

Université de Montréal

**Étude de la différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs et mémoires : rôle de la cellule présentatrice d'antigène et de la voie de signalisation Notch**

par

Mélissa Mathieu

Département microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de Ph.D.

en microbiologie et immunologie

Septembre, 2014

© Mélissa Mathieu, 2014



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse est intitulée  
Étude de la différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs et mémoires : rôle de la cellule  
présentatrice d'antigène et de la voie de signalisation Notch

Présentée par :  
Mélicca Mathieu

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :  
Dr Étienne Gagnon, président-rapporteur  
Dre Nathalie Labrecque, directeur de recherche  
Dr Hélène Decaluwe, membre du jury  
Dr Ivan Maillard, examinateur externe  
Dr Jean-Sébastien Delisle, représentant du doyen de la FESP



## Résumé

Lors d'une infection par un pathogène, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs (LTn) spécifiques de l'antigène sont activés, prolifèrent et se différencient en LT effecteurs (LTe). Les LTe produisent différentes cytokines et acquièrent une activité cytotoxique menant à l'élimination du pathogène. Seulement 5 à 10 % des LTe survivront et se différencieront en LT mémoires (LTm), qui sont capables de répondre plus rapidement lors d'une seconde infection par le même pathogène, contribuant au succès de la vaccination. Toutefois, la compréhension de l'ensemble des mécanismes régulant le développement des LTe et des LTm demeure incomplète. Afin de mieux comprendre les signaux requis pour la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> lors de la réponse immune, nous avons posé deux hypothèses.

Nous avons d'abord proposé que différentes cellules présentatrices d'antigène (CPA) fournissent différents signaux au moment de la reconnaissance antigénique influençant ainsi le devenir des LT CD8<sup>+</sup>. Vu leur potentiel d'utilisation en immunothérapie, nous avons comparé la capacité d'activation des LT CD8<sup>+</sup> par les lymphocytes B activés via le CD40 (CD40-B) et les cellules dendritiques (CD). Nous avons montré que l'immunisation avec des CD40-B induit une réponse effectrice mais, contrairement à l'immunisation avec des CD, pratiquement aucun LTm n'est généré. Les LTe générés sont fonctionnels puisqu'ils sécrètent des cytokines, ont une activité cytotoxique et contrôlent une infection avec *Listeria monocytogenes* (*Lm*). Nous proposons qu'une sécrétion plus faible de cytokines par les CD40-B ainsi qu'une interaction plus courte et moins intime avec les LT CD8<sup>+</sup> comparativement aux CD contribuent au défaut de différenciation des LTm observé lors de la vaccination avec les CD40-B.

Ensuite, nous posé l'hypothèse que, parmi les signaux fournis par les CPA au moment de la reconnaissance antigénique, la voie de signalisation Notch influence le développement des LTe, mais aussi des LTm CD8<sup>+</sup> en instaurant un programme génétique particulier. D'abord, grâce à un système *in vitro*, le rôle de la signalisation Notch dans les moments précoces suivant l'activation du LT CD8<sup>+</sup> a été étudié. Ce système nous a permis de démontrer

que la voie de signalisation Notch régule directement l'expression de la molécule PD-1. Ensuite, grâce à des souris où il y a délétion des récepteurs Notch1 et Notch2 seulement chez les LT CD8<sup>+</sup> matures, un rôle de la voie de signalisation Notch dans la réponse immune des LT CD8<sup>+</sup> a été démontré. Nos résultats démontrent que suite à une infection avec *Lm* ou à une immunisation avec des CD, la signalisation Notch favorise le développement de LTe, exprimant fortement KLRG1 et faiblement CD127, destinés à mourir par apoptose. Toutefois, la signalisation Notch n'a pas influencé la génération de LTm. De façon très intéressante, l'expression des récepteurs Notch influence la production d'IFN- $\gamma$  en fonction du contexte d'activation. En effet, suite à une infection avec *Lm*, l'absence des récepteurs Notch n'affecte pas la production d'IFN- $\gamma$  par les LTe, alors qu'elle est diminuée suite à une immunisation avec des CD suggérant un rôle dépendant du contexte pour la voie de signalisation Notch.

Nos résultats permettent une meilleure compréhension des signaux fournis par les différentes CPA et de la voie de signalisation Notch, donc des mécanismes moléculaires régulant la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> lors de la réponse immunitaire, ce qui pourrait ultimement permettre d'améliorer les stratégies de vaccination.

**Mots-clés :** lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, cellules présentatrices d'antigènes (CPA), cellules dendritiques (CD), lymphocytes B activés via le CD40 (CD40-B), voie de signalisation Notch, PD-1 (*Programmed death-1*)

## Abstract

Following an infection with a pathogen, antigen-specific naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (Tn) will proliferate and differentiate into effector (Te) cells. Those Te cells will produce different cytokines and acquire a cytotoxic activity, leading to pathogen clearance. Only 5 to 10 % of Te cells will survive and differentiate into memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (Tm) able to respond rapidly following a second encounter with the same pathogen, contributing to the success of vaccination. However, the mechanisms regulating Te and Tm cells development remain incompletely understood. To better understand the signals required for CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during an immune response, we proposed two hypotheses.

First, we propose that different antigen presenting cells (APCs) can deliver different signals to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes at the time of priming leading to different outcome. Given their potential for use in immunotherapy, we compared the ability of CD40-activated B lymphocytes (CD40-B) and dendritic cells (DCs) to activate CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. We have shown that CD40-B cell immunisation leads to an effector response but very few Tm cells are generated compared to DC immunisation. The Te cells generated following CD40-B cell immunisation are functional because they secrete cytokine, are cytotoxic and control a *Listeria monocytogenes* (*Lm*) infection. We propose that CD40-B cells secrete less cytokines and interact during shorter period of time with the CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, without engulfment, contributing to the decreased Tm generation observed following immunisation with CD40-B cells.

Second, among the signals provided by APC at the time of CD8<sup>+</sup> T lymphocyte priming, we have hypothesised that the Notch signalling pathway influences Te and Tm cell differentiation by inducing a particular genetic program. Using an *in vitro* system, we first studied the role of the Notch signalling pathway in the hours following CD8<sup>+</sup> T lymphocyte priming. We demonstrated that Notch signalling directly regulates PD-1 expression. Then, studying mice where *Notch1* and *Notch2* receptor genes are deleted only in mature CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, we characterised the role of the Notch signalling pathway on Te and Tm

differentiation during an immune response. Our results show that following Lm infection or a DC immunisation, the Notch signalling pathway promotes the differentiation of short lived effector cells Te cells (KLRG1<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>) meant to die by apoptosis. However, the Notch signalling pathway did not influence the generation of CD8<sup>+</sup> Tm cells. Most interestingly, IFN- $\gamma$  regulation by the Notch signalling pathway depends on the activation context. Indeed, following Lm infection, lack of Notch receptors does not impact IFN- $\gamma$  secretion by Te cells while it is significantly decreased following a DC immunisation suggesting a context dependant role for the Notch signalling pathway.

Our findings provide a better understanding of the key signals provided by APC as well as the Notch signalling pathway, and thus the molecular mechanisms leading to CD8<sup>+</sup> lymphocyte effector and memory generation which is crucial as this knowledge may ultimately lead to improved vaccination.

**Keywords** : CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, antigen presenting cells (APCs), dendritic cells (DCs), CD40-actived B lymphocytes (CD40-B), Notch signalling pathway, PD-1 (*Programmed death-1*)

# Table des matières

Résumé.....	v
Abstract.....	vii
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xxii
Introduction.....	1
1.1 La réponse immunitaire.....	1
1.1.1 La réponse innée.....	1
1.1.2 La réponse adaptative.....	2
1.1.2.1 Les lymphocytes B (LB).....	2
1.1.2.2 Les lymphocytes T (LT).....	3
1.1.2.2.1 Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	3
1.1.2.2.2 Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	5
1.2 Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).....	6
1.2.1 La présentation antigénique.....	7
1.2.1.1 La présentation par le CMH I.....	7
1.2.1.2 La présentation par le CMH II.....	9
1.2.2 Les CPA et l'immunothérapie du cancer.....	10
1.2.3 Les cellules dendritiques.....	12
1.2.3.1 Les CD dérivées de la moelle osseuse.....	13
1.2.3.2 La vaccination avec les CD.....	14
1.2.4 Les lymphocytes B.....	16
1.2.4.1 L'influence des LB sur la réponse des LT.....	16
1.2.4.2 Les LB activés via le CD40 (CD40-B).....	18
1.2.4.3 La vaccination avec les CD40-B.....	22
1.3 La réponse effectrice et mémoire des LT CD8 <sup>+</sup> .....	23

1.3.1 La phase d'expansion.....	24
1.3.1.1 Signal 1 : la reconnaissance de l'antigène .....	25
1.3.1.1.1. La signalisation du RCT .....	25
1.3.1.1.2 La synapse immunologique .....	27
1.3.1.1.3 L'influence sur la réponse des LT CD8 <sup>+</sup> .....	29
1.3.1.2 Signal 2 : la costimulation et la coinhibition .....	29
1.3.1.2.1 La superfamille des immunoglobulines de type CD28.....	30
1.3.1.2.1.1 CD28.....	31
1.3.1.2.1.2 CTLA-4.....	33
1.3.1.2.1.3 PD-1 .....	34
1.3.1.2.2 La superfamille des récepteurs TNF .....	37
1.3.1.2.2.1 CD27.....	39
1.3.1.2.2.2. 4-1BB.....	40
1.3.1.2.2.3 OX40.....	42
1.3.1.2.2.4 CD30.....	43
1.3.1.2.2.5 GITR.....	44
1.3.1.3 Signal 3: les cytokines .....	45
1.3.1.3.1 IL-12 .....	45
1.3.1.3.2 Interférons de type I.....	47
1.3.1.3.3 IL-2 .....	48
1.3.1.4 L'interaction avec la cellule présentatrice d'antigène .....	49
1.3.1.5 Les propriétés et les phénotypes cellulaires des LT effecteurs.....	50
1.3.1.6 L'épuisement des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	52
1.3.2 La phase de contraction .....	53
1.3.3 La phase mémoire .....	55
1.3.3.1 Les populations de LTm .....	55
1.3.3.2 Les propriétés et les phénotypes cellulaires des LT mémoires CD8 <sup>+</sup> .....	56
1.3.3.3 L'homéostasie et la survie des LT mémoires CD8 <sup>+</sup> .....	58
1.3.4 Les modèles de différenciation des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> mémoires .....	60
1.3.4.1 Le modèle des précurseurs distincts .....	61
1.3.4.2 Le modèle de la différenciation linéaire .....	62

1.3.4.3 Le modèle du potentiel décroissant.....	62
1.3.4.4 Le modèle de la force du signal .....	63
1.3.4.5 Le modèle de la division asymétrique .....	63
1.3.5 Les facteurs de transcription impliqués dans la réponse des LT CD8 <sup>+</sup> .....	65
1.3.5.1 T-bet et Eomes .....	66
1.3.5.2 Blimp-1 et Bcl-6 .....	67
1.3.5.3 Id2 et Id3 .....	69
1.3.6 Les voies/interactions/molécules influençant la réponse des LT CD8 <sup>+</sup> .....	71
1.3.6.1 Les molécules d'adhésion.....	71
1.3.6.5 L'aide des LT CD4 <sup>+</sup> .....	71
1.3.6.6 La voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine .....	73
1.4 La voie de signalisation Notch.....	74
1.4.1 La biologie des récepteurs Notch.....	74
1.4.2 Les mécanismes généraux de signalisation.....	76
1.4.2.1 La signalisation canonique.....	76
1.4.2.2 La signalisation non canonique.....	78
1.4.3 Les interactions avec d'autres voies .....	79
1.4.3.1 La voie de signalisation du RCT.....	79
1.4.3.2 Le facteur de transcription Bcl-6 .....	80
1.4.3.3 Le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ .....	80
1.4.3.4 La $\beta$ -caténine .....	81
1.4.4 La voie de signalisation Notch et les lymphocytes T .....	82
1.4.4.1 Le rôle de Notch lors de la réponse des LT CD4 <sup>+</sup> .....	82
1.4.4.2 Le rôle de Notch lors de la réponse des LT CD8 <sup>+</sup> .....	84
1.5 Raisonnement et hypothèses .....	89
Résultats .....	92
Article I. CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naïve CD8 <sup>+</sup> T cells to generate effector but not memory T cells .....	92
Article II. Notch signalling regulates PD-1 expression during CD8 <sup>+</sup> T cell activation.....	135

