whitton, J. L. Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *Journal of Experimental Medicine* **201**, 1053–1059 (2005).
54. McGill, J., van Rooijen, N. & Legge, K. L. IL-15 trans-presentation by pulmonary dendritic cells promotes effector CD8 T cell survival during influenza virus infection. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 521–534 (2010).
55. Sanjabi, S., Mosaheb, M. M. & Flavell, R. A. Opposing Effects of TGF- β and IL-15 Cytokines Control the Number of Short-Lived Effector CD8+ T Cells. *Immunity* **31**, 131–144 (2009).
56. Rückert, R. *et al.* Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses. *European Journal of Immunology* **33**, 3493–3503 (2003).
57. Novy, P. & Yang, Y. Intrinsic IL-21 signaling is critical for CD8 T cell memory formation in response to Vaccinia viral infection (50.32). (2010).
58. Battaglia, A. *et al.* Interleukin-21 (IL-21) synergizes with IL-2 to enhance T-cell receptor-induced human T-cell proliferation and counteracts IL-2/transforming growth factor- β -induced regulatory T-cell development. *Immunology* **139**, 109–120 (2013).

59. Casey, K. A. & Mescher, M. F. IL-21 Promotes Differentiation of Naive CD8 T Cells to a Unique Effector Phenotype. *J Immunol* **178**, 7640–7648 (2007).
60. Sarkar, S. *et al.* Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 625–640 (2008).
61. Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. Molecular and Functional Profiling of Memory CD8 T Cell Differentiation. *Cell* **111**, 837–851 (2002).
62. Badovinac, V. P., Haring, J. S. & Harty, J. T. Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection. *Immunity* **26**, 827–841 (2007).
63. Kaech, S. M., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* **2**, 251–262 (2002).
64. Benechet, A. P. *et al.* T cell-intrinsic S1PR1 regulates endogenous effector T-cell egress dynamics from lymph nodes during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 2182–2187 (2016).
65. Groom, J. R. & Luster, A. D. CXCR3 in T cell function. *Exp. Cell Res.* **317**, 620–631 (2011).
66. Hickman, H. D. *et al.* CXCR3 chemokine receptor enables local CD8(+) T cell migration for the destruction of virus-infected cells. *Immunity* **42**, 524–537 (2015).
67. Zhang, N. & Bevan, M. J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* **35**, 161–168 (2011).
68. Cox, M. A., Kahan, S. M. & Zajac, A. J. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology* **435**, 157–169 (2013).
69. Obar, J. J. *et al.* Pathogen-Induced Inflammatory Environment Controls Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation. *J Immunol* **187**, 4967–4978 (2011).
70. 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. *Nature Immunology* **4**, 1191–1198 (2003).
71. Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. & Lefrançois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature Immunology* **1**, 426–432 (2000).
72. Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8. *Nature Reviews Immunology* **12**, 749–761 (2012).
73. Chi, H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nature Reviews Immunology* **12**, 325 (2012).
74. Pearce, E. L. Metabolism in T cell activation and differentiation. *Current Opinion in Immunology* **22**, 314–320 (2010).

75. Michalek, R. D. & Rathmell, J. C. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol. Rev.* **236**, 190–202 (2010).
76. Araki, K. *et al.* mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* **460**, 108–112 (2009).
77. Intlekofer, A. M. *et al.* Anomalous type 17 response to viral infection by CD8⁺ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* **321**, 408–411 (2008).
78. Pearce, E. L. *et al.* Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* **460**, 103–107 (2009).
79. Sinclair, L. V. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nature Publishing Group* **9**, 513 (2008).
80. van der Windt, G. J. W. & Pearce, E. L. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol. Rev.* **249**, 27–42 (2012).
81. Badovinac, V. P., Porter, B. B. & Harty, J. T. CD8⁺ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature Immunology* **5**, 809–817 (2004).
82. Prlic, M. & Bevan, M. J. Exploring regulatory mechanisms of CD8⁺ T cell contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 16689–16694 (2008).
83. Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675–1687 (1998).
84. Krammer, P. H., Arnold, R. & Lavrik, I. N. Life and death in peripheral T cells. *Nature Reviews Immunology* **7**, 532–542 (2007).
85. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305–1308 (1998).
86. Schmitz, I. *et al.* An IL-2-Dependent Switch Between CD95 Signaling Pathways Sensitizes Primary Human T Cells Toward CD95-Mediated Activation-Induced Cell Death. *J Immunol* **171**, 2930–2936 (2003).
87. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
88. Cho, B. K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H. N. & Chen, J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 2976–2981 (1999).
89. Cerottini, J. C., Budd, R. C. & MacDonald, H. R. Phenotypic identification of memory cytolytic T lymphocytes in a subset of Lyt-2⁺ cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **532**, 68–75 (1988).
90. Budd, R. C., Cerottini, J. C. & MacDonald, H. R. Selectively increased production of interferon-gamma by subsets of Lyt-2⁺ and L3T4⁺ T cells identified by expression of Pgp-1. *J Immunol* **138**, 3583–3586 (1987).

91. Tabi, Z., Lynch, F., Ceredig, R., Allan, J. E. & Doherty, P. C. Virus-specific memory T cells are Pgp-1+ and can be selectively activated with phorbol ester and calcium ionophore. *Cell. Immunol.* **113**, 268–277 (1988).
92. Sanders, M. E. *et al.* Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J Immunol* **140**, 1401–1407 (1988).
93. Butterfield, K., Fathman, C. G. & Budd, R. C. A subset of memory CD4+ helper T lymphocytes identified by expression of Pgp-1. *Journal of Experimental Medicine* **169**, 1461–1466 (1989).
94. Mackay, C. R., Marston, W. L. & Dudler, L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *Journal of Experimental Medicine* **171**, 801–817 (1990).
95. Buckle, A. M. & Hogg, N. Human memory T cells express intercellular adhesion molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon-gamma. *European Journal of Immunology* **20**, 337–341 (1990).
96. Beverley, P. C. Functional analysis of human T cell subsets defined by CD45 isoform expression. *Semin. Immunol.* **4**, 35–41 (1992).
97. McFarland, H. I., Nahill, S. R., Maciaszek, J. W. & Welsh, R. M. CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. *J Immunol* **149**, 1326–1333 (1992).
98. Okumura, M. *et al.* Age-related accumulation of LFA-1high cells in a CD8+CD45RAhigh T cell population. *European Journal of Immunology* **23**, 1057–1063 (1993).
99. 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**, 591–599 (1998).
100. Walunas, T. L., Bruce, D. S., Dustin, L., Loh, D. Y. & Bluestone, J. A. Ly-6C is a marker of memory CD8+ T cells. *J Immunol* **155**, 1873–1883 (1995).
101. Curtsinger, J. M., Lins, D. C. & Mescher, M. F. CD8+ memory T cells (CD44high, Ly-6C+) are more sensitive than naive cells to (CD44low, Ly-6C-) to TCR/CD8 signaling in response to antigen. *J Immunol* **160**, 3236–3243 (1998).
102. Nolz, J. C. & Harty, J. T. IL-15 regulates memory CD8+ T cell O-glycan synthesis and affects trafficking. *J. Clin. Invest.* **124**, 1013–1026 (2014).
103. Wherry, E. J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature Immunology* **4**, 225–234 (2003).
104. Constant, S. *et al.* Are primed CD4+ T lymphocytes different from unprimed cells? *European Journal of Immunology* **24**, 1073–1079 (1994).

105. Kearney, E. R., Pape, K. A., Loh, D. Y. & Jenkins, M. K. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* **1**, 327–339 (1994).
106. Pihlgren, M., Dubois, P. M., Tomkowiak, M., Sjögren, T. & Marvel, J. Resting memory CD8⁺ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *Journal of Experimental Medicine* **184**, 2141–2151 (1996).
107. 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**, 2338–2346 (2000).
108. Beadling, C. & Slifka, M. K. Differential regulation of virus-specific T-cell effector functions following activation by peptide or innate cytokines. *Blood* **105**, 1179–1186 (2005).
109. Bachmann, M. F., Barner, M., Viola, A. & Kopf, M. Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *European Journal of Immunology* **29**, 291–299 (1999).
110. Zimmermann, C., Prévost-Blondel, A., Blaser, C. & Pircher, H. Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *European Journal of Immunology* **29**, 284–290 (1999).
111. Inaba, K., Metlay, J. P., Crowley, M. T., Witmer-Pack, M. & Steinman, R. M. Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int. Rev. Immunol.* **6**, 197–206 (1990).
112. Croft, M., Bradley, L. M. & Swain, S. L. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* **152**, 2675–2685 (1994).
113. Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A. & Rocha, B. Response of naïve and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature Immunology* **1**, 47–53 (2000).
114. Stout, R. D. & Suttles, J. T cells bearing the CD44^{hi} ‘memory’ phenotype display characteristics of activated cells in G1 stage of cell cycle. *Cell. Immunol.* **141**, 433–443 (1992).
115. Garcia, S., DiSanto, J. & Stockinger, B. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* **11**, 163–171 (1999).
116. Akondy, R. S. *et al.* Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination. *Nature* **552**, 362–367 (2017).
117. Raué, H.-P., Beadling, C., Haun, J. & Slifka, M. K. Cytokine-mediated programmed proliferation of virus-specific CD8(+) memory T cells. *Immunity* **38**, 131–139 (2013).
118. Soudja, S. M., Ruiz, A. L., Marie, J. C. & Lauvau, G. Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes

- independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity* **37**, 549–562 (2012).
119. Richer, M. J., Nolz, J. C. & Harty, J. T. Pathogen-specific inflammatory milieu tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. *Immunity* **38**, 140–152 (2013).
120. Richer, M. J. *et al.* Inflammatory IL-15 is required for optimal memory T cell responses. *J. Clin. Invest.* **125**, 3477–3490 (2015).
121. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
122. Masopust, D., Jiang, J., Shen, H. & Lefrancois, L. Direct analysis of the dynamics of the intestinal mucosa CD8 T cell response to systemic virus infection. *J Immunol* **166**, 2348–2356 (2001).
123. Obar, J. J. *et al.* CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 193–198 (2010).
124. Kalia, V. *et al.* Prolonged Interleukin-2R α Expression on Virus-Specific CD8+ T Cells Favors Terminal-Effector Differentiation In Vivo. *Immunity* **32**, 91–103 (2010).
125. Manjunath, N. *et al.* Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **108**, 871–878 (2001).
126. Sinclair, L. V. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nature Immunology* **9**, 513–521 (2008).
127. Williams, M. A., Tyznik, A. J. & Bevan, M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* **441**, 890–893 (2006).
128. Gebhardt, T. *et al.* Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nature Immunology* **10**, 524–530 (2009).
129. Wakim, L. M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W. R. & Carbone, F. R. Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* **319**, 198–202 (2008).
130. Masopust, D. *et al.* Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 553–564 (2010).
131. Klonowski, K. D. *et al.* Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration in vivo. *Immunity* **20**, 551–562 (2004).
132. Jiang, X. *et al.* Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* **483**, 227–231 (2012).