Article III: Context dependent role for the Notch signalling pathway during CD8 <sup>+</sup> T cell responses.....	160
Discussion.....	188
3.1 L'activation des LT CD8 <sup>+</sup> par les CD40-B et les CD.....	188
3.1.1 Introduction.....	188
3.1.2 La caractérisation des LTe.....	190
3.1.2.1 Le phénotype extracellulaire des LTe.....	190
3.1.2.2 La fonctionnalité des LTe.....	192
3.1.2.3 Les facteurs de transcription induits.....	193
3.1.3 Les signaux perçus au moment de l'activation.....	196
3.1.3.1 La qualité du signal 1 : la présentation de l'antigène.....	196
3.1.3.2 La qualité du signal 2 : la costimulation.....	197
3.1.3.3 La qualité du signal 3 : l'inflammation.....	198
3.1.4 La qualité de l'interaction entre le LB et le LT CD8 <sup>+</sup> .....	202
3.1.5 Modèle illustrant l'activation des LT CD8 <sup>+</sup> par les CD40-B et les CD.....	204
3.1.6 Perspectives.....	205
3.1.6.1 L'utilisation thérapeutique des CD40-B.....	205
3.1.6.2 Avancement des connaissances.....	207
3.2 Le rôle de la voie de signalisation de Notch lors de la réponse immune des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	208
3.2.1 La régulation de l'expression de PD-1.....	208
3.2.1.1 La régulation directe au promoteur de PD-1.....	208
3.2.1.2 La régulation de l'expression de PD-1 <i>in vivo</i> .....	211
3.2.2 Le rôle de Notch lors de la réponse immune des LT CD8 <sup>+</sup> .....	213
3.2.2.1 La voie de signalisation de Notch et la réponse effectrice.....	213
3.2.2.1.1 Les phénotypes SLEC et MPEC.....	213
3.2.2.1.2 La sécrétion de cytokines et la fonctionnalité.....	218
3.2.2.2 La voie de signalisation de Notch et la génération de LTm.....	221
3.2.3 Perspectives.....	223
3.2.4 Conclusions.....	226

Bibliographie.....	i
Annexe 1:Expression des molécules de costimulation de la famille des récepteurs TNF par les CD40-B et les CD .....	xxxvii
Annexe 2: Les CD40-B et les CD produisent différentes cytokines .....	xxxviii
Annexe 3:L'ajout d'inflammation au moment de l'immunisation avec les CD40-B augmente la generation de LTm CD8 <sup>+</sup> .....	xxxix
Annexe 4: IL-6 production by dendritic cells is dispensable for CD8 <sup>+</sup> memory T-cell generation.....	xli
Annexe 5: L'activation des LT CD8 <sup>+</sup> par les CD et les CD40-B <i>in vitro</i> induit l'expression de différents gènes .....	xlvi
Annexe 6 : La signalisation Notch est requise pour l'augmentation de l'expression de CD25 chez les LTe CD8 <sup>+</sup> .....	xlvi
Annexe 7 : Production similaire de TNF- $\alpha$ par les LTe suite à l'infection avec <i>Listeria</i> ou l'immunisation avec les CD.....	xlvii
Annexe 8 : L'expression des récepteurs Notch est requise pour une expression élevée de Bcl-2 chez les LTm suite à une immunisation avec les CD .....	xlviii

## Liste des tableaux

Tableau 1. Les propriétés des CD et des CD40-B associées à leur fonction de CPA

Tableau 2. Le rôle des récepteurs TNF lors de la réponse immune des LT CD8<sup>+</sup>

## Liste des figures

Figure 1. Les différents sous-types de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Figure 2. La présentation de l'Ag par le CMH I et le CMH II

Figure 3. Les propriétés des cellules tumorales

Figure 4. Représentation de la réponse des LT CD8<sup>+</sup> et des principales populations générées

Figure 5. La Signalisation du RCT.

Figure 6. La synapse immunologique

Figure 7. Les récepteurs de la superfamille CD28

Figure 8. La signalisation via le récepteur CD28

Figure 9. Schématisation des éléments régulateurs connus au gène *Pdcd1*

Figure 10. Les récepteurs TNF, leur TRAF et les voies de signalisation induites

Figure 11. Les cinq modèles de différenciation des LT CD8<sup>+</sup> mémoires

Figure 12. Expression relative des facteurs de transcription par les SLEC et les MPEC.

Figure 13. Schéma des récepteurs et des ligands de Notch

Figure 14. La voie de signalisation Notch

Figure 15. Modèle d'activation d'un LT CD8<sup>+</sup> par une CD40-B et une cellule dendritique

Figure 16. Schéma du site d'interaction de RPBJK et du NICD au gène *Pdcd1* ainsi que des autres facteurs de transcription connus pour leur liaison directe au promoteur

Figure 17. Mécanisme proposé permettant à la voie de signalisation Notch de promouvoir la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> en SLEC

Figure 18. Schéma représentant l'induction de la transcription de l'IFN- $\gamma$  chez les LTe suite à l'infection avec *Lm* ou l'immunisation avec les CD

Figure 19. L'inhibition probable de la signalisation Notch par Bcl-6 lors de la réponse immune des LT CD8<sup>+</sup>

## Liste des abréviations

a.a.: acide aminé

Ac: anticorps

ACAD: *Activation Cell-Autonomous Death*

Ag: antigène

AICD: *Activation Induced-Cell Death*

ANK: répétitions ankyrines

APAF: *apoptotic-protease-activating factor 1*

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

Bcl-6: *B-cell lymphoma 6*

BCoR : Bcl6 corépresseur

BID: *BH3-interacting-domain death agonist*

BIM: *Bcl-2-interacting mediator of cell death*

BIMEL: BIM Extra Long

Blimp-1: *B-lymphocyte-induced maturation protein 1*

BMDC: bone marrow derived dendritic cells

BOK: CPA artificielles exprimant H2-K<sup>b</sup>-OVA et CD80

CaMK: *Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependant protein kinases*

CD: cellules dendritique

CD40-B: LB activés via le CD40

CDc: CD classiques

CDp: CD plasmacytoïdes

CDR: *complementary-determining region*

CD Tip: *TNF-and iNOS-producing CD*

ChIP: immunoprécipitation de la chromatine

CL: cellules de Langerhans

CLP: progéniteur lymphoïde commun

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CMH I: CMH de classe I

CMH II: CMH de classe II

CoA: coactivateur  
CoR: corépresseur  
CPA: cellule présentatrice d'antigène  
CR: conserved region  
CR: *cystein rich*  
CRE: *AMP-responsive element*  
CSL: CBF-1, Suppressor of Hairless et LAG-1  
cSMAC: *central supramolecular activation complex*  
CTCF: *insulator protein CCCTC-binding factor*  
CTLA-4: *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*  
DAMP: *danger-associated molecular patterns*  
DD: *death domain*  
DII1: Delta-like 1  
DII3: Delta-like 3  
DII4: Delta-like 4  
DNMAML: dominant négatif de MAML  
DPEC: *Double Positive Effector Cells*  
DSL: *Delta, Serrate and Lag2*  
dSMAC: *distal supramolecular activation complex*  
DTR: *Diphtheria toxin receptor*  
EAE: *Experimental autoimmune encephalomyelitis*  
EEC: *Early Effectors Cells*  
EGF: *Epidermal Growth Factor-like repeats*  
ERAAP: *ER-associated aminopeptidases*  
ESC: *embryonic stem cells*  
ESR1: *enhancer of split related 1*  
ETP : *early thymic progenitor*  
EYFP: *enhancer yellow fluorescence protein*  
FADD: Fas-associated DD  
FDC: CD folliculaires  
FIH1: *factor inhibiting HIF-1 $\alpha$*

FMO : *fluorescence minus one*  
GP<sub>33</sub>: peptide de la glycoprotéine de LCMV  
GVHD: *graft versus host disease*  
GRB2: *growth factor receptor-bound protein 2*  
GSI: d'inhibiteur de  $\gamma$ -secretase  
GSK3 $\beta$ : *glycogen synthase kinase 3 $\beta$*   
HDAC: histones déacétylases  
Hes: *Hairy/enhancer of split*  
HIF-1 $\alpha$ : *Hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$*   
HRE: *hypoxia response elements*  
ICAM-1: *intercellular adhesion molecule 1*  
*Id*: *Inhibitor of DNA binding*  
 $\kappa$ B: *inhibitor of NF- $\kappa$ B*  
*IFN*: interférons  
iNOS: *inducible nitric-oxide synthase*  
IL: interleukin  
IRF4: *interferon regulatory factor 4*  
ISRE: *IFN stimulation responsive element*  
ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*  
ITIM: *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*  
ITSM: *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*  
J1: Jagged 1  
J2: Jagged 2  
LB: lymphocyte B  
LFA-1: *lymphocyte function-associated antigen 1*  
LCMV: virus de la chorioméningite lymphocytaire  
LIN: *cysteine-rich Notch/LIN12 repeats*  
LLO: listeriolysin O  
*Lm*: *Listeria monocytogenes*  
*Lm-OVA*: *Listeria monocytogenes* exprimant OVA

*Lm-GP<sub>33</sub>*: *Listeria monocytogenes* exprimant GP<sub>33</sub>  
*Lm-SIY*: *Listeria monocytogenes* exprimant le peptide SIYRYYYGL  
LMP : *low molecular weight protein*  
LPS: lipopolysaccharide  
LT: lymphocyte T  
LTe: LT effecteurs  
LTm: LT mémoires  
LTn: LT naïfs  
MAML: *Mastermind-like*  
MAMP: *microbial-associated molecular patterns*  
MFI: *mean fluorescence intensity*  
MIIC: *MHC II containing compartment*  
MPEC: *Memory-precursor effector cells*  
moCD: CD dérivés de monocytes  
MOG<sub>35-55</sub>: *myeline oligodendrocyte glycoprotein*  
mTOR: mammalian target of rapamycine  
N1: Notch1  
N2: Notch2  
N3: Notch3  
N4: Notch4  
NECD: domaine extracellulaire de Notch  
NICD: domaine intracellulaire de Notch  
NLR: *NOD-like receptor*  
NLS: séquences de localisation nucléaires  
NO : *nitric oxide*  
NOS : *nitrogen oxygen species*  
OVA: Ovalbumine  
OT-1: LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du peptide OVA<sub>257-264</sub> de l'ovalbumine présenté par le H2-K<sup>b</sup>  
OT-II : LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du peptide OVA<sub>323-339</sub> de l'ovalbumine présenté par le I-A<sup>b</sup>  
P14: LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du peptide GP<sub>33</sub> présenté par le H2-D<sup>b</sup>  
PALS: *periarteriolar lymphocytes sheats*

PBMC: *peripheral blood mononuclear cell*  
pCMH: complexes peptide-CMH  
pCREB1: *phosphorylated cyclic-AMP-responsive element-binding protein 1*  
PD-1: *Programmed death-1*  
PGK1: phosphoglycérate kinase 1  
PKC- $\theta$ : protéine kinase C- $\theta$   
PRR: *patterns recognition receptors*  
pSMAC: *peripheral supramolecular activation complex* pSMAC  
RAM: *RBP-Jkappa-associated module*  
RCB: récepteur des cellules B  
RCT: récepteur des cellules T  
RE : réticulum endoplasmique  
RIG-1: *retinoic-acid-inducible gene 1*  
ROS: *reactive oxygen species*  
SCID: *severe combined immunodeficiency*  
SHP 1 et 2: *SH2-domain containing tyrosine phosphatase 1 et 2*  
SI: synapse immunologique  
SLEC: *Short-lived effector cells*  
SOCS3: *Suppressor of cytokine signalling 3*  
SRC: *spare respiratory capacity*  
STAT: *Signal transducer and activator of transcription*  
TAD: domaine de transactivation  
TAP: *transporter of antigen-processing*  
tBID: *truncated BID*)  
TCF-1: *T cell factor 1*  
T<sub>CM</sub>: LTm centraux  
T<sub>DIM</sub>: *death intermediate memory cells*  
T<sub>EM</sub>: LTm effecteurs  
T<sub>RM</sub>: LTm résidents  
T<sub>c</sub>: T cytotoxiques  
T<sub>FH</sub>: *T follicular helper*)

$T_H$ : *T helper*

TLR: *Toll-like receptors*

TNF: *Tumor necrosis factor*

TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

TRAF: *TNF receptor-associated factor*

Treg: T régulateur

VLP : Virus like particules

VSV: Virus de la stomatite vésiculaire

VV: virus de la vaccine

## Remerciements

La thèse est plus que l'écriture de ce manuscrit. Ce fut la principale occupation de ma vie durant les dernières années. Je dois d'abord remercier Nathalie Labrecque pour m'avoir accueillie dans son laboratoire où elle m'a proposé des projets stimulants et m'a poussée à les réaliser. Elle a aussi su me transmettre une partie de son savoir et de sa rigueur scientifique qui me suivront toujours. Je dois aussi la remercier pour sa compréhension envers mes choix de vie, encore peu communs dans notre domaine. Je tiens à remercier Réjean Lapointe, qui nous a demandé d'étudier les CD40-B chez la souris. Ce qui ne devait être que quelques expériences s'est transformé en un objectif central de ma thèse. Avec le temps, je me suis attachée à ces CD40-B. En 2010, j'ai eu l'occasion d'aller étudier les infections avec *Listeria monocytogenes* dans le laboratoire du Dr. Stephen P. Schoenberger. Je le remercie de m'avoir accueillie si chaleureusement dans son laboratoire mais aussi sous le soleil de la Californie. Ces infections ont changé notre vie au laboratoire !

Ces années au laboratoire n'auraient pas été aussi plaisantes sans la présence de tous mes collègues. Après tant d'années, il y en a eu plusieurs. D'abord, je dois remercier Julie Leignadier et Marie-Pierre Hardy qui m'ont accueillie à mes tout débuts et m'ont montrée les techniques de base du laboratoire. Ensuite, je veux remercier particulièrement Natacha Cotta-Grand avec qui j'ai collaboré pendant près de trois ans. En plus de devenir une amie, elle m'a enseigné bien des astuces utiles pour le travail quotidien en laboratoire. Avec un peu de chance, nous serons à nouveau collègues de travail un jour. Je veux aussi remercier Jean-François Daudelin, mon assistant de recherche préféré, sans qui la vie au laboratoire serait beaucoup trop calme! Je n'oublierai jamais Léa Gaudot, ma stagiaire de master qui a admirablement assuré le relais du projet Notch durant mon premier congé de maternité. Je remercie également Salix Boulet et Pamela Thébault pour leurs nombreux conseils et leur encouragement. Pamela, je n'oublierai jamais ta tarte au nougat et tes cakes au pesto ! Je tiens à remercier Frédéric Duval qui poursuivra le projet Notch. Ce fut un plaisir de collaborer avec toi et je te souhaite de découvrir les mystères de la signalisation Notch. Je ne dois pas oublier tous mes collègues qui m'ont accompagnée durant mon parcours et le chemin entre l'UdeM et

le HMR : Rachel, Cindy, Livia, Fanny, Erin, Simon-David, Adam-Nicolas, Marilaine, et CELG. Un petit clin d'œil à mes confidents de la salle de culture et du FACS : Geneviève et Martine. Tout ce temps à papoter (tout en travaillant) fut très agréable ! Merci aussi à Salix et Julie K. pour la relecture de ce manuscrit.

Ma vie ne s'est pas résumée à la science. Au cours des dernières années, j'ai eu le bonheur de donner naissance à deux enfants, Laurier et Émilie, qui m'apportent ma dose de bonheur et me rattachent aux choses essentielles. Toute cette aventure n'aurait pas été aussi agréable sans mon Popsidoo. Je te remercie pour toutes ces années passées ensemble où tu as su m'appuyer et me faire rire, sans toujours comprendre pourquoi le doctorat et la recherche méritaient un si grand investissement de soi. Tu verras, je serai récompensée un jour ! Merci pour toutes ces fois où tu m'as attendue les dimanches alors que je venais nourrir mes chères cellules dendritiques. Je dois aussi remercier ma belle-maman, Pauline, sans qui tout aurait été bien plus difficile. Merci pour les jours de répit à garder les enfants et tous ces bons petits plats cuisinés qui nous font économiser tant de temps. Et merci à Lysanne et Louis-Philippe pour avoir kidnappé Laurier à quelques reprises. Finalement, merci à ma Grand-Ma Dot, mon parrain Richard, ma marraine Maryse, et mon petit frère Jason pour votre soutien et votre encouragement durant toutes ces années. Je ne dois pas oublier mes supers voisins, Luc et Karine, sans qui ma vie sociale serait bien plus ennuyante.

Je dédie cette thèse à mes parents, Line et Ron, partis trop tôt et à Madeleine, partie en son juste temps. En espérant que vous serez fiers de là haut. Vous aurez au moins eu le temps de m'inculquer l'importance de l'éducation et le goût du travail bien fait !

# Introduction

## 1.1 La réponse immunitaire

Le système immunitaire a pour fonction d'éliminer les agents infectieux ou les cellules anormales de l'organisme. Lors d'infection, il y aura premièrement reconnaissance par les cellules du système immunitaire inné constitué notamment des macrophages, des neutrophiles, des cellules NK et des cellules dendritiques. Ces différentes cellules permettent de contrôler l'infection localement grâce à la phagocytose, à la production de cytokines, de chimiokines et de peptides antimicrobiens. Certaines cellules innées activeront le système immunitaire adaptatif. Les cellules adaptatives sont composées des lymphocytes T responsables de la réponse cellulaire et des lymphocytes B produisant les anticorps (Ac).

### 1.1.1 La réponse innée

La réponse innée est initiée suite à la reconnaissance de MAMP (*microbial-associated molecular patterns*) ou de DAMP (*danger-associated molecular patterns*). Les MAMP sont des motifs moléculaires conservés chez les bactéries et les virus (pathogènes ou non) alors que les DAMP sont associés aux cellules anormales c'est-à-dire en apoptose ou stressées. Les MAMP et les DAMP sont reconnus par les PRR (*patterns recognition receptors*) dont les plus connus sont les TLR (*Toll-like receptors*) découverts pour leur rôle dans l'immunité de la drosophile<sup>1</sup>. Chez la souris, il existe 13 TLR. Les TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 10 reconnaissent des produits bactériens et sont situés à la membrane plasmique. Les TLR 3, 7, 8 et 9 reconnaissent des acides nucléiques et sont localisés dans les endosomes. Quant aux TLR 11, 12 et 13, ils sont exprimés uniquement dans le système nerveux central et n'ont pas été identifiés chez l'humain (revue dans<sup>2</sup>). Dans le cadre de cette thèse, les TLR 4 et 9 sont plus pertinents puisqu'ils seront stimulés afin de maturer différentes cellules. Le TLR4 reconnaît, entre autres, le lipopolysaccharide bactérien (LPS) alors que le TLR 9 reconnaît de l'ADN riche en motif CpG non méthylé, des motifs présents seulement chez les bactéries et les virus<sup>3</sup>. La

stimulation des cellules immunitaires innées via les TLR induit les mécanismes de défenses antimicrobiens et permet l'activation de la réponse adaptative. La majorité des cellules infectées ou anormales sont reconnues rapidement par le système immunitaire inné. Les réponses adaptative et innée collaborent ensuite afin de contrôler l'envahisseur.

## **1.1.2 La réponse adaptative**

La réponse adaptative est produite par deux principaux types de cellules : les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB). Ces lymphocytes possèdent des récepteurs variables qui vont reconnaître spécifiquement un fragment peptidique présenté sur une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) pour les LT ou une protéine dans son état natif pour les LB. Les LT se différencient dans le thymus, ce qui leur a valu leur nom (T : Thymus). Quant aux LB, ils se différencient dans la moelle osseuse. Cependant, leur nom provient du diminutif de la bourse de Fabricius chez les oiseaux, un organe où se produit la maturation des LB. Puisque les LB se différencient dans la moelle osseuse (B : *Bone marrow*) chez les mammifères, la nomenclature fut conservée. Suite à l'élimination de l'infection, des lymphocytes mémoires vont survivre afin d'assurer la protection à long terme de l'organisme.

### **1.1.2.1 Les lymphocytes B (LB)**

Les LB se différencient dans la moelle osseuse à partir des progéniteurs lymphoïdes communs. Grâce à des réarrangements géniques, ils forment un récepteur des cellules B (RCB) spécifique d'un antigène (Ag). Par la suite, le LB migre dans la rate où il poursuit sa maturation. Le LB reconnaît son Ag dans sa forme native via son RCB. Cet Ag peut être soluble ou présenté sur une cellule présentatrice d'antigène (CPA) comme les macrophages, les cellules dendritiques (CD) ou les CD folliculaires (FDC). La reconnaissance de l'Ag induit la signalisation via le RCB et l'internalisation du complexe Ag/BCR. L'Ag internalisé est dégradé afin d'être présenté aux LT CD4<sup>+</sup> pour recevoir, via l'interaction CD40/CD40L, l'aide nécessaire à la formation des centres germinatifs où a lieu la commutation de classe et l'hypermutation somatique menant à la formation d'Ac de haute affinité<sup>4</sup>. Ce phénomène est

appelé la coopération LT-LB<sup>5</sup>. La résultante pour les LB est la formation de plasmablastes qui sécrètent des Ac de haute affinité pour ensuite mourir par apoptose. Selon leur isotype (IgM, IgG, IgA, IgE), ces Ac ont différentes propriétés par exemple leur localisation, leur capacité de polymériser (monomère, dimère, pentamère), leur potentiel d'opsonisation ou leur capacité d'activer le complément. Certains LB se différencient en plasmocytes mémoires et migrent dans la moelle osseuse où ils sécrètent des Ac assurant une protection durable de l'organisme. Des LB mémoires capables de répondre rapidement suite à une seconde exposition à leur Ag spécifique seront formés et résideront dans les organes lymphoïdes secondaires<sup>6,7</sup>. Le LB contribue aussi à la réponse immune par la sécrétion de cytokine et la présentation de l'Ag (section 1.2.1.2).

### 1.1.2.2 Les lymphocytes T (LT)

Les LT sont divisés en 2 grandes familles selon le corécepteur qu'ils expriment. Les LT CD4<sup>+</sup> expriment le corécepteur CD4<sup>+</sup> alors que les LT CD8<sup>+</sup> expriment le CD8<sup>+</sup>.