133. Bergsbaken, T. & Bevan, M. J. Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8⁺ T cells responding to infection. *Nature Publishing Group* **16**, 406–414 (2015).
134. Skon, C. N. *et al.* Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nature Publishing Group* **14**, 1285–1293 (2013).
135. Casey, K. A. *et al.* Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J Immunol* **188**, 4866–4875 (2012).
136. Mackay, L. K. *et al.* T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF- β and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity* **43**, 1101–1111 (2015).
137. Mackay, L. K. *et al.* The developmental pathway for CD103(+)CD8⁺ tissue-resident memory T cells of skin. *Nature Publishing Group* **14**, 1294–1301 (2013).
138. Schenkel, J. M., Fraser, K. A. & Masopust, D. Cutting edge: resident memory CD8 T cells occupy frontline niches in secondary lymphoid organs. *J Immunol* **192**, 2961–2964 (2014).
139. Anderson, K. G. *et al.* Cutting edge: intravascular staining redefines lung CD8 T cell responses. *J Immunol* **189**, 2702–2706 (2012).
140. Gebhardt, T. *et al.* Different patterns of peripheral migration by memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Nature* **477**, 216–219 (2011).
141. Zaid, A. *et al.* Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 5307–5312 (2014).
142. Ariotti, S. *et al.* Skin-resident memory CD8⁺ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science* **346**, 101–105 (2014).
143. McMaster, S. R., Wilson, J. J., Wang, H. & Kohlmeier, J. E. Airway-Resident Memory CD8 T Cells Provide Antigen-Specific Protection against Respiratory Virus Challenge through Rapid IFN- γ Production. *J Immunol* **195**, 203–209 (2015).
144. Wakim, L. M., Woodward-Davis, A. & Bevan, M. J. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 17872–17879 (2010).
145. Surh, C. D. & Sprent, J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity* **29**, 848–862 (2008).
146. Becker, T. C. *et al.* Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 1541–1548 (2002).
147. Carrio, R., Rolle, C. E. & Malek, T. R. Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8⁺ memory T cells. *European Journal of Immunology* **37**, 3078–3088 (2007).

148. Osborne, L. C. *et al.* Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 619–631 (2007).
149. Stemberger, C. *et al.* A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* **27**, 985–997 (2007).
150. Gerlach, C. *et al.* One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 1235–1246 (2010).
151. Ahmed, R., WASHINGTON, D. G. S.-N. Y. T. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *JSTOR* doi:10.2307/2890771
152. Joshi, N. S. *et al.* Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* **27**, 281–295 (2007).
153. Badovinac, V. P., Messingham, K. A. N., Jabbari, A., Haring, J. S. & Harty, J. T. Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med* **11**, 748–756 (2005).
154. D'Souza, W. N. & Hedrick, S. M. Cutting Edge: Latecomer CD8 T Cells Are Imprinted with a Unique Differentiation Program. *J Immunol* **177**, 777–781 (2006).
155. Pollizzi, K. N. *et al.* Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8+ T cell differentiation. *Nature Publishing Group* 1–10 (2016). doi:10.1038/ni.3438
156. Metz, P. J. *et al.* Regulation of Asymmetric Division by Atypical Protein Kinase C Influences Early Specification of CD8+ T Lymphocyte Fates. *Scientific Reports* **6**, 19182 (2016).
157. Chang, J. T. *et al.* Asymmetric T Lymphocyte Division in the Initiation of Adaptive Immune Responses. *Science* **315**, 1687–1691 (2007).
158. Oliaro, J. *et al.* Asymmetric Cell Division of T Cells upon Antigen Presentation Uses Multiple Conserved Mechanisms. *J Immunol* **185**, 367–375 (2010).
159. Ben Youngblood *et al.* Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature* **552**, 404–409 (2017).
160. Ben Youngblood *et al.* Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature* **552**, 404–409 (2017).
161. Glimcher, L. H., Townsend, M. J., Sullivan, B. M. & Lord, G. M. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nature Reviews Immunology* **4**, 900–911 (2004).
162. Pearce, E. L. *et al.* Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* **302**, 1041–1043 (2003).
163. Lotem, J. *et al.* Runx3-mediated transcriptional program in cytotoxic lymphocytes. *PLoS ONE* **8**, e80467 (2013).

164. Cruz-Guilloty, F. *et al.* Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J. Exp. Med.* **206**, 51–59 (2009).
165. Intlekofer, A. M. *et al.* Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature Immunology* **6**, 1236–1244 (2005).
166. Joshi, N. S. *et al.* Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8⁽⁺⁾ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* **27**, 281–295 (2007).
167. Intlekofer, A. M. *et al.* Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 2015–2021 (2007).
168. Banerjee, A. *et al.* Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8⁺ T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol* **185**, 4988–4992 (2010).
169. Paley, M. A. *et al.* Technical Advance: Fluorescent reporter reveals insights into eomesodermin biology in cytotoxic lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **93**, 307–315 (2013).
170. Kallies, A., Xin, A., Belz, G. T. & Nutt, S. L. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8⁽⁺⁾ T cells and memory responses. *Immunity* **31**, 283–295 (2009).
171. Rutishauser, R. L. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8⁽⁺⁾ T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* **31**, 296–308 (2009).
172. Boulet, S., Daudelin, J.-F. & Labrecque, N. IL-2 Induction of Blimp-1 Is a Key In Vivo Signal for CD8⁺ Short-Lived Effector T Cell Differentiation. *J Immunol* **193**, 1847–1854 (2014).
173. Xin, A. *et al.* A molecular threshold for effector CD8⁽⁺⁾ T cell differentiation controlled by transcription factors Blimp-1 and T-bet. *Nature Publishing Group* **17**, 422–432 (2016).
174. Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y. & Tokuhisa, T. Bcl6 Acts as an Amplifier for the Generation and Proliferative Capacity of Central Memory CD8⁺ T Cells. *J Immunol* **173**, 883–891 (2004).
175. Ichii, H. *et al.* Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8⁺ T cells. *Nature Immunology* **3**, 558–563 (2002).
176. Manders, P. M. *et al.* BCL6b mediates the enhanced magnitude of the secondary response of memory CD8⁺ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 7418–7425 (2005).
177. Yoshida, K. *et al.* Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8⁺ T cells. *European Journal of Immunology* **36**, 3146–3156 (2006).
178. Cannarile, M. A. *et al.* Transcriptional regulator Id2 mediates CD8⁺ T cell immunity. *Nature Immunology* **7**, 1317–1325 (2006).

179. Yang, C. Y. *et al.* The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8⁺ T cell subsets. *Nature Immunology* **12**, 1221–1229 (2011).
180. Masson, F. *et al.* Id2-mediated inhibition of E2A represses memory CD8⁺ T cell differentiation. *J Immunol* **190**, 4585–4594 (2013).
181. Ji, Y. *et al.* Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8. *Nature Immunology* 1–9 (2011). doi:10.1038/ni.2153
182. Zheng, Y. *et al.* Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* **458**, 351–356 (2009).
183. Leignadier, J. & Labrecque, N. Epitope density influences CD8⁺ memory T cell differentiation. *PLoS ONE* **5**, e13740 (2010).
184. Teixeira, E. *et al.* Different T Cell Receptor Signals Determine CD8⁺ Memory Versus Effector Development. *Science* **323**, 502–505 (2009).
185. Okkenhaug, K. *et al.* A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nature Immunology* **2**, 325–332 (2001).
186. Burr, J. S. *et al.* Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J Immunol* **166**, 5331–5335 (2001).
187. Kirchhoff, S., Müller, W. W., Li-Weber, M. & Krammer, P. H. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *European Journal of Immunology* **30**, 2765–2774 (2000).
188. Radvanyi, L. G. *et al.* CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* **156**, 1788–1798 (1996).
189. Rudd, C. E. & Schneider, H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* **3**, 544–556 (2003).
190. Schneider, H., Valk, E., Leung, R. & Rudd, C. E. CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B (PKB/AKT) sustains T-cell anergy without cell death. *PLoS ONE* **3**, e3842 (2008).
191. Jones, R. G. *et al.* CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *Journal of Experimental Medicine* **196**, 335–348 (2002).
192. Boise, L. H. *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity*. 1995. 3: 87-98. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**, 3788–3799 (2010).
193. Bertram, E. M., Lau, P. & Watts, T. H. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* **168**, 3777–3785 (2002).

194. Fuse, S., Bellfy, S., Yagita, H. & Usherwood, E. J. CD8⁺ T cell dysfunction and increase in murine gammaherpesvirus latent viral burden in the absence of 4-1BB ligand. *J Immunol* **178**, 5227–5236 (2007).
195. Takahashi, C., Mittler, R. S. & Vella, A. T. Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* **162**, 5037–5040 (1999).
196. Shuford, W. W. *et al.* 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8⁺ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *Journal of Experimental Medicine* **186**, 47–55 (1997).
197. Tan, J. T., Whitmire, J. K., Ahmed, R., Pearson, T. C. & Larsen, C. P. 4-1BB Ligand, a Member of the TNF Family, Is Important for the Generation of Antiviral CD8 T Cell Responses. *J Immunol* **163**, 4859–4868 (1999).
198. Henry, C. J., Ornelles, D. A., Mitchell, L. M., Brzoza-Lewis, K. L. & Hiltbold, E. M. IL-12 produced by dendritic cells augments CD8⁺ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *J Immunol* **181**, 8576–8584 (2008).
199. Wilson, D. C., Matthews, S. & Yap, G. S. IL-12 signaling drives CD8⁺ T cell IFN- γ production and differentiation of KLRG1⁺ effector subpopulations during *Toxoplasma gondii* Infection. *J Immunol* **180**, 5935–5945 (2008).
200. Rao, R. R., Li, Q., Odunsi, K. & Shrikant, P. A. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8⁺ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* **32**, 67–78 (2010).
201. Staron, M. M. *et al.* The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection. *Immunity* **41**, 802–814 (2014).
202. Rao, R. R., Li, Q., Bupp, M. & Shrikant, P. A. Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8⁺ T cell differentiation. *Immunity* **36**, 374–387 (2012).
203. Klebanoff, C. A. *et al.* Inhibition of AKT signaling uncouples T cell differentiation from expansion for receptor-engineered adoptive immunotherapy. *JCI Insight* **2**, (2017).
204. Baum, A. & García-Sastre, A. Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. *Amino Acids* **38**, 1283–1299 (2010).
205. Mossman, K. L. & Ashkar, A. A. Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol.* **18**, 267–281 (2005).
206. Thompson, L. J., Kolumam, G. A., Thomas, S. & Murali-Krishna, K. Innate inflammatory signals induced by various pathogens differentially dictate the IFN-I dependence of CD8 T cells for clonal expansion and memory formation. *J Immunol* **177**, 1746–1754 (2006).

207. Müller, U. *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918–1921 (1994).
208. Agarwal, P. *et al.* Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. *J Immunol* **183**, 1695–1704 (2009).
209. Marshall, H. D., Prince, A. L., Berg, L. J. & Welsh, R. M. IFN- α β and self-MHC divert CD8 T cells into a distinct differentiation pathway characterized by rapid acquisition of effector functions. *J Immunol* **185**, 1419–1428 (2010).
210. Pipkin, M. E. *et al.* Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity* **32**, 79–90 (2010).
211. Bevan, M. J. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* **117**, 2233–2238 (1976).
212. Kallies, A., Xin, A., Belz, G. T. & Nutt, S. L. Blimp-1 Transcription Factor Is Required for the Differentiation of Effector CD8⁺ T Cells and Memory Responses. *Immunity* **31**, 283–295 (2009).
213. Bennett, S. R. *et al.* Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**, 478–480 (1998).
214. Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. & Melief, C. J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480–483 (1998).
215. Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. & Heath, W. R. Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help. *Journal of Experimental Medicine* **186**, 65–70 (1997).
216. Ridge, J. P., Di Rosa, F. & Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474–478 (1998).
217. Hervas-Stubbs, S., Olivier, A., Boisgerault, F., Thieblemont, N. & Leclerc, C. TLR3 ligand stimulates fully functional memory CD8⁺ T cells in the absence of CD4⁺ T-cell help. *Blood* **109**, 5318–5326 (2007).
218. Wilson, D. C., Matthews, S. & Yap, G. S. IL-12 Signaling Drives CD8⁺ T Cell IFN- Production and Differentiation of KLRG1⁺ Effector Subpopulations during *Toxoplasma gondii* Infection. *J Immunol* **180**, 5935–5945 (2008).
219. Sokke Umeshappa, C. *et al.* CD154 and IL-2 signaling of CD4⁺ T cells play a critical role in multiple phases of CD8⁺ CTL responses following adenovirus vaccination. *PLoS ONE* **7**, e47004 (2012).

220. Oh, S. *et al.* IL-15 as a mediator of CD4⁺ help for CD8⁺ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 5201–5206 (2008).
221. Janssen, E. M. *et al.* CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852–856 (2003).
222. Bourgeois, C. A Role for CD40 Expression on CD8⁺ T Cells in the Generation of CD8⁺ T Cell Memory. *Science* **297**, 2060–2063 (2002).
223. Zloza, A. *et al.* NKG2D signaling on CD8⁺ T cells represses T-bet and rescues CD4-unhelped CD8⁺ T cell memory recall but not effector responses. *Nat Med* **18**, 422–428 (2012).
224. Sacks, J. A. & Bevan, M. J. TRAIL deficiency does not rescue impaired CD8⁺ T cell memory generated in the absence of CD4⁺ T cell help. *J Immunol* **180**, 4570–4576 (2008).
225. Sathaliyawala, T. *et al.* Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* **38**, 187–197 (2013).
226. Shin, H. & Iwasaki, A. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* **491**, 463–467 (2012).
227. Wu, T. *et al.* Lung-resident memory CD8 T cells (TRM) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection. *Journal of Leukocyte Biology* **95**, 215–224 (2014).
228. Schenten, D. *et al.* Signaling through the adaptor molecule MyD88 in CD4⁺ T cells is required to overcome suppression by regulatory T cells. *Immunity* **40**, 78–90 (2014).
229. Castellino, F. *et al.* Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890–895 (2006).
230. Janssen, E. M. *et al.* CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* **434**, 88–93 (2005).
231. Azadiv, M., Bowers, W. J., Topham, D. J. & Crispe, I. N. CD4⁺ T cell effects on CD8⁺ T cell location defined using bioluminescence. *PLoS ONE* **6**, e16222 (2011).
232. Wolkers, M. C. *et al.* Nab2 regulates secondary CD8⁺ T-cell responses through control of TRAIL expression. *Blood* **119**, 798–804 (2012).
233. Zajac, A. J. *et al.* Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 2205–2213 (1998).
234. Wherry, E. J. *et al.* Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**, 670–684 (2007).
235. Virgin, H. W., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Redefining chronic viral infection. *Cell* **138**, 30–50 (2009).

236. Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H. & Zinkernagel, R. M. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* **362**, 758–761 (1993).
237. Matloubian, M., Somasundaram, T., Kolhekar, S. R., Selvakumar, R. & Ahmed, R. Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice. *Journal of Experimental Medicine* **172**, 1043–1048 (1990).
238. Matloubian, M., Kolhekar, S. R., Somasundaram, T. & Ahmed, R. Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **67**, 7340–7349 (1993).
239. Ahmed, R. *et al.* Genetic analysis of in vivo-selected viral variants causing chronic infection: importance of mutation in the L RNA segment of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **62**, 3301–3308 (1988).
240. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nature Publishing Group* **131**, 492–499 (2011).
241. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Publishing Group* **10**, 29–37 (2009).
242. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 252–264 (2012).
243. Liu, J. *et al.* Targeting PD-1 and Tim-3 Pathways to Reverse CD8 T-Cell Exhaustion and Enhance Ex Vivo T-Cell Responses to Autologous Dendritic/Tumor Vaccines. *J. Immunother.* **39**, 171–180 (2016).
244. Zhou, Q. *et al.* Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* **117**, 4501–4510 (2011).
245. Jin, H. T., Anderson, A. C. & Tan, W. G. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. in (2010). doi:10.1073/pnas.1009731107/-/DCSupplemental
246. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology* **10**, 29–37 (2008).
247. Butler, N. S. *et al.* Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nature Publishing Group* **13**, 188–195 (2012).
248. West, E. E. *et al.* PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 2604–2615 (2013).
249. Im, S. J. *et al.* Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417–421 (2016).

250. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Publishing Group* **15**, 486–499 (2015).
251. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).
252. Kinter, A. L. *et al.* The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* **181**, 6738–6746 (2008).
253. Lafon, M. *et al.* Detrimental contribution of the immuno-inhibitor B7-H1 to rabies virus encephalitis. *J Immunol* **180**, 7506–7515 (2008).
254. Petrovas, C. *et al.* PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 2281–2292 (2006).
255. Freeman, G. J., Wherry, E. J., Ahmed, R. & Sharpe, A. H. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 2223–2227 (2006).
256. Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350–354 (2006).
257. Velu, V. *et al.* Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* **458**, 206–210 (2009).
258. Brahmer, J. R. *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3167–3175 (2010).
259. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* **173**, 945–954 (2004).
260. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* **209**, 1201–1217 (2012).
261. Sheppard, K.-A. *et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett.* **574**, 37–41 (2004).
262. Hui, E. *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* **355**, 1428–1433 (2017).
263. Quigley, M. *et al.* Transcriptional analysis of HIV-specific CD8⁺ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* **16**, 1147–1151 (2010).

264. Williams, K. L. *et al.* Characterization of murine BATF: a negative regulator of activator protein-1 activity in the thymus. *European Journal of Immunology* **31**, 1620–1627 (2001).
265. Schraml, B. U. *et al.* The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* **460**, 405–409 (2009).
266. Bengsch, B. *et al.* Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8+ T Cell Exhaustion. *Immunity* **45**, 358–373 (2016).
267. Liang, H. & Ward, W. F. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* **30**, 145–151 (2006).
268. Oestreich, K. J., Yoon, H., Ahmed, R. & Boss, J. M. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J Immunol* **181**, 4832–4839 (2008).
269. Cho, H.-Y. *et al.* Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN- α -induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1779**, 811–819 (2008).
270. Staron, M. M. *et al.* The Transcription Factor FoxO1 Sustains Expression of the Inhibitory Receptor PD-1 and Survival of Antiviral CD8+ T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **41**, 802–814 (2014).
271. Bally, A. P. R. *et al.* NF- κ B regulates PD-1 expression in macrophages. *J Immunol* **194**, 4545–4554 (2015).
272. Mathieu, M. E. L., Cotta-Grand, N., Daudelin, J.-F. C. O., la Th eacute bault, P. E. & Labrecque, N. Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8. *Immunol. Cell Biol.* **91**, 82–88 (2012).
273. Youngblood, B. *et al.* Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity* **35**, 400–412 (2011).
274. McPherson, R. C. *et al.* Epigenetic modification of the PD-1 (Pdc1) promoter in effector CD4(+) T cells tolerized by peptide immunotherapy. *Elife* **3**, 765 (2014).
275. Utzschneider, D. T. *et al.* T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion. *Nature Publishing Group* **14**, 603–610 (2013).
276. Ghoneim, H. E. *et al.* De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. *Cell* **170**, 142–157.e19 (2017).
277. Ahn, E. *et al.* Demethylation of the PD-1 Promoter Is Imprinted during the Effector Phase of CD8 T Cell Exhaustion. *J. Virol.* **90**, 8934–8946 (2016).
278. Youngblood, B. *et al.* Cutting edge: Prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells. *J Immunol* **191**, 540–544 (2013).

279. Xu, F. *et al.* LSECtin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Research* **74**, 3418–3428 (2014).
280. Workman, C. J. & Vignali, D. A. A. The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. *European Journal of Immunology* **33**, 970–979 (2003).
281. Workman, C. J. *et al.* Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. *J Immunol* **172**, 5450–5455 (2004).
282. Hannier, S., Tournier, M., Bismuth, G. & Triebel, F. CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol* **161**, 4058–4065 (1998).
283. Blackburn, S. D., Shin, H. & Freeman, G. J. *Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by α PD-L1 blockade.* (Proceedings of the ..., 2008).
284. Monney, L. *et al.* Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536–541 (2002).
285. Fourcade, J. *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J. Exp. Med.* **207**, 2175–2186 (2010).
286. Zhu, C. *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology* **6**, 1245–1252 (2005).
287. Golden-Mason, L. *et al.* Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J. Virol.* **83**, 9122–9130 (2009).
288. Kang, C.-W. *et al.* Apoptosis of tumor infiltrating effector TIM-3+CD8+ T cells in colon cancer. *Scientific Reports* **5**, 15659 (2015).
289. Sehrawat, S. *et al.* Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response. *PLoS Pathog* **6**, e1000882 (2010).
290. Li, H. *et al.* Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **56**, 1342–1351 (2012).
291. Leitner, J. *et al.* TIM-3 Does Not Act as a Receptor for Galectin-9. *PLoS Pathog* **9**, e1003253 (2013).
292. Lee, J. *et al.* Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Molecular and Cellular Biology* **31**, 3963–3974 (2011).