#### 1.1.2.2.1 Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Historiquement, les LT CD4<sup>+</sup> ont été appelé T<sub>H</sub> pour T *helper* (auxiliaires) puisque certains aident ou contribuent à l'activation d'autres lymphocytes lors de la réponse immunitaire. Suite à son activation, selon les cytokines environnantes, le LT CD4<sup>+</sup> se différencie en sous types ayant des fonctions diverses importantes autant dans l'élimination des pathogènes ou des cellules tumorales que le contrôle de l'autoimmunité. Les principaux types de LT CD4<sup>+</sup> identifiés à ce jour sont les T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>9, T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>22, T<sub>FH</sub> (*follicular helper*), et Treg (régulateur) (revue dans<sup>8</sup>). Un résumé des cytokines, des facteurs de transcription et des fonctions associées à chacun de ces types cellulaires est présenté à la figure 1 et est revu dans<sup>8</sup>. Selon ce schéma, lors de son activation, chacun de ces types de LT CD4<sup>+</sup> est différencié grâce à l'exposition à une cytokine (ou quelques cytokines) activant une STAT (*Signal transducer and activator of transcription*) par phosphorylation et induisant un facteur de transcription maître permettant son engagement vers un phénotype particulier. Les

différents  $T_H$  ont des fonctions qui leur sont propres mais aussi redondantes. La différenciation des  $LT\ CD4^+$  est complexe puisqu'elle est régulée par des mécanismes qui activent des gènes associés à une lignée tout en réprimant ceux associés aux autres phénotypes. Dans les dernières années, des études démontrent que plusieurs facteurs de transcription peuvent être exprimés simultanément dans les  $LT\ CD4^+$ . Ce serait l'expression différentielle de ces facteurs de transcription et l'environnement génétique global (modifications épigénétiques, ouverture de la chromatine influençant l'accessibilité génique) qui détermineraient le choix de différenciation. La plasticité des  $LT\ CD4^+$  ou la stabilité des différents types et la régulation de l'expression des facteurs de transcriptions maîtres demeurent un sujet d'étude actif<sup>9</sup>.

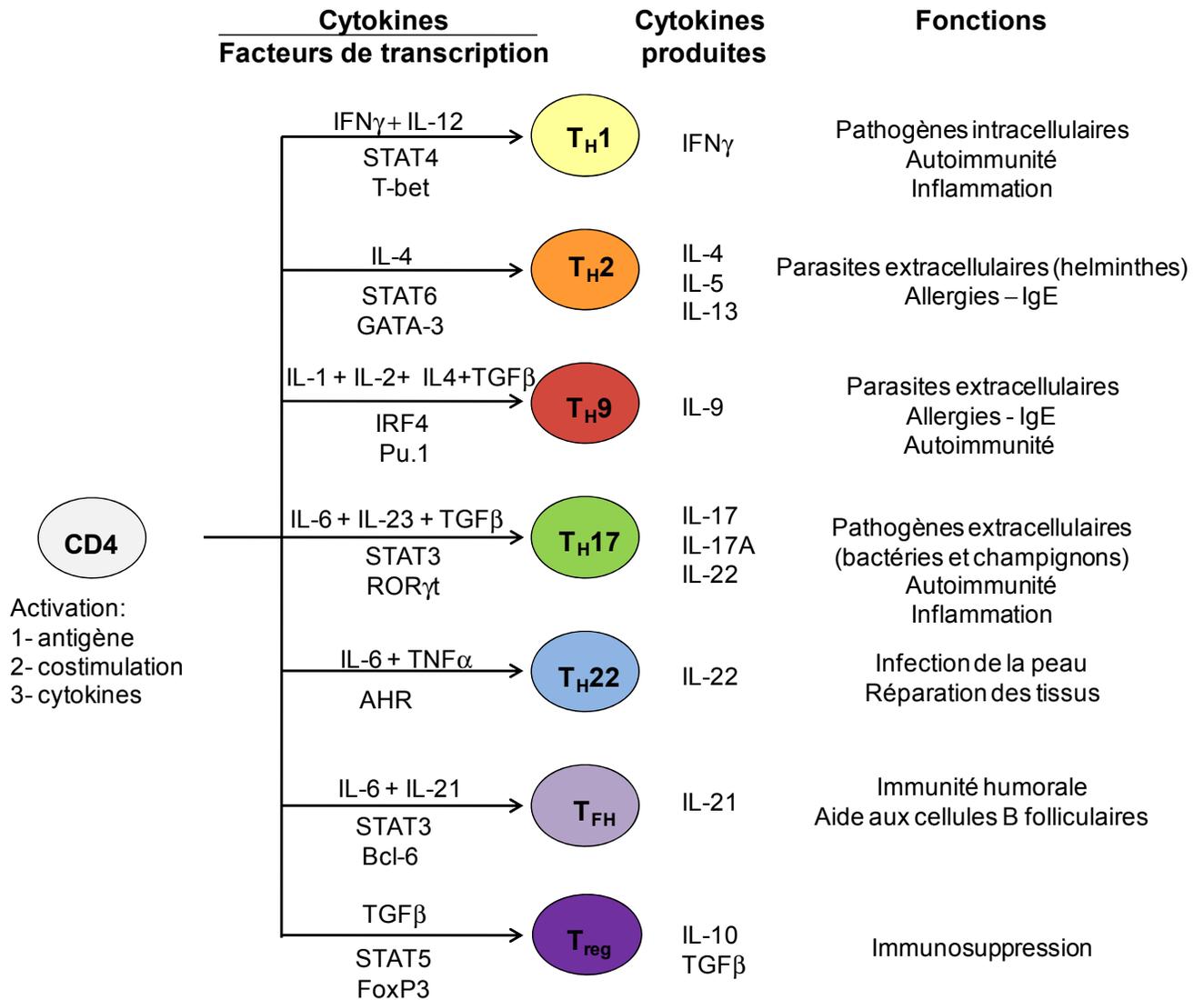


Figure 1. Les différents sous-types de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Inspiré de <sup>8</sup>. Références: T<sub>H1</sub><sup>10</sup>, T<sub>H2</sub><sup>11</sup>, T<sub>H9</sub><sup>12,13</sup>, T<sub>H17</sub><sup>14-16</sup>, T<sub>H22</sub><sup>17</sup>, T<sub>FH</sub><sup>18</sup> et Treg<sup>19-21</sup>.

#### 1.1.2.2.2 Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Les LT CD8<sup>+</sup> sont aussi appelés T cytotoxiques (Tc) en raison de leur capacité de lyser, une fois activés, les cellules présentant leur Ag spécifique. Inspiré de la nomenclature établie chez les LT CD4<sup>+</sup>, des sous types de LT CD8<sup>+</sup> ont été identifiés : les Tc1, les Tc2, les Tc17 et les Tcreg. Les Tc1 sont activés en présence d'IL-12 qui active T-bet et permet la

production d'IFN- $\gamma$ . Ils jouent un rôle dans l'élimination des virus, des bactéries et des tumeurs<sup>22</sup>. Les Tc2 sont formés en présence d'IL-4 qui active le facteur de transcription GATA-3 et ainsi la production d'IL-4<sup>22,23</sup>. Quant aux Tc17, ils se différencient en présence d'IL-23 induisant Ror $\gamma$ t permettant la production d'IL-17. Tout comme les Tc1, les Tc17 jouent un rôle dans l'élimination de bactéries et de virus, dans l'immunité anti-tumorale et dans la promotion de l'inflammation<sup>22,24-27</sup>. Des Tcreg exprimant FoxP3 et ayant une activité régulatrice ont aussi été identifiés chez le rat, la souris et l'humain<sup>28-32</sup>. Par exemple, dans un contexte de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD, *graft versus host disease*) allogénique, ces Tcreg sont induits grâce au TGF $\beta$ : ils sont capables d'inhiber efficacement la réponse des LT CD8<sup>+</sup> et de diminuer la mortalité des souris<sup>28,33,34</sup>. Ces différents types cellulaires illustrent le fait qu'en fonction du contexte, le LT CD8<sup>+</sup> fait aussi des choix de différenciation au cours de la réponse. La stabilité et la singularité du phénotype de ces sous-types de LT CD8<sup>+</sup> restent à démontrer. La réponse des LT CD8<sup>+</sup>, qui pourrait donc être qualifiée de type Tc1 (produisant de l'IFN- $\gamma$ ), sera décrite en détail dans cette thèse.

## 1.2 Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Pour que les LT naïfs soient activés, ils doivent reconnaître leur Ag spécifique et simultanément percevoir des signaux de costimulation et d'inflammation (cytokines). Ces signaux sont donnés par les CPA professionnelles uniquement. Les cellules dendritiques (CD), les LB spécifiques (dont le RCB a reconnu son Ag spécifique) et les monocytes/macrophages sont reconnus comme tels<sup>35-39</sup>. Cependant, il est maintenant démontré que d'autres types de cellules peuvent agir comme CPA notamment les LB activés via le CD40 (CD40-B) et les neutrophiles<sup>40-42</sup>. Afin de fournir les signaux requis pour l'activation des LT, les CPA professionnelles possèdent les caractéristiques suivantes:

- L'expression des molécules de classe I et II du CMH
- La capacité d'acquérir les Ag exogènes par des mécanismes actifs, par exemple la phagocytose, la pinocytose ou l'endocytose médiée par les récepteurs
- L'expression des molécules de costimulation suite à leur activation

- La sécrétion de cytokines suite à leur activation
- L'expression de PRR (des TLR, des NLR (*NOD-like receptor*) ou des récepteurs RIG-1 (*retinoic-acid-inducible gene 1*) pour détecter les signaux danger<sup>43</sup>.

L'acquisition des Ag exogènes par les différents types de CPA variera en fonctions des récepteurs qu'ils expriment et de leurs différences biologiques. La présentation de l'Ag par les CD et les LB sera abordée plus spécifiquement dans leurs sections respectives.

### 1.2.1 La présentation antigénique

Pour être activés, les LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> doivent reconnaître leur Ag spécifique présenté par une molécule du CMH à la surface d'une CPA. Les LT CD8<sup>+</sup> interagissent avec le CMH de classe I (CMH I) alors que les LT CD4<sup>+</sup> interagissent avec le CMH de classe II (CMH II). Les CMH I et II ont des structures physiques différentes influençant les peptides qu'ils présentent. Le CMH I est composé d'une chaîne transmembranaire, encodée par le locus du CMH, associée à une sous unité non polymorphique nommée  $\beta_2$ -microglobuline. Le sillon présentant le peptide est fermé aux extrémités, ce qui limite la taille des peptides présentés à 8-9 acides aminés (a.a). Le CMH II est composé de deux chaînes transmembranaires polymorphiques,  $\alpha$  et  $\beta$ , aussi encodées sur le locus du CMH. Grâce à un sillon ouvert, le CMH II peut présenter des peptides dont la longueur varie entre 10 et 20 a.a.. Les peptides se lient aux différents CMH grâce à l'interaction avec des a.a. conservés au sein des sillons formés par les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  pour le CMH I ou  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  pour le CMH II<sup>44</sup>.

#### 1.2.1.1 La présentation par le CMH I

Le CMH I présente des peptides qui sont générés par le protéasome, un complexe de protéases multicatalytiques, qui dégrade les protéines de façon ubiquitine dépendante au niveau du cytosol. Le protéasome est composé de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  qui forment un baril composé de 4 anneaux comportant 7 sous-unités chacun. Certaines de ces sous-unités ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$

et  $\beta 5$ ) peuvent être remplacées par d'autres sous-unités (low molecular weight protein (LMP) 2 et 7 ainsi que MECL-1) induites par l'IFN- $\gamma$ , une cytokine inflammatoire transformant le protéasome conventionnel en immunoprotéasome<sup>44,45</sup>. L'immunoprotéasome a pour particularité de modifier la quantité, la qualité et la variété des peptides produits optimisant la présentation des Ag aux LT CD8<sup>+</sup> lors d'infection. En effet, l'immunoprotéasome ne clive pas les protéines aux mêmes endroits modifiant l'hydrophobicité, la polarité et le volume des peptides produits. En bref, le protéasome et l'immunoprotéasome ne génèrent pas les mêmes peptides et influencent donc les épitopes pouvant être reconnus par les LT CD8<sup>+</sup><sup>45,46</sup>.