293. Rangachari, M. *et al.* Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat Med* **18**, 1394–1400 (2012).
294. CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. 1–22 (2014). doi:10.1038/nature13848
295. Salmond, R. J., Filby, A., Qureshi, I., Caserta, S. & Zamoyska, R. T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol. Rev.* **228**, 9–22 (2009).
296. Smida, M., Posevitz-Fejfar, A., Horejsi, V., Schraven, B. & Lindquist, J. A. A novel negative regulatory function of the phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains: blocking Ras activation. *Blood* **110**, 596–615 (2007).
297. Kambayashi, T., Assarsson, E., Chambers, B. J. & Ljunggren, H. G. Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* **167**, 6706–6710 (2001).
298. McNerney, M. E., Lee, K.-M. & Kumar, V. 2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8+ T cells. *Mol. Immunol.* **42**, 489–494 (2005).
299. Waggoner, S. N. & Kumar, V. Evolving role of 2B4/CD244 in T and NK cell responses during virus infection. *Front. Immunol.* **3**, 377 (2012).
300. Schlaphoff, V. *et al.* Dual function of the NK cell receptor 2B4 (CD244) in the regulation of HCV-specific CD8+ T cells. *PLoS Pathog* **7**, e1002045 (2011).
301. Lissina, A. *et al.* Fine-tuning of CD8(+) T-cell effector functions by targeting the 2B4-CD48 interaction. *Immunol. Cell Biol.* **94**, 583–592 (2016).
302. Chen, C.-W. *et al.* Cutting Edge: 2B4-Mediated Coinhibition of CD4(+) T Cells Underlies Mortality in Experimental Sepsis. *J Immunol* **199**, 1961–1966 (2017).
303. Nakajima, H. & Colonna, M. 2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum. Immunol.* **61**, 39–43 (2000).
304. Sayós, J. *et al.* Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *International Immunology* **12**, 1749–1757 (2000).
305. Morra, M. *et al.* Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J.* **20**, 5840–5852 (2001).
306. Parolini, S. *et al.* X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the

- inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 337–346 (2000).
307. Schatzle, J. D. *et al.* Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 3870–3875 (1999).
308. Tangye, S. G. *et al.* Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J Immunol* **162**, 6981–6985 (1999).
309. Latour, S. *et al.* Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nature Immunology* **2**, 681–690 (2001).
310. Bottino, C. *et al.* Analysis of the molecular mechanism involved in 2B4-mediated NK cell activation: evidence that human 2B4 is physically and functionally associated with the linker for activation of T cells. *European Journal of Immunology* **30**, 3718–3722 (2000).
311. Klem, J., Verrett, P. C., Kumar, V. & Schatzle, J. D. 2B4 is constitutively associated with linker for the activation of T cells in glycolipid-enriched microdomains: properties required for 2B4 lytic function. *J Immunol* **169**, 55–62 (2002).
312. Watzl, C., Stebbins, C. C. & Long, E. O. NK cell inhibitory receptors prevent tyrosine phosphorylation of the activation receptor 2B4 (CD244). *J Immunol* **165**, 3545–3548 (2000).
313. Agrawal, S. *et al.* Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *J Immunol* **162**, 1223–1226 (1999).
314. Le Bouteiller, P. *et al.* Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 16963–16968 (2002).
315. Barakonyi, A. *et al.* Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J Immunol* **173**, 5349–5354 (2004).
316. Cai, G. *et al.* CD160 inhibits activation of human CD4⁺ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nature Publishing Group* **9**, 176–185 (2008).
317. Rey, J. *et al.* The co-expression of 2B4 (CD244) and CD160 delineates a subpopulation of human CD8⁺ T cells with a potent CD160-mediated cytolytic effector function. *European Journal of Immunology* **36**, 2359–2366 (2006).
318. Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Immunity, P. L. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Elsevier*

doi:10.1038/nature12297

319. Walunas, T. L., Bakker, C. Y. & Bluestone, J. A. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 2541–2550 (1996).
320. Collins, A. V. *et al.* The Interaction Properties of Costimulatory Molecules Revisited. *Immunity* **17**, 201–210 (2002).
321. Qureshi, O. S. *et al.* Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science* **332**, 600–603 (2011).
322. Grohmann, U. *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature Immunology* **3**, 1097–1101 (2002).
323. Fallarino, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Publishing Group* **4**, 1206–1212 (2003).
324. Chuang, E. *et al.* The CD28 and CTLA-4 Receptors Associate with the Serine/Threonine Phosphatase PP2A. *Immunity* **13**, 313–322 (2000).
325. Wilson, E. B. *et al.* Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* **340**, 202–207 (2013).
326. Teijaro, J. R. *et al.* Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* **340**, 207–211 (2013).
327. Stelekati, E. *et al.* Bystander Chronic Infection Negatively Impacts Development of CD8⁺ T Cell Memory. *Immunity* **40**, 801–813 (2014).
328. Ng, C. T. & Oldstone, M. B. A. Infected CD8 α - dendritic cells are the predominant source of IL-10 during establishment of persistent viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 14116–14121 (2012).
329. Said, E. A. *et al.* Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection. *Nat Med* **16**, 452–459 (2010).
330. Richter, K. *et al.* Macrophage and T cell produced IL-10 promotes viral chronicity. *PLoS Pathog* **9**, e1003735 (2013).
331. Brooks, D. G. *et al.* Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* **12**, 1301–1309 (2006).
332. Ejrnaes, M. *et al.* Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 2461–2472 (2006).
333. Brooks, D. G. *et al.* IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 20428–20433 (2008).
334. Tinoco, R., Alcalde, V., Yang, Y., Sauer, K. & Zuñiga, E. I. Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8⁺ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity* **31**, 145–157 (2009).

335. Garidou, L., Heydari, S., Gossa, S. & McGavern, D. B. Therapeutic blockade of transforming growth factor beta fails to promote clearance of a persistent viral infection. *J. Virol.* **86**, 7060–7071 (2012).
336. Beltra, J.-C. & Decaluwe, H. Cytokines and persistent viral infections. *Cytokine* 1–12 (2016). doi:10.1016/j.cyto.2016.02.006
337. Beltra, J.-C. *et al.* IL2R β -dependent signals drive terminal exhaustion and suppress memory development during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, E5444–E5453 (2016).
338. Bachmann, M. F. & Oxenius, A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep.* **8**, 1142–1148 (2007).
339. Mathieu, C. *et al.* IL-2 and IL-15 regulate CD8⁺ memory T-cell differentiation but are dispensable for protective recall responses. *European Journal of Immunology* **45**, 3324–3338 (2015).
340. Fröhlich, A. *et al.* IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* **324**, 1576–1580 (2009).
341. Yi, J. S., Du, M. & Zajac, A. J. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* **324**, 1572–1576 (2009).
342. Elsaesser, H., Sauer, K. & Brooks, D. G. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* **324**, 1569–1572 (2009).
343. Yue, F. Y. *et al.* HIV-specific IL-21 producing CD4⁺ T cells are induced in acute and chronic progressive HIV infection and are associated with relative viral control. *J Immunol* **185**, 498–506 (2010).
344. Chevalier, M. F. *et al.* HIV-1-specific interleukin-21⁺ CD4⁺ T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8⁺ T cell function. *J. Virol.* **85**, 733–741 (2011).
345. Williams, L. D. *et al.* Interleukin-21-producing HIV-1-specific CD8 T cells are preferentially seen in elite controllers. *J. Virol.* **85**, 2316–2324 (2011).
346. Wilson, C. B., Rowell, E. & Sekimata, M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* **9**, 91–105 (2009).
347. Youngblood, B., Davis, C. W. & Ahmed, R. Making memories that last a lifetime: heritable functions of self-renewing memory CD8 T cells. *International Immunology* **22**, 797–803 (2010).
348. Zediak, V. P., Wherry, E. J. & Berger, S. L. The contribution of epigenetic memory to immunologic memory. *Current Opinion in Genetics & Development* **21**, 154–159 (2011).
349. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 662–673 (2002).
350. Shin, H. *et al.* A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8⁽⁺⁾ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **31**, 309–320 (2009).
351. Angelosanto, J. M. & Wherry, E. J. Transcription factor regulation of CD8⁺ T-cell memory and exhaustion. *Immunol. Rev.* **236**, 167–175 (2010).

352. Agnellini, P. *et al.* Impaired NFAT nuclear translocation results in split exhaustion of virus-specific CD8⁺ T cell functions during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 4565–4570 (2007).
353. Martinez, G. J. *et al.* The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8⁺ T Cells. *Immunity* **42**, 265–278 (2015).
354. Bengsch, B. & Wherry, E. J. The importance of cooperation: partnerless NFAT induces T cell exhaustion. *Immunity* **42**, 203–205 (2015).
355. Kao, C. *et al.* Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8⁺ T cell responses during chronic infection. *Nature Publishing Group* **12**, 663–671 (2011).
356. Paley, M. A. *et al.* Progenitor and Terminal Subsets of CD8⁺ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science* **338**, 1220–1225 (2012).
357. Youngblood, B., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Acquired transcriptional programming in functional and exhausted virus-specific CD8 T cells. *Curr Opin HIV AIDS* **7**, 50–57 (2012).
358. Pauken, K. E. & Wherry, E. J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* **36**, 265–276 (2015).
359. He, R. *et al.* Follicular CXCR5-expressing CD8⁺ T cells curtail chronic viral infection. *Nature* **537**, 412–428 (2016).
360. Leong, Y. A. *et al.* CXCR5⁺ follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles. *Nature Immunology* **17**, 1187–1196 (2016).
361. Wu, T. *et al.* The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. *Sci Immunol* **1**, eaai8593–eaai8593 (2016).
362. Utzschneider, D. T. *et al.* T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8(+) T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity* **45**, 415–427 (2016).
363. Wieland, D. *et al.* TCF1(+) hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells are maintained after cessation of chronic antigen stimulation. *Nat Commun* **8**, 15050 (2017).
364. Joshi, N. S. & Kaech, S. M. Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *J Immunol* **180**, 1309–1315 (2008).
365. Brenchley, J. M. *et al.* Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood* **101**, 2711–2720 (2003).
366. Boni, C. *et al.* Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J. Virol.* **81**, 4215–4225 (2007).
367. Ferrari, C. HBV and the immune response. *Liver Int.* **35 Suppl 1**, 121–128 (2015).

368. Wu, W. *et al.* Blockade of Tim-3 signaling restores the virus-specific CD8⁺ T-cell response in patients with chronic hepatitis B. *European Journal of Immunology* **42**, 1180–1191 (2012).
369. Fisicaro, P. *et al.* Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **138**, 682–93– 693.e1–4 (2010).
370. Boettler, T. *et al.* Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8⁺ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J. Virol.* **80**, 3532–3540 (2006).
371. Osborne, L. C. & Abraham, N. Regulation of memory T cells by γ c cytokines. *Cytokine* **50**, 105–113 (2010).
372. Lv, G. *et al.* Dynamic analysis of CD127 expression on memory CD8 T cells from patients with chronic hepatitis B during telbivudine treatment. *Virology Journal* **7**, 207 (2010).
373. Golden-Mason, L. *et al.* Loss of IL-7 receptor alpha-chain (CD127) expression in acute HCV infection associated with viral persistence. *Hepatology* **44**, 1098–1109 (2006).
374. Zhang, S.-Y. *et al.* Progressive CD127 down-regulation correlates with increased apoptosis of CD8 T cells during chronic HIV-1 infection. *European Journal of Immunology* **39**, 1425–1434 (2009).
375. Peng, G. *et al.* PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol. Immunol.* **45**, 963–970 (2008).
376. Raziorrouh, B. *et al.* The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8⁺ T-cell function. *Hepatology* **52**, 1934–1947 (2010).
377. Peretz, Y. *et al.* CD160 and PD-1 co-expression on HIV-specific CD8 T cells defines a subset with advanced dysfunction. *PLoS Pathog* **8**, e1002840 (2012).
378. Trautmann, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* **12**, 1198–1202 (2006).
379. Palvimo, J. J. PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1405–1408 (2007).
380. Buggert, M. *et al.* T-bet and Eomes Are Differentially Linked to the Exhausted Phenotype of CD8⁺ T Cells in HIV Infection. *PLoS Pathog* **10**, e1004251–15 (2014).
381. Chew, G. M. *et al.* TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog* **12**, e1005349 (2016).

382. Jones, R. B. *et al.* Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **205**, 2763–2779 (2008).
383. Poonia, B. & Pauza, C. D. Levels of CD56+TIM-3- effector CD8 T cells distinguish HIV natural virus suppressors from patients receiving antiretroviral therapy. *PLoS ONE* **9**, e88884 (2014).
384. Sakhdari, A. *et al.* Tim-3 negatively regulates cytotoxicity in exhausted CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS ONE* **7**, e40146 (2012).
385. Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 12293–12297 (2002).
386. Hamanishi, J. *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 3360–3365 (2007).
387. Ahmadzadeh, M. *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* **114**, 1537–1544 (2009).
388. Gros, A. *et al.* PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J. Clin. Invest.* **124**, 2246–2259 (2014).
389. Daud, A. I. *et al.* Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. *J. Clin. Invest.* **126**, 3447–3452 (2016).
390. Okoye, I. S., Houghton, M., Tyrrell, L., Barakat, K. & Elahi, S. Coinhibitory Receptor Expression and Immune Checkpoint Blockade: Maintaining a Balance in CD8(+) T Cell Responses to Chronic Viral Infections and Cancer. *Front. Immunol.* **8**, 1215 (2017).
391. Baitsch, L. *et al.* Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PLoS ONE* **7**, e30852 (2012).
392. Baitsch, L. *et al.* Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients. *J. Clin. Invest.* **121**, 2350–2360 (2011).
393. Fourcade, J. *et al.* PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8+ T cell expansion in melanoma patients. *J Immunol* **182**, 5240–5249 (2009).
394. Ngiow, S. F. *et al.* A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. *Cancer Research* **75**, 3800–3811 (2015).
395. Inozume, T. *et al.* Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 255–263 (2016).
396. Chauvin, J.-M. *et al.* TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8+ T cells in melanoma patients. *J. Clin. Invest.* **125**, 2046–2058 (2015).

397. Krieg, C. *et al.* High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Med* **24**, 144–153 (2018).
398. Routy, B. *et al.* Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* **359**, eaan3706–97 (2017).
399. Ledford, H. Gut microbes can shape responses to cancer immunotherapy. *Nature News* (2017). doi:10.1038/nature.2017.22938
400. Vétizou, M. *et al.* Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* **350**, 1079–1084 (2015).
401. Botticelli, A., Zizzari, I., Mazzuca, F., Oncotarget, P. A. 2017. Cross-talk between microbiota and immune fitness to steer and control response to anti PD-1/PDL-1 treatment. *ncbi.nlm.nih.gov*
8, (2016).
402. Gopalakrishnan, V. *et al.* Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* **359**, eaan4236–103 (2017).
403. Poutahidis, T., Kleinewietfeld, M. & Erdman, S. Gut Microbiota and the Paradox of Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **5**, 57 (2014).
404. Dexter, J. S. The Analysis of a Case of Continuous Variation in Drosophila by a Study of Its Linkage Relations. *The American Naturalist* (2015). doi:10.1086/279446
405. Layden, M. J. & Martindale, M. Q. Non-canonical Notch signaling represents an ancestral mechanism to regulate neural differentiation. *Evodevo* **5**, 30 (2014).
406. Austin, J. & Kimble, J. glp-1 Is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* **51**, 589–599 (1987).
407. Radtke, F. *et al.* Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547–558 (1999).
408. Wilson, A., MacDonald, H. R. & Radtke, F. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *Journal of Experimental Medicine* **194**, 1003–1012 (2001).
409. Han, H. *et al.* Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *International Immunology* **14**, 637–645 (2002).
410. Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S. J. C. & MacDonald, H. R. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nature Immunology* **5**, 247–253 (2004).
411. Okajima, T. & Irvine, K. D. Regulation of notch signaling by o-linked fucose. *Cell* **111**, 893–904 (2002).
412. Sasamura, T. *et al.* neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development* **130**, 4785–4795 (2003).

413. Shi, S. & Stanley, P. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 5234–5239 (2003).
414. Moloney, D. J. *et al.* Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**, 369–375 (2000).
415. Brückner, K., Perez, L., Clausen, H. & Cohen, S. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411–415 (2000).
416. Xu, A. *et al.* In vitro reconstitution of the modulation of Drosophila Notch-ligand binding by Fringe. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 35153–35162 (2007).
417. Radtke, F., Fasnacht, N. & MacDonald, H. R. Notch signaling in the immune system. *Immunity* **32**, 14–27 (2010).
418. Gordon, W. R. *et al.* Mechanical Allosterity: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. *Developmental Cell* **33**, 729–736 (2015).
419. De Strooper, B. *et al.* A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518–522 (1999).
420. Kaether, C., Schmitt, S., Willem, M. & Haass, C. Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface. *Traffic* **7**, 408–415 (2006).
421. Sorensen, E. B. & Conner, S. D. γ -secretase-dependent cleavage initiates notch signaling from the plasma membrane. *Traffic* **11**, 1234–1245 (2010).
422. Tagami, S. *et al.* Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 165–176 (2008).
423. Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M. E. & Bilder, D. Endosomal entry regulates Notch receptor activation in Drosophila melanogaster. *J Cell Biol* **180**, 755–762 (2008).
424. Windler, S. L. & Bilder, D. Endocytic internalization routes required for delta/notch signaling. *Curr. Biol.* **20**, 538–543 (2010).
425. Yan, Y., Deneff, N. & Schüpbach, T. The vacuolar proton pump, V-ATPase, is required for notch signaling and endosomal trafficking in Drosophila. *Developmental Cell* **17**, 387–402 (2009).
426. Kao, H. Y. *et al.* A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes & Development* **12**, 2269–2277 (1998).
427. Zhou, S. & Hayward, S. D. Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 6222–6232 (2001).

428. Kitamura, T. *et al.* A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J. Clin. Invest.* **117**, 2477–2485 (2007).
429. Yatim, A. *et al.* NOTCH1 nuclear interactome reveals key regulators of its transcriptional activity and oncogenic function. *Mol. Cell* **48**, 445–458 (2012).
430. Sethi, N., Dai, X., Winter, C. G. & Kang, Y. Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell* **19**, 192–205 (2011).
431. Wendorff, A. A. *et al.* Hes1 is a critical but context-dependent mediator of canonical Notch signaling in lymphocyte development and transformation. *Immunity* **33**, 671–684 (2010).
432. Reizis, B. & Leder, P. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes & Development* **16**, 295–300 (2002).
433. Wang, M. M. Notch signaling and Notch signaling modifiers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1550–1562 (2011).
434. Arnett, K. L. *et al.* Structural and mechanistic insights into cooperative assembly of dimeric Notch transcription complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1312–1317 (2010).
435. Housden, B. E. *et al.* Transcriptional dynamics elicited by a short pulse of notch activation involves feed-forward regulation by E(spl)/Hes genes. *PLoS Genet.* **9**, e1003162 (2013).
436. Severson, E. *et al.* Genome-wide identification and characterization of Notch transcription complex-binding sequence-paired sites in leukemia cells. *Science Signaling* **10**, eaag1598 (2017).
437. Weng, A. P. *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269–271 (2004).
438. Espinosa, L., Ingles-Esteve, J., Aguilera, C. & Bigas, A. Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 Down-regulates Notch Activity, a Link for Notch and Wnt Pathways. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 32227–32235 (2003).
439. Foltz, D. R., Santiago, M. C., Berechid, B. E. & Nye, J. S. Glycogen synthase kinase-3 β modulates notch signaling and stability. *Curr. Biol.* **12**, 1006–1011 (2002).
440. Ingles-Esteve, J., Espinosa, L., Milner, L. A., Caelles, C. & Bigas, A. Phosphorylation of Ser2078 modulates the Notch2 function in 32D cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 44873–44880 (2001).
441. Fryer, C. J., White, J. B. & Jones, K. A. Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol. Cell* **16**, 509–520 (2004).