La présentation antigénique dite classique permet la présentation de peptides issus de protéines nouvellement synthétisées, provenant du cytosol, du noyau ou de la mitochondrie et étant dégradées directement au cytosol pour ensuite être transportées dans le réticulum endoplasmique (RE) pour leur présentation sur les CMH I (Figure 2). L'entrée dans le RE est un processus actif dépendant de la protéine TAP (*transporter of antigen-processing*). Une fois dans le RE, les peptides sont clivés en N-terminal par des protéases ERAAP (*ER-associated aminopeptidases*) puis chargés sur les CMH I en formation à l'aide de différentes chaperonnes dont la Tapasine et sont transportés à la surface cellulaire par la voie de sécrétion classique afin d'être présentés<sup>47</sup>. Le CMH I présente donc principalement des Ag issus de virus/bactéries cytosoliques ou de cellules tumorales.

Il existe aussi la présentation croisée qui permet de présenter sur le CMH I des peptides acquis par la voie endocytaire ou lors de la phagocytose (Figure 2). Pour ce faire, deux modèles existent : la voie vacuolaire et la voie cytosolique. Dans la voie vacuolaire, les Ag seraient chargés directement sur les CMH I dans les endosomes et les phagosomes. Les CMH I se retrouveraient dans ces compartiments suite au recyclage de la membrane plasmique et le chargement des Ag y serait indépendant du protéasome. La voie cytosolique implique que les peptides exogènes doivent être redirigés au cytosol (par un mécanisme encore mal défini) afin d'être dégradé par le protéasome et ensuite chargés sur les CMH I comme les Ag issus de la présentation classique. À ce jour, les mécanismes permettant la

présentation croisée demeurent incomplets. Ce type de présentation est très important puisque sans lui, les CPA, étant rarement infectées directement par les bactéries ou les virus, ne pourraient pas présenter ces peptides antigéniques aux LT CD8<sup>+</sup> 47-49.

Dans le cadre de cette thèse, des immunisations avec des CD ou des CD40-B chargés avec un peptide de l'ovalbumine (OVA<sub>257-264</sub>, SIINFEKL) sont réalisées. Lors de ce type de chargement, le peptide OVA déplace certains peptides présents sur les CMH I à la surface des CPA pour être présenté à son tour. Des infections par injection intraveineuse de la bactérie *Listeria monocytogenes* exprimant OVA (*Lm*-OVA) sont aussi réalisées. Les bactéries se retrouvent alors principalement dans la rate et le foie où elles sont phagocytées par les neutrophiles et les macrophages qui détruisent les bactéries grâce à la production de NOS et ROS (*nitrogen and reactive oxygen species*)<sup>50-52</sup>. Les CD sont, quant à elles responsables, de l'activation de la réponse adaptative<sup>53,54</sup>. Dans le cas où les CD ne sont pas directement infectées, elles présenteront les Ag de *Lm* grâce la présentation croisée. Toutefois, la bactérie *Lm* peut infecter quasi tout les types de cellules où son entrée se fait grâce à l'interaction des récepteurs tyrosine kinase Met via son internaline B. Une fois dans la cellule, *Lm* se situe dans les phagosome d'où elle s'échappera vers le cytosol grâce à l'expression de la listeriolysin O (LLO) qui y formera des pores avant sa fusion avec le lysosome qui provoquerait sa destruction<sup>55,56</sup>. Alors, si des CD ou d'autres CPA sont infectées par *Lm*, elles peuvent présenter des Ag sur leur CMH I aux LT CD8<sup>+</sup> via la voie classique.

### 1.2.1.2 La présentation par le CMH II

Le CMH II présente des peptides extracellulaires acquis via l'endocytose (Figure 2). Pour ce faire, les peptides sont chargés sur des CMH II lors de leur dégradation dans la voie endolysosomale. Le CMH II est formé au sein du RE où il s'associe constitutivement avec la chaîne invariante (Ii) qui prévient le chargement prématuré de peptide et permet le transport vers les endosomes. Au sein des endosomes tardifs aussi nommés *MHC II containing compartment* (MIIC), Ii est dégradé pour laissé seulement le peptide CLIP dans le sillon du CMH II. Simultanément, les peptides extracellulaires sont dégradés par différentes protéases.

La protéine HLA-DM permet l'échange de CLIP contre ces peptides exogènes qui seront transportés sur le CMH II jusqu'à la surface cellulaire pour être présentés aux LT CD4<sup>+47,49</sup>.

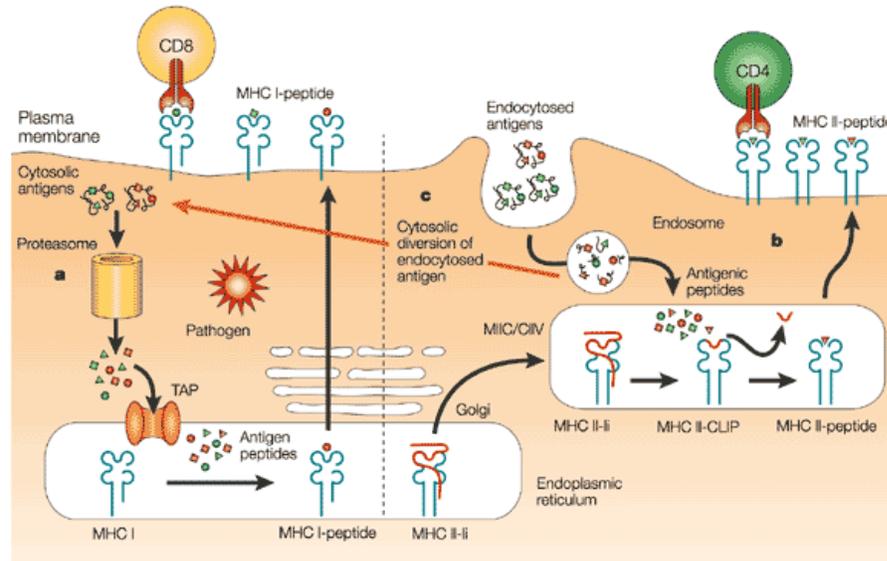


Figure 2. La présentation de l'Ag par le CMH I et le CMH II. Présentation classique par le CMH I (a), par le CMH II (b) et présentation croisée par le CMH I (c). Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Immunology <sup>49</sup>, ©2001.

### 1.2.2 Les CPA et l'immunothérapie du cancer

Les cellules normales qui se différencient en cellules tumorales, suite à différents dommages à leur ADN, acquièrent progressivement différentes propriétés (figure 3) (revue dans <sup>57</sup>). Premièrement, les cellules acquièrent une capacité de proliférer infinie grâce à un signal de prolifération soutenu. Pour ce faire, les cellules peuvent produire elles-mêmes des facteurs de croissances, augmenter l'expression des récepteurs des facteurs de croissance ou activer constitutivement les voies en aval de ces récepteurs. Deuxièmement, les cellules deviennent insensibles aux mécanismes de suppression de la croissance cellulaire telle l'inhibition de contact. Troisièmement, les cellules deviennent insensibles à l'apoptose grâce à l'inhibition de gène suppresseur de tumeur comme p53, à l'augmentation de gènes anti-

apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>), à la diminution de l'expression de gène pro-apoptotiques (Bax, Bim, Puma) ou à la résistance aux signaux de mort extrinsèques (FAS/FASL). Quatrièmement, afin de réponse à leur demande élevée en nutriment et en énergie, les cellules vont induire l'angiogénèse. En raison de l'environnement hypoxique, les cellules tumorales ou des cellules immunitaires les infiltrant vont produire des facteurs pro-angiogéniques tel le VEGF. Cinquièmement, les cellules deviennent immortelles c'est-à-dire qu'elles peuvent se diviser indéfiniment. Généralement, après un certain nombre de division, une cellule devient sénescence. L'érosion des télomères est impliquée dans ce phénomène mais, les cellules tumorales ont une télomérase active les protégeant de la sénescence. Sixièmement, les cellules acquièrent la capacité de migrer hors de leur tissus d'origine afin d'envahir de nouveaux tissus créant ainsi des métastases. Septièmement, les cellules tumorales doivent échapper à la reconnaissance du système immunitaire. Par exemple, certaines tumeurs diminuent l'expression des CMH I, leur permettant de passer inaperçues. D'autres tumeurs expriment des ligands qui induiront l'apoptose (FasL) des LT ou encore leur inactivation (PD-L1). (revue dans <sup>57</sup>).

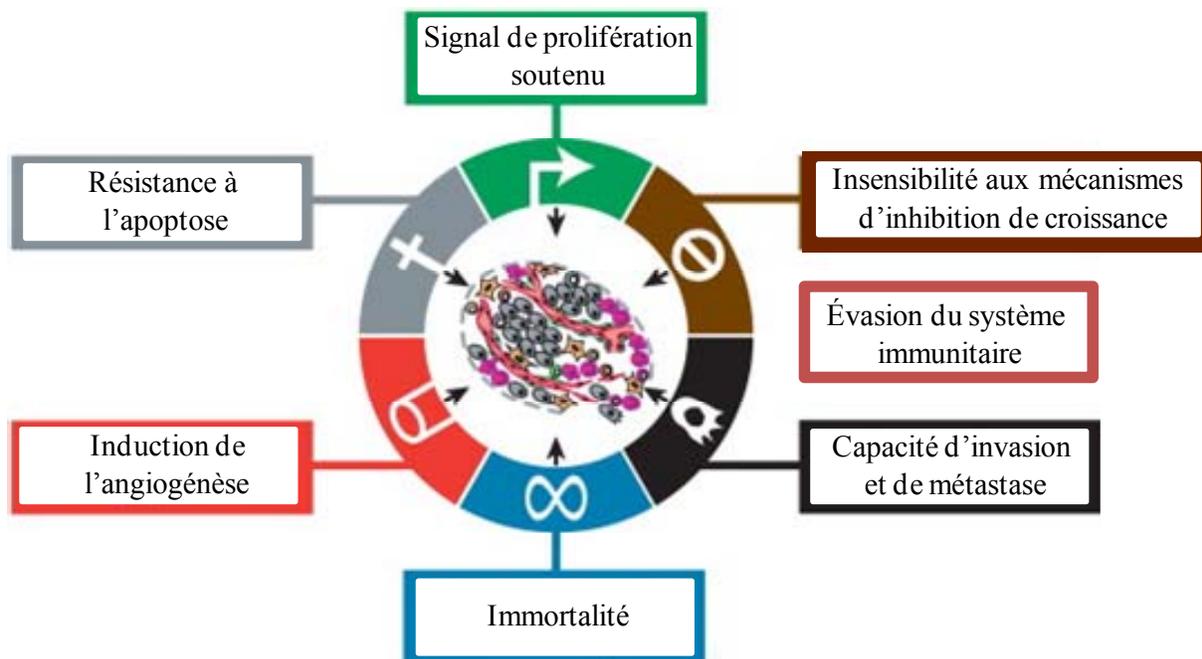


Figure 3. Les propriétés des cellules tumorales. Modifié de <sup>57</sup>.