442. Le Bras, S., Loyer, N. & Le Borgne, R. The multiple facets of ubiquitination in the regulation of notch signaling pathway. *Traffic* **12**, 149–161 (2011).
443. Mo, J.-S. *et al.* Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) controls Notch1 signaling by downregulation of protein stability through Fbw7 ubiquitin ligase. *J. Cell. Sci.* **124**, 100–112 (2011).
444. Gupta-Rossi, N. *et al.* Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 34371–34378 (2001).
445. Oberg, C. *et al.* The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 35847–35853 (2001).
446. Wu, G. *et al.* SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 7403–7415 (2001).
447. McGill, M. A., Dho, S. E., Weinmaster, G. & McGlade, C. J. Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *J. Biol. Chem.* **284**, 26427–26438 (2009).
448. McGill, M. A. & McGlade, C. J. Mammalian Numb Proteins Promote Notch1 Receptor Ubiquitination and Degradation of the Notch1 Intracellular Domain. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 23196–23203 (2003).
449. Beres, B. J. *et al.* Numb regulates Notch1, but not Notch3, during myogenesis. *Mech. Dev.* **128**, 247–257 (2011).
450. Miyamoto, A., Lau, R., Hein, P. W., Shipley, J. M. & Weinmaster, G. Microfibrillar proteins MAGP-1 and MAGP-2 induce Notch1 extracellular domain dissociation and receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 10089–10097 (2006).
451. Rauen, T. *et al.* YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation. *J. Biol. Chem.* **284**, 26928–26940 (2009).
452. Eiraku, M., Hirata, Y., Takeshima, H., Hirano, T. & Kengaku, M. Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 25400–25407 (2002).
453. Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K. M. & Weinmaster, G. Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* **126**, 1689–1702 (1999).
454. Shawber, C. *et al.* Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* **122**, 3765–3773 (1996).

455. Rusconi, J. C. & Corbin, V. Evidence for a novel Notch pathway required for muscle precursor selection in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **79**, 39–50 (1998).
456. Beres, T. M. *et al.* PTF1 is an organ-specific and Notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP-L. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 117–130 (2006).
457. Hori, K. *et al.* A nonclassical bHLH Rbpj transcription factor complex is required for specification of GABAergic neurons independent of Notch signaling. *Genes & Development* **22**, 166–178 (2008).
458. Masui, T., Long, Q., Beres, T. M., Magnuson, M. A. & MacDonald, R. J. Early pancreatic development requires the vertebrate Suppressor of Hairless (RBPJ) in the PTF1 bHLH complex. *Genes & Development* **21**, 2629–2643 (2007).
459. Siebel, C. & Lendahl, U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev* **97**, 1235–1294 (2017).
460. Chadwick, N. *et al.* Identification of novel Notch target genes in T cell leukaemia. *Mol Cancer* **8**, 35 (2009).
461. Dohda, T. *et al.* Notch signaling induces SKP2 expression and promotes reduction of p27Kip1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Exp. Cell Res.* **313**, 3141–3152 (2007).
462. Palomero, T. *et al.* NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 18261–18266 (2006).
463. Weerkamp, F. *et al.* Identification of Notch target genes in uncommitted T-cell progenitors: No direct induction of a T-cell specific gene program. *Leukemia* **20**, 1967–1977 (2006).
464. Main, H. *et al.* Interactions between Notch- and hypoxia-induced transcriptomes in embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* **316**, 1610–1624 (2010).
465. Meier-Stiegen, F. *et al.* Activated Notch1 target genes during embryonic cell differentiation depend on the cellular context and include lineage determinants and inhibitors. *PLoS ONE* **5**, e11481 (2010).
466. Aoyagi-Ikeda, K. *et al.* Notch induces myofibroblast differentiation of alveolar epithelial cells via transforming growth factor- β -Smad3 pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 136–144 (2011).
467. Mikhailik, A., Mazella, J., Liang, S. & Tseng, L. Notch ligand-dependent gene expression in human endometrial stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **388**, 479–482 (2009).
468. Buas, M. F., Kabak, S. & Kadesch, T. Inhibition of myogenesis by Notch: evidence for multiple pathways. *J. Cell. Physiol.* **218**, 84–93 (2009).

469. Krejci, A., Bernard, F., Housden, B. E., Collins, S. & Bray, S. J. Direct response to Notch activation: signaling crosstalk and incoherent logic. *Science Signaling* **2**, ra1–ra1 (2009).
470. Andersson, E. R., Sandberg, R. & Lendahl, U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* **138**, 3593–3612 (2011).
471. Liao, W.-R. *et al.* The CBF1-independent Notch1 signal pathway activates human c-myc expression partially via transcription factor YY1. *Carcinogenesis* **28**, 1867–1876 (2007).
472. Yu, B. *et al.* Epigenetic landscapes reveal transcription factors that regulate CD8+ T cell differentiation. *Nature Publishing Group* 1–13 (2017). doi:10.1038/ni.3706
473. Backer, R. A. *et al.* A central role for Notch in effector CD8+ T cell differentiation. *Nature Immunology* **15**, 1143–1151 (2014).
474. Friedmann, D. R. & Kovall, R. A. Thermodynamic and structural insights into CSL-DNA complexes. *Protein Sci.* **19**, 34–46 (2010).
475. Apelqvist, A. *et al.* Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* **400**, 877–881 (1999).
476. Hald, J. *et al.* Activated Notch1 prevents differentiation of pancreatic acinar cells and attenuate endocrine development. *Developmental Biology* **260**, 426–437 (2003).
477. Fan, X. *et al.* Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Research* **64**, 7787–7793 (2004).
478. Ong, C.-T. *et al.* Target selectivity of vertebrate notch proteins. Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 5106–5119 (2006).
479. Feyerabend, T. B. *et al.* Deletion of Notch1 converts pro-T cells to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms. *Immunity* **30**, 67–79 (2009).
480. Pui, J. C. *et al.* Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**, 299–308 (1999).
481. Hozumi, K. *et al.* Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J. Exp. Med.* **205**, 2507–2513 (2008).
482. Koch, U. *et al.* Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 2515–2523 (2008).
483. Lauritsen, J. P. H. *et al.* Marked induction of the helix-loop-helix protein Id3 promotes the gammadelta T cell fate and renders their functional maturation Notch independent. *Immunity* **31**, 565–575 (2009).
484. Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H. R. & Radtke, F. Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-

- TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity* **16**, 869–879 (2002).
485. Ciofani, M., Knowles, G. C., Wiest, D. L., Boehmer, von, H. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. *Immunity* **25**, 105–116 (2006).
486. Yashiro-Ohtani, Y. *et al.* Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes & Development* **23**, 1665–1676 (2009).
487. Bellavia, D. *et al.* Notch and Ikaros: not only converging players in T cell leukemia. *Cell Cycle* **6**, 2730–2734 (2007).
488. Bellavia, D. *et al.* Notch3 and the Notch3-upregulated RNA-binding protein HuD regulate Ikaros alternative splicing. *EMBO J.* **26**, 1670–1680 (2007).
489. Ciofani, M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Notch promotes survival of pre-T cells at the β -selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nature Immunology* **6**, 881–888 (2005).
490. Hozumi, K. *et al.* Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nature Immunology* **5**, 638–644 (2004).
491. Saito, T. *et al.* Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Elsevier*
doi:10.1016/S1074-7613(03)00111-0
492. Oyama, T. *et al.* Mastermind-1 is required for Notch signal-dependent steps in lymphocyte development in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 9764–9769 (2007).
493. Wu, L., Maillard, I., Nakamura, M., Pear, W. S. & Griffin, J. D. The transcriptional coactivator Maml1 is required for Notch2-mediated marginal zone B-cell development. *Blood* **110**, 3618–3623 (2007).
494. Tanigaki, K. *et al.* Notch–RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nature Publishing Group* **3**, 443–450 (2002).
495. Kuroda, K. *et al.* Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Elsevier*
doi:10.1016/S1074-7613(03)00029-3
496. VanderWielen, B. D. Thermodynamic, Structural, And Functional Characterization Of MINT: A Notch Signaling Corepressor - ProQuest. (2013).
497. Malecki, M. J. *et al.* Leukemia-Associated Mutations within the NOTCH1 Heterodimerization Domain Fall into at Least Two Distinct Mechanistic Classes. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 4642–4651 (2006).
498. Chiang, M. Y. *et al.* Sporadic Notch1 Mutations Found in Human T-ALL Drive T Cell Development but Not Leukemogenesis in Murine Models:

- Implications for Pathogenesis and gamma-Secretase Inhibitor (GSI) Therapy. *Blood* **108**, 707–707 (2006).
499. Chan, S. M., Weng, A. P., Tibshirani, R., Aster, J. C. & Utz, P. J. Notch signals positively regulate activity of the mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **110**, 278–286 (2007).
500. Sanchez-Martin, M. & Ferrando, A. The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **129**, 1124–1133 (2017).
501. Weng, A. P. *et al.* c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & Development* **20**, 2096–2109 (2006).
502. Loosveld, M. *et al.* Therapeutic Targeting of c-Myc in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL). *Oncotarget* **5**, 3168–3172 (2014).
503. Sarmiento, L. M. *et al.* Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27Kip1 degradation. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 157–168 (2005).
504. Kang-Decker, N. *et al.* Loss of CBP causes T cell lymphomagenesis in synergy with p27Kip1 insufficiency. *Cancer Cell* **5**, 177–189 (2004).
505. Sicinska, E. *et al.* Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Elsevier*
doi:10.1016/S1535-6108(03)00301-5
506. Beverly, L. J., Felsher, D. W. & Capobianco, A. J. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Research* **65**, 7159–7168 (2005).
507. Fransecky, L., Mochmann, L. H. & Baldus, C. D. Outlook on PI3K/AKT/mTOR inhibition in acute leukemia. *Mol Cell Ther* **3**, 2 (2015).
508. Palomero, T. *et al.* Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med* **13**, 1203–1210 (2007).
509. Shin, H. M. *et al.* Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention. *EMBO J.* **25**, 129–138 (2006).
510. Vilimas, T. *et al.* Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. *Nat Med* **13**, 70–77 (2007).
511. Medyouf, H. *et al.* Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **13**, 736–741 (2007).
512. Adler, S. H. *et al.* Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *J Immunol* **171**, 2896–2903 (2003).
513. Amsen, D. *et al.* Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* **117**, 515–526 (2004).
514. Eagar, T. N. *et al.* Notch 1 signaling regulates peripheral T cell activation. *Immunity* **20**, 407–415 (2004).
515. Minter, L. M. *et al.* Inhibitors of γ -secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nature Immunology* **6**, 680–688 (2005).

516. Maekawa, Y. *et al.* Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. *Immunity* **19**, 549–559 (2003).
517. Tacchini-Cottier, F., Allenbach, C., Otten, L. A. & Radtke, F. Notch1 expression on T cells is not required for CD4+ T helper differentiation. *European Journal of Immunology* **34**, 1588–1596 (2004).
518. Fang, T. C. *et al.* Notch Directly Regulates Gata3 Expression during T Helper 2 Cell Differentiation. *Immunity* **27**, 100–110 (2007).
519. Tu, L. *et al.* Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 1037–1042 (2005).
520. Tanaka, S. *et al.* The interleukin-4 enhancer CNS-2 is regulated by Notch signals and controls initial expression in NKT cells and memory-type CD4 T cells. *Immunity* **24**, 689–701 (2006).
521. Rutz, S., Mordmüller, B., Sakano, S. & Scheffold, A. Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *European Journal of Immunology* **35**, 2443–2451 (2005).
522. Ong, C.-T., Šedý, J. R., Murphy, K. M. & Kopan, R. Notch and presenilin regulate cellular expansion and cytokine secretion but cannot instruct Th1/Th2 fate acquisition. *PLoS ONE* **3**, e2823 (2008).
523. Meng, L. *et al.* The Notch Ligand DLL4 Defines a Capability of Human Dendritic Cells in Regulating Th1 and Th17 Differentiation. *J Immunol* 1501310 (2015). doi:10.4049/jimmunol.1501310
524. Keerthivasan, S. *et al.* Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation. *J Immunol* **187**, 692–701 (2011).
525. Mukherjee, S., Schaller, M. A., Neupane, R., Kunkel, S. L. & Lukacs, N. W. Regulation of T cell activation by Notch ligand, DLL4, promotes IL-17 production and Rorc activation. *J Immunol* **182**, 7381–7388 (2009).
526. Maekawa, Y. *et al.* Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nature Immunology* **9**, 1140–1147 (2008).
527. Palaga, T., Miele, L., Golde, T. E. & Osborne, B. A. TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-gamma production in peripheral T cells. *J Immunol* **171**, 3019–3024 (2003).
528. Kuijk, L. M. *et al.* Notch controls generation and function of human effector CD8+ T cells. *Blood* **121**, 2638–2646 (2013).
529. Fiorini, E. *et al.* Dynamic Regulation of Notch 1 and Notch 2 Surface Expression during T Cell Development and Activation Revealed by Novel Monoclonal Antibodies. *J Immunol* **183**, 7212–7222 (2009).
530. Mathieu, M., Cotta-Grand, N., Daudelin, J.-F., Thébault, P. & Labrecque, N. Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8(+) T-cell activation. *Immunol. Cell Biol.* **91**, 82–88 (2013).

531. Cho, O. H. *et al.* Notch regulates cytolytic effector function in CD8⁺ T cells. *J Immunol* **182**, 3380–3389 (2009).
532. Tran, I. T. *et al.* Blockade of individual Notch ligands and receptors controls graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* **123**, 1590–1604 (2013).
533. Chung, J. *et al.* Fibroblastic niches prime T cell alloimmunity through Delta-like Notch ligands. *J. Clin. Invest.* **127**, 1574–1588 (2017).
534. Sugimoto, K. *et al.* Notch2 Signaling Is Required for Potent Antitumor Immunity In Vivo. *J Immunol* **184**, 4673–4678 (2010).
535. Zhang, Y. *et al.* Notch signaling is a critical regulator of allogeneic CD4⁺ T-cell responses mediating graft-versus-host disease. *Blood* **117**, 299–308 (2011).
536. Sandy, A. R. *et al.* Notch Signaling Regulates T Cell Accumulation and Function in the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* **191**, 1606–1613 (2013).
537. Baeuerle, P. A., Lenardo, M., Pierce, J. W. & Baltimore, D. Phorbol-ester-induced activation of the NF-kappa B transcription factor involves dissociation of an apparently cytoplasmic NF-kappa B/inhibitor complex. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **53 Pt 2**, 789–798 (1988).
538. Bellavia, D. *et al.* Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *EMBO J.* **19**, 3337–3348 (2000).
539. Cheng, P. *et al.* Notch-1 regulates NF-kappaB activity in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* **167**, 4458–4467 (2001).
540. Guan, E. *et al.* T cell leukemia-associated human Notch/translocation-associated Notch homologue has I kappa B-like activity and physically interacts with nuclear factor-kappa B proteins in T cells. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 2025–2032 (1996).
541. Wang, J. *et al.* Human Notch-1 inhibits NF-kappa B activity in the nucleus through a direct interaction involving a novel domain. *J Immunol* **167**, 289–295 (2001).
542. Mathieu, M. E. L., Cotta-Grand, N., Daudelin, J.-F. C. O., la Th eacute bault, P. E. & Labrecque, N. Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8⁺ T-cell activation. *Immunol. Cell Biol.* **91**, 82–88 (2012).
543. Cho, O. H. *et al.* Notch Regulates Cytolytic Effector Function in CD8⁺ T Cells. *J Immunol* **182**, 3380–3389 (2009).
544. Radtke, F., MacDonald, H. R. & Tacchini-Cottier, F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nature Reviews Immunology* **13**, 427–437 (2013).
545. Bailis, W. *et al.* Notch simultaneously orchestrates multiple helper T cell programs independently of cytokine signals. *Immunity* **39**, 148–159 (2013).
546. Adler, S. H. *et al.* Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *J Immunol* **171**, 2896–2903 (2003).

547. Sade, H., Krishna, S. & Sarin, A. The Anti-apoptotic Effect of Notch-1 Requires p56 lck-dependent, Akt/PKB-mediated Signaling in T Cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 2937–2944 (2004).
548. Germar, K. *et al.* T-cell factor 1 is a gatekeeper for T-cell specification in response to Notch signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 20060–20065 (2011).
549. Maillard, I. *et al.* The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 2239–2245 (2006).
550. Deftos, M. L., He, Y.-W., Ojala, E. W. & Bevan, M. J. Correlating Notch Signaling with Thymocyte Maturation. *Immunity* **9**, 777–786 (1998).
551. Xu, Y., Davidson, L., Alt, F. W. & Baltimore, D. Function of the pre-T-cell receptor alpha chain in T-cell development and allelic exclusion at the T-cell receptor beta locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 2169–2173 (1996).
552. Haque, R. *et al.* c-Myc-Induced Survivin Is Essential for Promoting the Notch-Dependent T Cell Differentiation from Hematopoietic Stem Cells. *Genes* *2017, Vol. 8, Page 97* **8**, 97 (2017).
553. Eagar, T. N. *et al.* Notch 1 signaling regulates peripheral T cell activation. *Immunity* **20**, 407–415 (2004).
554. Elyaman, W. *et al.* Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells. *Immunity* **36**, 623–634 (2012).
555. Anastasi, E. *et al.* Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J Immunol* **171**, 4504–4511 (2003).
556. Sandy, A. R. *et al.* T cell-specific notch inhibition blocks graft-versus-host disease by inducing a hyporesponsive program in alloreactive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **190**, 5818–5828 (2013).
557. Tran, I. T. *et al.* Blockade of individual Notch ligands and receptors controls graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* **123**, 1590–1604 (2013).
558. Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. & Ahmed, R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* **77**, 4911–4927 (2003).
559. Backer, R. A. *et al.* A central role for Notch in effector CD8+ T cell differentiation. *Nature Immunology* **15**, 1143–1151 (2014).
560. Yang, X. *et al.* Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Developmental Biology* **269**, 81–94 (2004).
561. McCright, B., Lozier, J. & Gridley, T. Generation of new Notch2 mutant alleles. *Genesis* **44**, 29–33 (2006).

562. Rodig, N. *et al.* Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8⁺ T cell activation and cytolysis. *European Journal of Immunology* **33**, 3117–3126 (2003).
563. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2005).
564. Wood, S. *et al.* Transient blockade of delta-like Notch ligands prevents allograft rejection mediated by cellular and humoral mechanisms in a mouse model of heart transplantation. *J Immunol* **194**, 2899–2908 (2015).
565. Lafkas, D. *et al.* Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. *Nature* **528**, 127–131 (2015).
566. Wu, Y. *et al.* Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* **464**, 1052–1057 (2010).
567. Mathieu, M., Duval, F., Daudelin, J.-F. & Labrecque, N. The Notch Signaling Pathway Controls Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Differentiation but Is Dispensable for Memory Generation. *J Immunol* 1402837 (2015). doi:10.4049/jimmunol.1402837
568. Tran, I. T. *et al.* Blockade of individual Notch ligands and receptors controls graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* **123**, 1590–1604 (2013).
569. Roderick, J. E. *et al.* Therapeutic targeting of NOTCH signaling ameliorates immune-mediated bone marrow failure of aplastic anemia. *J. Exp. Med.* **210**, 1311–1329 (2013).
570. Wu, T. *et al.* TCF1 Is Required for the T Follicular Helper Cell Response to Viral Infection. *Cell Rep* **12**, 2099–2110 (2015).
571. Khan, S. H. & Badovinac, V. P. *Listeria monocytogenes*: a model pathogen to study antigen-specific memory CD8 T cell responses. *Semin Immunopathol* **37**, 301–310 (2015).
572. Ladel, C. H., Flesch, I. E., Arnoldi, J. & Kaufmann, S. H. Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **153**, 3116–3122 (1994).
573. Joshi, N. S. *et al.* Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* **27**, 281–295 (2007).
574. Ji, Y. *et al.* Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8⁺ T cells. *Nature Immunology* **12**, 1230–1237 (2011).
575. Chen, R. *et al.* In vivo RNA interference screens identify regulators of antiviral CD4(+) and CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* **41**, 325–338 (2014).
576. Almeida, L., Lochner, M., Berod, L. & Sparwasser, T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin. Immunol.* **28**, 514–524 (2016).