Grâce à leurs caractéristiques, les CPA ont, entre autres, comme fonction d'activer les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Cette propriété leur permet d'être utilisés en vaccination thérapeutique afin d'activer les LT envers des Ag tumoraux. La vaccination thérapeutique pourrait faire parti des traitements d'immunothérapie offerts contre les cancers. Au niveau des LT CD8<sup>+</sup>, capables d'éliminer des cellules tumorales, les objectifs de la vaccination sont (1) d'activer les LTn CD8<sup>+</sup>, (2) de réactiver les LT CD8<sup>+</sup> épuisés et (3) de générer des LTm CD8<sup>+</sup> qui permettront la protection à long terme de l'organisme<sup>58</sup>. À ce jour, les CD sont les seules CPA utilisées pour la vaccination thérapeutique chez l'humain. Cependant, les CD et leurs progéniteurs constituent une faible proportion du sang périphérique humain, alors que les LB y sont présents en plus grand nombre. De plus, les CD prolifèrent peu en culture *in vitro*, rendant leur expansion difficile<sup>40</sup>. Pour cette raison, il est pertinent de développer une nouvelle source de CPA : les LB activés via le CD40L (CD40-B). Il serait tentant d'utiliser les LB spécifiques de l'Ag comme CPA, cependant leur rareté ne permettra pas d'obtenir une quantité de cellules assez importante pour une immunisation efficace dans ce contexte. De plus, il n'est pas certain que l'Ag reconnu par les LB spécifiques permettrait de générer les épitopes optimaux pour l'activation des LT réactifs envers les Ag tumoraux. En raison de leur potentiel d'utilisation en immunothérapie, les prochaines sections aborderont la présentation de l'Ag par les CD et les CD40-B.

### **1.2.3 Les cellules dendritiques**

Les CD ont été identifiées par Ralph Steinman dans les années 1970<sup>59</sup> ce qui lui a valu l'attribution du prix Nobel de médecine en 2011. Elles ont été nommées ainsi en raison de leur morphologie comportant des dendrites caractéristiques. En absence d'infection, les CD se retrouvent dans les tissus non lymphoïdes et la zone marginale de la rate ayant ainsi accès aux Ag tissulaires et circulant dans le sang. La CD échantillonne constamment son environnement par la phagocytose, la macropinocytose constitutive ou l'endocytose médiée par les récepteurs. Lorsque la CD reconnaît des signaux danger dans son environnement, via ses PRR, elle entame un processus de maturation qui induit plusieurs changements : la diminution de la capture d'Ag dans son environnement, l'acidification des lysosomes pour favoriser la

dégradation des Ag, l'augmentation de l'expression des CMH I et II ainsi que des molécules de costimulation, la sécrétion des cytokines et l'expression des récepteurs de chimiokines afin de guider sa migration aux organes lymphoïdes secondaires où elle active les LT<sup>58,60</sup>. Les CD ont aussi la capacité de présenter des Ag exogènes sur les CMH I grâce à la présentation croisée<sup>48,61</sup> et des Ag cytosoliques sur les CMH II grâce à l'autophagie<sup>62</sup> augmentant leur probabilité d'activer les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. L'ensemble de ces caractéristiques confère aux CD une capacité supérieure d'activation des LT. Des études de MLR (*mixed leucocyte reaction*) réalisées en 1978 ont démontré que les CD avaient un potentiel d'activation des LT, mesuré par leur prolifération, supérieur aux autres types de cellules pouvant être isolées à l'époque (LT, LB et macrophages)<sup>37,38</sup>. Dès lors, les CD furent considérées comme les meilleures CPA. L'élimination des cellules CD11c<sup>+</sup> à l'aide de souris CD11c-DTR (*Diphtheria toxin receptor*) abolit la réponse des LT CD8<sup>+</sup> contre *Lm*<sup>54</sup>, *Plasmodium yoelii*<sup>54</sup> ou LCMV<sup>63</sup> démontrant le rôle des CD dans l'activation de la réponse des LT CD8<sup>+</sup>. En activant les LT, les CD font le pont entre l'immunité innée et acquise. Chez la souris, les principaux types de CD sont les CD classiques (CDc), les CD plasmacytoïdes (CDp), les cellules de Langerhans (CL) et les CD inflammatoires. La classification des CD se fait en fonction de leurs précurseurs, de leur localisation anatomique et de leur fonction<sup>64</sup>. L'humain possède aussi une panoplie de CD classées de façon similaire mais selon l'expression de molécules de surface différentes<sup>65-67</sup>.

### 1.2.3.1 Les CD dérivées de la moelle osseuse

Afin d'étudier les fonctions des CD dans l'activation des LT murins, les CD dérivées de la moelle osseuse ont beaucoup été utilisées. Ces CD sont cultivées à partir de la moelle osseuse de souris mise en culture avec du GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) et de l'IL-4 (BMDC)<sup>68</sup>. Cette technique de culture produit des CD qui dérivent des monocytes, qui ont un phénotype inflammatoire CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>, qui sont capables de présentation croisée, qui expriment des molécules de costimulation, qui sécrètent des cytokines (IL-12 (*interleukin-12*), IL-10, CCL2, TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* )), du NO (*nitric oxide*)<sup>35,69</sup> et qui ne contiennent pas de CDp<sup>70</sup>. En raison de leur production de TNF- $\alpha$  et de NO, ces CD ressemblent à des CD Tip (*TNF-and iNOS-producing*)<sup>69,71</sup>. Chez l'humain,

les cellules du sang périphérique sont aussi incubées avec du GM-CSF et de l'IL-4, afin d'obtenir des CD dérivant des monocytes<sup>72</sup>. D'autres types de CD peuvent être différenciées *in vitro*. La culture de la moelle osseuse avec du FLT3L permet d'obtenir des CDc et des CDp<sup>73,74</sup>. Ces CDc générées *in vitro* diffèrent des BMDC, car elles sécrètent de l'IL-12, mais très peu d'IL-10, de CCL2, de TNF- $\alpha$  et de NO<sup>69</sup>.

En présence d'une infection, des CD inflammatoires sont identifiables de façon transitoire. Ces CD inflammatoires sont issues de la différenciation des monocytes et nommées mo-CD (*monocytes derived DCs*)<sup>75</sup>. De façon journalière, les monocytes sortent de la moelle osseuse par un mécanisme dépendant de CCR2 et migrent aux tissus enflammés, s'il y a lieu, grâce à l'expression des récepteurs de chimiokines CCR1 et CCR5, attirés par l'expression de CCL3 et CCL5<sup>76</sup>. Une fois dans le tissu, ces monocytes peuvent se différencier en macrophages inflammatoires ou en CD inflammatoires, c'est-à-dire en CD Tip et en CD exprimant DC-SIGN<sup>75,76</sup>. Les CD inflammatoires expriment CD11b, CD11c<sup>int</sup>, CMH I et CMH II<sup>71,77,78</sup>. En raison de leur origine et de leur phénotype, les CD générées par la culture de moelle osseuse ou de sang périphérique avec du GM-CSF et de l'IL-4 s'apparentent aux mo-CD.

### 1.2.3.2 La vaccination avec les CD

Depuis la fin des années 1990, plusieurs vaccins utilisant les CD ont été développés. Les CD présentent un intérêt particulier en raison de leur activation efficace des LT. Les premières études cliniques ont utilisé des CD différenciées *ex vivo* à partir de monocytes ou de progéniteurs CD34<sup>+</sup> cultivés en présence de GM-CSF avec ou sans IL-4, FLT-3 et TNF<sup>79-81</sup>. Malheureusement, les bénéfices cliniques, définis par une diminution de la grosseur globale des tumeur de 50 %, l'absence de croissance d'une lésion de plus de 25 % et l'absence de nouvelle lésion, furent très limités (7 % des patients)<sup>81</sup>. L'inefficacité de ces vaccins a été attribuée à l'état immature des CD. En effet, sans reconnaissance d'un signal danger, les CD ne peuvent pas fournir les signaux de costimulation et sécréter les cytokines requises pour l'activation optimale des LT. Après 2004, les vaccins avec les CD ont donc introduit l'ajout de

ligands des TLR lors de la culture de CD ou des adjuvants lors de l'immunisation<sup>58,82,83</sup>. De plus, des Ag ont été ciblés directement vers les CD *in vivo* grâce à un couplage avec un Ac anti-lectine (DC-SIGN, DCIR, CLEC9A ou Langerin), afin d'induire l'endocytose par les CD endogènes et la présentation de cet Ag<sup>84-87</sup>. En plus de la façon dont les CD sont générées, plusieurs autres variantes sont présentes dans ces études, comme la technique de chargement des Ag (chargement avec des protéines, des peptides, des lysats cellulaires ou par transfection d'ARN), la voie d'immunisation (sous-cutanée, intra-dermale, intra-veineuse, intra-nodale), les quantités de CD injectées et le moment de l'injection<sup>83</sup>. Toutes ces variantes font que les vaccins à base de CD sont très hétérogènes. Tous ces facteurs peuvent influencer la réponse et contribuer à l'inefficacité observée. Le manque de costimulation et le manque d'aide CD4 peuvent aussi nuire à l'activation des LT CD8<sup>+</sup><sup>58,88</sup>.

Malgré tout, certains vaccins ciblant les CD, utilisant des CD stimulées ou différenciées *ex vivo* sont toujours à l'étude. Ils présentent des thérapies potentielles pour traiter des cancers tels que les mélanomes, les cancers de la prostate, du rein ou du cerveau. Certains résultats sont encourageants. Par exemple, des CDp directement isolées dans le sang des patients ont été chargées avec des peptides de mélanomes et injectées directement dans un ganglion chez 15 patients ayant des mélanomes métastatiques de stade IV. Ces patients ont développé une réponse T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup><sup>89,90</sup>. Des études en phase III sont en cours avec des mo-CD générées *in vitro*. Par exemple, suite à la chirurgie de tumeur du cerveau nouvellement diagnostiquées, les mo-CD chargées avec des lysats de tumeur sont injectées en combinaison avec la radiothérapie et la chimiothérapie (NCT00045968, Northwest Therapeutics). L'intérêt envers les CD est donc toujours présent. Cependant, il ne faut pas oublier qu'en plus d'activer le système immunitaire, il faut contrer les mécanismes d'immunosuppression des cellules cancéreuses. L'inefficacité de l'immunisation avec les CD ne réside pas seulement dans leur propriété de CPA mais aussi dans la réceptivité des LT.

## 1.2.4 Les lymphocytes B

Les LB, ayant reconnu leur Ag spécifique ou non, possèdent les caractéristiques requises afin d'être des CPA efficaces. En effet, les LB expriment les CMH de classe I et II leur permettant de présenter des Ag aux LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>. L'acquisition des Ag exogènes ne se fait pas seulement par l'entremise d'une reconnaissance via le RCB puisque suite à l'exposition à des protéines solubles, qui ne leur sont pas spécifiques, les LB en expriment des fragments peptidiques sur leur CMH II<sup>91,92</sup>. Finalement, les LB expriment les TLR 1 à 9<sup>93</sup>, ce qui leur permet d'augmenter l'expression des molécules de costimulation et de sécréter des cytokines (IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  et IL-10), suite à l'exposition à différents signaux danger<sup>93-95</sup>.

### 1.2.4.1 L'influence des LB sur la réponse des LT

Lors d'une réponse immune, le rôle des LB dans l'activation des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est mis en évidence par leur délétion. L'absence de LB chez la souris peut affecter l'expansion, la génération de LTe et de LTm CD8<sup>+</sup> ainsi que leur fonctionnalité. Par exemple, l'infection de souris  $\mu M^{-/}$  (absence de LB matures) avec *Lm* ou LCMV n'affecte pas l'expansion des LT CD8<sup>+</sup> mais augmente leur contraction diminuant la génération de LTm<sup>96,97</sup>. De plus, suite à une infection LCMV de souris  $\mu M^{-/}$ , une diminution de la fonctionnalité (sécrétion cytokine et contrôle d'une seconde infection) des LTm CD8<sup>+</sup> est observée<sup>98,99</sup>. L'absence de LB diminue aussi l'expansion des LTe CD4<sup>+</sup>, leur fonctionnalité (sécrétion cytokine) ainsi que la génération de mémoires<sup>97,99,100</sup>. Il est possible que l'effet sur la fonctionnalité des LTm CD8<sup>+</sup> en absence de LB soit causé par l'absence d'aide CD4<sup>101</sup>. L'absence totale de LB perturbe l'architecture des tissus lymphoïdes mais il est peu probable que cela soit responsable de tous les phénotypes observés<sup>102</sup>. En effet, une délétion transitoire des LB chez la souris adulte grâce à l'administration d'un Ac anti-CD20 a diminué l'expansion et la sécrétion de cytokine chez les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> suite à l'inoculation sous-cutanée de tumeur de mélanome B16. Conséquemment, la capacité des souris sans LB à contrôler cette tumeur est diminuée<sup>103</sup>. Une étude très récente, utilisant aussi l'Ac anti-CD20 dans un modèle d'infection avec influenza a montré que l'absence de LB n'affecte pas l'expansion des LTe CD8<sup>+</sup> mais accélère leur contraction pour finalement générer le même nombre de LTm. De plus, l'expansion

secondaire des LTm générés en absence de LB est diminuée. Dans ce modèle, la présence d'Ac spécifiques envers le virus et ayant subi la commutation de classe est requise pour prévenir la contraction prématurée des LT CD8<sup>+</sup>. Grâce à leurs récepteurs Fcγ, les CD peuvent lier les complexes immuns (IgG – Ag spécifiques) pour ensuite les internaliser et présenter l'Ag aux LT CD8<sup>+</sup> sur une période de temps accrue (même après l'élimination du virus) diminuant la vitesse de leur contraction et contribuant à la génération de LTm fonctionnels<sup>104</sup>. Cette étude identifie un mécanisme, dépendant de la production d'Ac, permettant aux LB d'influencer la réponse des LT. Cependant, cette étude démontre aussi que la dépendance des LT CD8<sup>+</sup> envers les LB varie en fonction de leur spécificité. En effet, suite à l'infection avec influenza, l'expansion et la contraction des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la polymérase est indépendant des LB alors que la contraction des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la nucléoprotéine est plus rapide en absence de LB<sup>104</sup>.

Les études présentées dans le paragraphe précédent ne permettent pas de démontrer une fonction de présentation de l'Ag des LB pour influencer la réponse des LT. Grâce à deux modèles où seuls les LB expriment ou non le CMH II, une capacité de présentation antigénique des LB aux LT CD4<sup>+</sup> a été démontrée *in vivo*. D'abord, des chimères hématopoïétiques où seul les LB n'expriment pas le CMH II et ne peuvent donc pas présenter d'Ag aux LT CD4<sup>+</sup> ont été générées. Des LT OT-II (LT CD4<sup>+</sup> dont le TCR reconnaît un peptide de l'ovalbumine (OVA<sub>323-339</sub>, ISQAVHAAHAEINEAGR) présenté par le CMH I-A<sup>b</sup>) ont été transférés dans ces chimères qui ont ensuite été immunisées avec DNP-OVA/alum. En absence de présentation de l'Ag par les LB, l'expansion des LT OT-II est diminuée de même que leur sécrétion de cytokines (surtout l'IL-4). L'ajout de LB exprimant le CMH II restaure l'expansion des LT OT-II démontrant un rôle de présentation de l'Ag par les LB aux LT CD4<sup>+</sup><sup>105</sup>. Dans ce système, la présence de l'alum, un adjuvant, active probablement les LB qui exprimeront les molécules de costimulation et sécréteront les cytokines requises pour l'activation des LT CD4<sup>+</sup>. Plus récemment, dans un modèle d'induction de l'EAE, il a été démontré que les LB jouent un rôle limité dans l'activation et l'expansion des LT CD4<sup>+</sup>. Pour ce faire, des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du peptide MOG<sub>35-55</sub> (*myeline oligodendrocyte glycoprotein*) ont été transférés dans des souris où seuls les LB expriment le CMH II donc sont

les seuls à pouvoir présenter l'Ag. Ces souris ont ensuite été immunisées avec le peptide MOG<sub>35-55</sub> ou la protéine MOG en combinaison avec du CpG-DNA pour induire l'inflammation<sup>106,107</sup>. Comparativement aux souris sauvage, la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques envers MOG<sub>35-55</sub> est diminuée lorsque seul les LB expriment le CMH II. Cependant, la prolifération est plus importante qu'en absence complète du CMH II indiquant que les LB activent les LT CD4<sup>+</sup> *in vivo* mais que d'autres CPA doivent aussi présenter l'Ag pour une expansion maximale. Cette activation par les LB seuls n'est pas optimale puisqu'elle induit une production plus faible de cytokines (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-17) par les LT CD4<sup>+</sup> activés que l'activation chez les souris sauvage. En accord avec une diminution de l'expansion et de la fonctionnalité des LT CD4<sup>+</sup>, la présentation uniquement par les LB ne permet d'induire l'EAE<sup>107</sup>. Malgré l'induction d'une activation sous-optimale, cette étude démontre que les LB peuvent présenter l'Ag aux LT CD4<sup>+</sup>. Il est concevable que le LB présente l'Ag au LT CD4<sup>+</sup> pour l'activer puisqu'en retour le LB peut recevoir du LT CD4<sup>+</sup> les signaux requis afin d'induire la commutation de classe et l'hypermutation sommatique. Même si la présentation antigénique n'est pas la fonction première des LB *in vivo* lors d'une réponse immune, cela n'exclut pas la possibilité de les activer et de les modifier afin d'accentuer cette fonction.

#### **1.2.4.2 Les LB activés via le CD40 (CD40-B)**

Les CD40-B ont été identifiés comme une source alternative de CPA pour l'immunothérapie du cancer<sup>40</sup>. Les CD40-B présentent un intérêt particulier puisqu'ils peuvent être générés en grande quantité. À partir d'une leukaphérèse, 10<sup>8</sup> LB issus du sang périphérique peuvent générer 10<sup>11</sup> CD40-B en 2 semaines de culture *in vitro*. La culture peut être poursuivie jusqu'à 60 jours, ce qui permet de poursuivre l'amplification tout en maintenant la capacité de présentation des CD40-B<sup>40,108,109</sup>. Ces CD40-B expriment aussi CD62L, CCR7, CXCR4, LFA-1 et CD11a/CD18, leur permettant de migrer au ganglion ainsi que dans la rate<sup>109</sup>. Des essais de migration en puits ont montré que les CD40-B migrent vers le CCL21 (ligand CCR7) et le CXCL12 (ligand CXCR4)<sup>108</sup>, des ligands importants pour la localisation aux organes lymphoïdes secondaires, et qu'ils ont la capacité d'attirer les LT<sup>110</sup>. Dans des essais *in vitro*, les CD40-B maintiennent leur capacité de présentation de l'Ag même

en présence d'IL-10, de TGF- $\beta$ , de VEGF ou de PGE E2 (prostaglandine), des molécules immunosuppressives présentes dans l'environnement tumoral<sup>111,112</sup>.

La capacité de présentation de l'Ag des CD40-B a aussi été caractérisée. Il a été observé que la maturation des LB via la liaison du CD40 (CD40-B), sans liaison de leur BCR, augmentent leur expression des CMH I et II et des molécules de costimulation CD80 et CD86<sup>35,113</sup> ainsi que leur efficacité de présentation des Ag, mesurée par l'induction de la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+35,114</sup>. De plus, la présentation croisée par les CD40-B a été observé suite à l'exposition à des Ag contenu dans des VLP (*virus-like particles*)<sup>115,116</sup>. Les CD40-B peuvent aussi induire l'activation des LT CD8<sup>+</sup> *in vivo*. En effet, l'immunisation de souris avec des CD40-B chargés avec un peptide du virus LCMV (GP<sub>33</sub>) active directement les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de GP<sub>33</sub> *in vivo*, augmentant la capacité des LTe à contrôler une tumeur exprimant ce peptide<sup>113</sup>. Dans ce modèle d'immunisation, la maturation des LB avec seulement le LPS ne permet pas le contrôle de la tumeur, en accord avec les résultats obtenus par différents groupes<sup>117-120</sup>. L'activation via le CD40 est donc nécessaire pour la formation de LB ayant une bonne capacité de présentation de l'Ag. L'immunisation de souris avec des CD40-B, chargés avec le peptide OVA, génère aussi une réponse CD8<sup>+</sup> mémoire capable de diminuer la charge bactérienne suite à une infection avec *Lm-OVA*<sup>121</sup>. Cependant, suite à l'immunisation avec les CD40-B, la réponse des LT CD8<sup>+</sup> *in vivo* a peu été caractérisée. Le tableau 1 résume les caractéristiques des CD40-B et des CD associées à leur fonction de CPA.

Propriétés	CD	CD40-B
Acquisition d'Ag exogènes	Oui <sup>39,91</sup>	Oui <sup>91,92</sup>
Présentation croisée	Oui <sup>48,61</sup>	Oui <sup>115,116</sup>
Possibilité de les charger avec un peptide	Oui <sup>35,122</sup>	Oui <sup>35,113</sup>
Augmentation de l'expression des CMH I et II suite à l'activation via le CD40 et/ou les TLR	Oui <sup>35,95,123</sup>	Oui <sup>35,93,95,113,123</sup>
Augmentation de l'expression des molécules de costimulation (CD80/CD86) suite à l'activation via le CD40 et/ou les TLR	Oui <sup>35,123</sup>	Oui <sup>35,93,94,113,123</sup>
Sécrétion de cytokines suite à leur activation via le CD40 et/ou les TLR	Oui <sup>69,93,123</sup>	Oui <sup>93,123</sup>

Tableau 1. Les propriétés des CD et des CD40-B associées à leur fonction de CPA.

Puisque l'intérêt envers les CD40-B provient de leur potentiel en tant que CPA pour l'immunothérapie du cancer, plusieurs groupes ont voulu comparer leur potentiel d'activation des LT à celui des CD. Malgré une capacité à induire la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les CD40-B spécifiques d'un Ag demeurent plus efficaces pour induire la prolifération des LT que les CD40-B non spécifiques<sup>35</sup>, puisque leur capacité d'activation de LT peut égaler celle des BMDC *in vitro*<sup>35</sup>. Un autre groupe a comparé la capacité des CD40-B et des BMDC, tous deux transfectés avec la protéine OVA, à activer des LT OT-1 *in vitro* (quantifiée par la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ ). Les CD40-B activent peu les LT OT-1, alors que la maturation avec du CpG-DNA ou du LPS, des signaux danger, augmente leur capacité d'activation *in vitro*, n'atteignant toutefois pas celle des BMDC. Pour augmenter leur capacité d'activation, des CD40-B maturés au CpG-DNA sont cotransfectés avec des ARN codant pour OX40L, 4-1BBL, IL-12p35, IL-12p40 et OVA (CD40-B modifiés). *In vitro*, l'activation des LT OT-1 par ces CD40-B modifiés permet de générer une activité cytotoxique similaire à l'activation avec des BMDC<sup>123</sup>. Cependant, l'immunisation de souris avec ces CD40-B modifiés ne permet pas de générer des LTe capables de cytolysse<sup>123</sup>. En fait, seulement la capacité des LTe à lyser des

cellules présentant OVA est mesurée, il n'est donc pas possible de déterminer si les LTe sont présents, avec un défaut de fonctionnalité, ou absents. Cette dernière étude démontre toutefois qu'il est possible de modifier les CD40-B pour augmenter leur efficacité de présentation de l'Ag, mais elle ne quantifie pas leur potentiel d'activation des LT CD8<sup>+</sup> *in vivo*. Malgré l'induction d'une réponse effectrice sous-optimale par les CD40-B, leur études en tant que CPA demeure pertinente car il sera certainement possible d'optimiser un protocole de maturation des CD40-B ou de les modifier afin d'accroître leur capacité d'activation des LT CD8<sup>+</sup> et ainsi augmenter la quantité et la fonctionnalité des effecteurs générés. De plus, le nombre important de CD40-B pouvant être générés pourrait compenser pour leur capacité de présentation antigénique plus faible.