577. O'Donnell, K. A. *et al.* Activation of transferrin receptor 1 by c-Myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 2373–2386 (2006).
578. Laky, K., Evans, S., Perez-Diez, A. & Fowlkes, B. J. Notch signaling regulates antigen sensitivity of naive CD4⁺ T cells by tuning co-stimulation. *Immunity* **42**, 80–94 (2015).
579. Slaninova, V. *et al.* Notch stimulates growth by direct regulation of genes involved in the control of glycolysis and the tricarboxylic acid cycle. *Open Biol* **6**, 150155 (2016).
580. Maekawa, Y. *et al.* Notch controls the survival of memory CD4⁺ T cells by regulating glucose uptake. *Nat Med* **21**, 55–61 (2015).
581. Landor, S. K.-J. *et al.* Hypo- and hyperactivated Notch signaling induce a glycolytic switch through distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 18814–18819 (2011).
582. Wong, G. W., Knowles, G. C., Mak, T. W., Ferrando, A. A. & Zúñiga-Pflücker, J. C. HES1 opposes a PTEN-dependent check on survival, differentiation, and proliferation of TCR β -selected mouse thymocytes. *Blood* **120**, 1439–1448 (2012).
583. Lund, R. J., Chen, Z., Scheinin, J. & Lahesmaa, R. Early target genes of IL-12 and STAT4 signaling in th cells. *J Immunol* **172**, 6775–6782 (2004).
584. Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., Immunity, W. S.2003. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12R β 2 chain or T-bet. *Elsevier*
doi:10.1016/S1074-7613(03)00057-8
585. Pham, N. L. L., Badovinac, V. P. & Harty, J. T. A Default Pathway of Memory CD8 T Cell Differentiation after Dendritic Cell Immunization Is Deflected by Encounter with Inflammatory Cytokines during Antigen-Driven Proliferation. *J Immunol* **183**, 2337–2348 (2009).
586. Badovinac, V. P., Tvinnereim, A. R. & Harty, J. T. Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* **290**, 1354–1358 (2000).
587. Teijaro, J. R. *et al.* Cutting edge: Tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection. *J Immunol* **187**, 5510–5514 (2011).
588. Galkina, E. *et al.* Preferential migration of effector CD8⁺ T cells into the interstitium of the normal lung. *J. Clin. Invest.* **115**, 3473–3483 (2005).
589. Jung, Y. W., Rutishauser, R. L., Joshi, N. S., Haberman, A. M. & Kaech, S. M. Differential localization of effector and memory CD8 T cell subsets in lymphoid organs during acute viral infection. *J Immunol* **185**, 5315–5325 (2010).

590. Kurachi, M. *et al.* Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8(+) T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration. *J. Exp. Med.* **208**, 1605–1620 (2011).
591. Tiberi, L. *et al.* BCL6 controls neurogenesis through Sirt1-dependent epigenetic repression of selective Notch targets. *Nat Neurosci* **15**, 1627–1635 (2012).
592. Geimer Le Lay, A. S. *et al.* The Tumor Suppressor Ikaros Shapes the Repertoire of Notch Target Genes in T Cells. *Science Signaling* **7**, ra28–ra28 (2014).
593. Kleinmann, E., Geimer Le Lay, A.-S., Sellars, M., Kastner, P. & Chan, S. Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 7465–7475 (2008).
594. Kathrein, K. L., Chari, S. & Winandy, S. Ikaros directly represses the notch target gene *Hes1* in a leukemia T cell line: implications for CD4 regulation. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 10476–10484 (2008).
595. Clambey, E. T. *et al.* The Ikaros transcription factor regulates responsiveness to IL-12 and expression of IL-2 receptor alpha in mature, activated CD8 T cells. *PLoS ONE* **8**, e57435 (2013).
596. O'Brien, S. *et al.* Ikaros imposes a barrier to CD8+ T cell differentiation by restricting autocrine IL-2 production. *J Immunol* **192**, 5118–5129 (2014).
597. Kim, E. H. *et al.* Signal Integration by Akt Regulates CD8 T Cell Effector and Memory Differentiation. *J Immunol* **188**, 4305–4314 (2012).
598. Macintyre, A. N. *et al.* Protein Kinase B Controls Transcriptional Programs that Direct Cytotoxic T Cell Fate but Is Dispensable for T Cell Metabolism. *Immunity* **34**, 224–236 (2011).
599. Bergmann, C. C., Altman, J. D., Hinton, D. & Stohlman, S. A. Inverted immunodominance and impaired cytolytic function of CD8+ T cells during viral persistence in the central nervous system. *J Immunol* **163**, 3379–3387 (1999).
600. Vogel, T. U., Allen, T. M., Altman, J. D. & Watkins, D. I. Functional impairment of simian immunodeficiency virus-specific CD8+ T cells during the chronic phase of infection. *J. Virol.* **75**, 2458–2461 (2001).
601. Goepfert, P. A. *et al.* A Significant Number of Human Immunodeficiency Virus Epitope-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Detected by Tetramer Binding Do Not Produce Gamma Interferon. *J. Virol.* **74**, 10249–10255 (2000).
602. Kostense, S. *et al.* Persistent numbers of tetramer+ CD8+ T cells, but loss of interferon- γ + HIV-specific T cells during progression to AIDS. *Blood* **99**, 2505–2511 (2002).
603. Shankar, P. *et al.* Impaired function of circulating HIV-specific CD8+ T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* **96**, 3094–3101 (2000).

604. Trimble, L. A. & Lieberman, J. Circulating CD8 T Lymphocytes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Have Impaired Function and Downmodulate CD3 ζ , the Signaling Chain of the T-Cell Receptor Complex. *Blood* **91**, 585–594 (1998).
605. Lechner, F. *et al.* Analysis of Successful Immune Responses in Persons Infected with Hepatitis C Virus. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 1499–1512 (2000).
606. Urbani, S. *et al.* Virus-specific CD8⁺ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J. Virol.* **76**, 12423–12434 (2002).
607. Finnefrock, A. C. *et al.* PD-1 Blockade in Rhesus Macaques: Impact on Chronic Infection and Prophylactic Vaccination. *J Immunol* **182**, 980–987 (2009).
608. Larrubia, J. R., Benito-Martínez, S., of, J. M. W. J.2009. Costimulatory molecule programmed death-1 in the cytotoxic response during chronic hepatitis C. *ncbi.nlm.nih.gov* **15**, 5129 (2009).
609. Mueller, S. N. & Germain, R. N. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nature Publishing Group* **9**, 618–629 (2009).
610. Mueller, S. N. *et al.* Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 15430–15435 (2007).
611. Scandella, E. *et al.* Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nature Immunology* **9**, 667–675 (2008).
612. Mungamuri, S. K., Yang, X., Thor, A. D. & Somasundaram, K. Survival Signaling by Notch1: Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)–Dependent Inhibition of p53. *Cancer Research* **66**, 4715–4724 (2006).
613. Haque, R. *et al.* c-Myc-Induced Survivin Is Essential for Promoting the Notch-Dependent T Cell Differentiation from Hematopoietic Stem Cells. *Genes* *2017, Vol. 8, Page 97* **8**, 97 (2017).
614. Blackburn, S. D. *et al.* Tissue-specific differences in PD-1 and PD-L1 expression during chronic viral infection: implications for CD8 T-cell exhaustion. *J. Virol.* **84**, 2078–2089 (2010).
615. Pascutti, M. F. *et al.* Enhanced CD8 T cell responses through GITR-mediated costimulation resolve chronic viral infection. *PLoS Pathog* **11**, e1004675 (2015).

616. Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8+ T cells directly within the tumor microenvironment. *2*, 1–14 (2014).
617. Callahan, M. K. & Wolchok, J. D. At the bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology* **94**, 41–53 (2013).
618. Curran, M. A., Kim, M., Montalvo, W., Al-Shamkhani, A. & Allison, J. P. Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production. *PLoS ONE* **6**, e19499 (2011).
619. Matsuzaki, J. *et al.* Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 7875–7880 (2010).
620. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Publishing Group* **10**, 29–37 (2009).
621. Richter, K., Agnellini, P. & Oxenius, A. On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *International Immunology* **22**, 13–23 (2010).
622. Woo, S.-R. *et al.* Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Research* **72**, 917–927 (2012).
623. Fitzgerald, K., Harrington, A. & Leder, P. Ras pathway signals are required for notch-mediated oncogenesis. *Oncogene* **19**, 4191–4198 (2000).
624. Thauland, T. J. & Butte, M. J. Taking T cell priming down a Notch: signaling through Notch receptors enhances T cell sensitivity to antigen. *Immunity* **42**, 6–8 (2015).
625. Lee, K.-S. *et al.* Roles of PINK1, mTORC2, and mitochondria in preserving brain tumor-forming stem cells in a noncanonical Notch signaling pathway. *Genes & Development* **27**, 2642–2647 (2013).
626. Rao, R. R., Li, Q., Bupp, M. R. G. & Shrikant, P. A. Transcription Factor Foxo1 Represses T-bet-Mediated Effector Functions and Promotes Memory CD8+ T Cell Differentiation. *Immunity* **36**, 374–387 (2012).
627. Huang, Y. *et al.* Resuscitating Cancer Immunosurveillance: Selective Stimulation of DLL1-Notch Signaling in T cells Rescues T-cell Function and Inhibits Tumor Growth. *Cancer Research* **71**, 6122–6131 (2011).
628. Sierra, R. A. *et al.* Rescue of Notch-1 Signaling in Antigen-Specific CD8+ T Cells Overcomes Tumor-Induced T-cell Suppression and Enhances Immunotherapy in Cancer. *Cancer Immunology Research* **2**, 800–811 (2014).

629. Biktasova, A. K. *et al.* Multivalent Forms of the Notch Ligand DLL-1 Enhance Antitumor T-cell Immunity in Lung Cancer and Improve Efficacy of EGFR-Targeted Therapy. *Cancer Research* **75**, 4728–4741 (2015).
630. Thounaojam, M. C. *et al.* Bortezomib enhances expression of effector molecules in anti-tumor CD8⁺ T lymphocytes by promoting Notch-nuclear factor- κ B crosstalk. *Oncotarget* **6**, 32439–32455 (2015).
631. Kim, E. H. & Suresh, M. Role of PI3K/Akt signaling in memory CD8 T cell differentiation. *Front. Immunol.* **4**, 20 (2013).
632. Ye, Q. *et al.* Small molecule activation of NOTCH signaling inhibits acute myeloid leukemia. *Scientific Reports* **6**, 26510 (2016).
633. Hand, T. W. *et al.* Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 16601–16606 (2010).
634. Chung, J. *et al.* Fibroblastic niches prime T cell alloimmunity through Delta-like Notch ligands. *J. Clin. Invest.* **127**, 1574–1588 (2017).
635. Biktasova, A. K. *et al.* Multivalent Forms of the Notch Ligand DLL-1 Enhance Antitumor T-cell Immunity in Lung Cancer and Improve Efficacy of EGFR-Targeted Therapy. *Cancer Research* **75**, 4728–4741 (2015).
636. Ye, Q. *et al.* Small molecule activation of NOTCH signaling inhibits acute myeloid leukemia. 1–11 (2016). doi:10.1038/srep26510