Il est aussi possible de générer des CD40-B humains capables d'activer des LT CD4<sup>+</sup> et des LT CD8<sup>+</sup> allogéniques aussi efficacement que des CD issues du sang périphérique. Ces LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> activés produisent de l'IFN- $\gamma$ , mais pas d'IL-10<sup>40</sup>. De plus, des LT CD8<sup>+</sup> ayant une activité cytotoxique ont pu être générés *in vitro* à l'aide de CD40-B chargés avec un peptide de mélanome (Tyrosinase<sub>369-377</sub>) présenté sur le HLA-A\*0201<sup>40</sup>. D'autres équipes sont parvenues à activer *in vitro* des LT CD8<sup>+</sup> autologues, pour induire leur activité cytolytique grâce à leur coculture avec des CD40-B humains chargés avec des peptides ou transfectés avec des ARN de différents Ag viraux et tumoraux<sup>124,125</sup>. Le chargement de lysats de mélanome sur des CD40-B humains activent aussi des LT CD4<sup>+</sup> issus de PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) autologues contre certains Ag spécifiques du mélanome<sup>92</sup>. Contrastant avec ces études, une équipe a démontré que des CD40-B humains permettaient, *in vitro*, une induction et une expansion plus grandes de Treg allogéniques que des CD immatures<sup>126</sup>. Cette expansion nécessite un contact cellulaire via le CMH et le CD80/CD86, ainsi qu'un signal via l'IL-2<sup>126</sup>. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que leurs CD40-B expriment CD80, mais peu de CD83 et de CD86. De plus, leurs CD40-B meurent rapidement lors des cultures *in vitro*, les empêchant possiblement d'activer les LT.

Un facteur pouvant influencer le phénotype des CD40-B est la force du signal transmis par le CD40. D'abord, la dose du signal via CD40 influence différemment l'activation des LB naïfs et mémoires chez l'humain<sup>127-129</sup>. Ensuite, pour un signal optimal, les récepteurs doivent former un trimère<sup>130</sup>. La force du signal CD40 agirait comme un rhéostat pour moduler l'activation et la différenciation des LB. Les différents sites de liaison des différents Ac anti-CD40 liant différents épitopes peuvent aussi influencer le signal transmis<sup>131,132</sup>. Or, les CD40-B sont générés selon des protocoles variables utilisant soit la stimulation par un Ac anti-CD40 monomérique<sup>121,123</sup>, un Ac anti-CD40 trimérique<sup>92,124</sup>, des fibroblastes exprimant le CD40L<sup>35,40,124-126</sup> ou des extraits de membrane cellulaire contenant CD40L<sup>113</sup>. Un groupe a même cryopréservé les CD40-B avant de les utiliser comme CPA<sup>126</sup>. Les variations dans la capacité des CD40-B à activer les LT pourraient certainement provenir des techniques de culture. Par exemple, les CD40-B qui induisent des Treg sont obtenus par stimulation sur des fibroblastes exprimant le CD40L puis cryopréservés avant d'être utilisés comme CPA<sup>126</sup>. Il est donc possible que la congélation affecte l'expression de différentes molécules de surface et la capacité de sécréter des cytokines. De plus, les CD40-B obtenus par l'activation avec un Ac anti-CD40 monomérique requièrent l'ajout de LPS ou de CpG-DNA afin d'augmenter leur capacité de présentation de l'Ac<sup>123</sup>. Cette technique produit probablement un signal via le CD40 sous-optimal, les résultats obtenus ne sont donc pas nécessairement applicables aux CD40-B générés suite à l'activation avec des anti-CD40 trimériques ou des fibroblastes exprimant le CD40L.

#### 1.2.4.3 La vaccination avec les CD40-B

Au cours des dernières années, des résultats intéressants ont été obtenus en utilisant les CD40-B dans un modèle d'activation de LT humains *in vitro* et dans un modèle canin. D'abord, la transfection des CD40-B avec des ARN permet d'activer une réponse des LT CD8<sup>+</sup>. Des CD40-B ou des CD (dérivées des monocytes *in vitro*) obtenus à partir d'un même individu, ont été transfectés avec des ARN d'un épitope du virus de la grippe, restreint au HLA-A2, et ont chacun activé des LT CD8<sup>+</sup> autologues *in vitro*. Ces LT CD8<sup>+</sup> sont fonctionnels puisqu'ils sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et ont une activité cytotoxique<sup>125</sup>. Des LT CD8<sup>+</sup>

isolés du sang périphérique humains ont aussi été activés *in vitro* avec des CD40-B transfectés avec des ARN totaux de cellules HepG2, une lignée de carcinome hépatocellulaire<sup>133</sup>.

Chez des chiens ayant un lymphome, la vaccination avec des CD40-B transfectés avec des ARN de tumeur autologue a permis d'augmenter la survie suite à une rechute. Les chiens ayant un lymphome ont été traités avec le traitement de chimiothérapies et, une fois en rémission, vaccinés ou non avec les CD40-B. Parmi ces chiens, ceux qui avaient reçu un vaccin CD40-B, plus de chiens ont survécu à long terme<sup>134</sup>. Les CD40-B pourraient aussi être utilisés afin d'identifier les épitopes des Ag tumoraux<sup>135</sup> et d'amplifier des LT spécifiques de ces épitopes<sup>136</sup>. Le potentiel des CD40-B est donc bien réel et ne se limite pas à l'immunisation comme telle. Cependant, d'autres études sont requises afin de mieux caractériser la réponse induite par l'immunisation avec les CD40-B *in vivo*.

### 1.3 La réponse effectrice et mémoire des LT CD8<sup>+</sup>

Suite à la reconnaissance de son Ag spécifique sur une CPA, la réponse primaire du LT CD8<sup>+</sup> est déclenchée et peut se diviser en trois phases : l'expansion, la contraction et la mémoire. L'activation du LT naïf (LTn) CD8<sup>+</sup> induit une multitude de changements (molécules de surface, facteurs de transcription, métabolisme) qui permettent la prolifération massive et l'acquisition de propriétés effectrices (sécrétion de cytokine et cytotoxicité) menant à l'élimination du pathogène. L'initiation de la réponse et l'expansion mènent au pic de la réponse où principalement 2 populations de LT effecteurs (LTe) sont observées : les SLEC (*Short-lived effector cells*) et les MPEC (*Memory-precursor effector cells*). Les SLEC meurent par apoptose suite à l'élimination du pathogène tandis que les MPEC survivent pour former les LT mémoires (LTm). Il existe 3 populations de LTm CD8<sup>+</sup> qui survivent à long-terme: les LTm effectrices (T<sub>EM</sub>) qui se retrouvent dans les organes périphériques et ont des fonctions effectrices immédiates, les LTm centrales (T<sub>CM</sub>) qui se retrouvent dans les organes lymphoïdes et prolifèrent rapidement ainsi que les LTm résidentes (T<sub>RM</sub>) qui demeurent au site d'infection. Durant la phase mémoire, les LT CD8<sup>+</sup> s'autorenouvellent afin d'assurer la protection à long

terme de l'organisme. Les sections suivantes abordent plus en détails ces différentes étapes de la réponse primaire des LT CD8<sup>+</sup> qui sont schématisées à la figure 4.

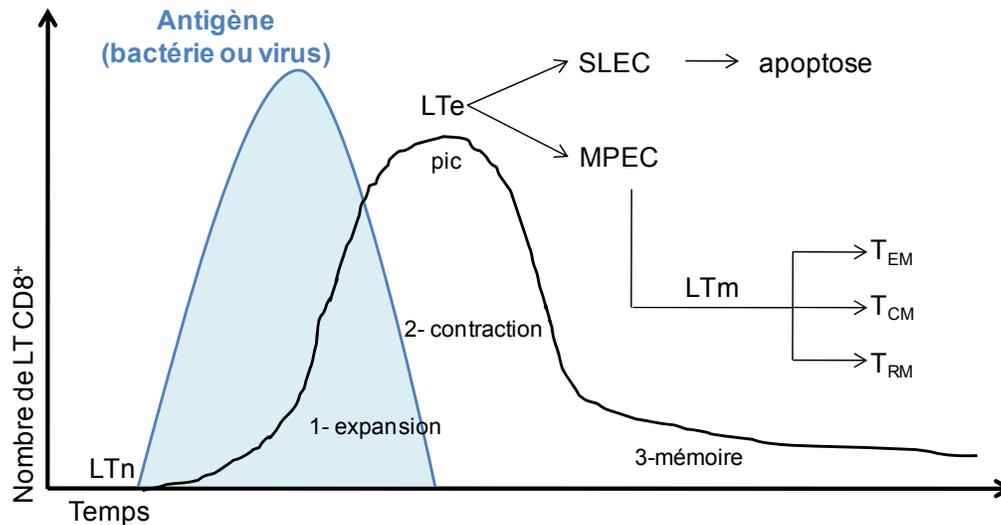


Figure 4. Représentation de la réponse des LT CD8<sup>+</sup> et des principales populations générées. Lorsque le LTn rencontre son Ag spécifique, un programme de différenciation caractérisé par trois phases débute: l'expansion (1), la contraction (2) et la mémoire (3). Au pic de la réponse, principalement deux populations de LTe sont présentes : les SLEC et les MPEC. Les SLEC vont mourir par apoptose alors que les MPEC vont survivre pour former les LTm qui se subdivisent en 3 populations : les T<sub>EM</sub>, les T<sub>CM</sub> et les T<sub>RM</sub>. Inspiré de<sup>137</sup>.

### 1.3.1 La phase d'expansion

La phase d'expansion est induite suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> par la reconnaissance de 3 signaux donnés par une CPA. Premièrement, le récepteur des cellules T (RCT) doit reconnaître son Ag spécifique présenté sur une molécule du CMH de type I. Deuxièmement, le LT CD8<sup>+</sup> doit aussi recevoir des signaux de costimulation via différents récepteurs notamment le CD28. Troisièmement, l'inflammation doit être perçue par les récepteurs de cytokines. En réalité, la nécessité et l'impact des signaux 2 (costimulation) et 3

(cytokine) pourront varier selon l'intensité globale du signal d'activation reçu. Les prochaines sections détailleront ces trois signaux ainsi que leur impact dans la réponse des LT CD8<sup>+</sup>. Certaines questions subsistent quant à la réponse des LT CD8<sup>+</sup>. Différentes CPA peuvent fournir ces trois signaux, mais est-ce que l'activation des LT CD8<sup>+</sup> qui en résultera sera équivalente? Est-ce que d'autres voies de signalisation peuvent avoir un effet sur la réponse des LT CD8<sup>+</sup>? Ces questions fondamentales sont abordées dans cette thèse.

### **1.3.1.1 Signal 1 : la reconnaissance de l'antigène**

#### *1.3.1.1.1. La signalisation du RCT*

L'Ag est reconnu par le RCT, composé de deux chaînes polypeptidiques distinctes nommées RCT $\alpha$  et RCT $\beta$  reliées par un pont disulfide. Chacune de ces chaînes est composée d'un domaine variable, d'un domaine constant, d'un domaine transmembranaire hydrophobique et d'une queue cytoplasmique. Par rapport à la membrane plasmique, le domaine constant est proximal tandis que le domaine variable est distal. Le domaine variable permet l'interaction avec le peptide antigénique et le CMH (pCMH). Seul, le RCT est incapable de signaler suite à la liaison avec son pCMH. Il est donc associé avec un complexe composé de chaînes CD3. Le complexe CD3 est constitué de sous-unités  $\delta, \epsilon, \gamma, \zeta$  formant un hétérodimère  $\epsilon\delta$ , un hétérodimère  $\gamma\epsilon$  et un homodimère  $\zeta\zeta$ , tous liés de façon non covalente pour former le complexe du RCT comprenant 8 chaînes polypeptidiques. Chacune de ces chaînes CD3 comporte des motifs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) pour un total de 10<sup>138</sup>. La phosphorylation de ces motifs ITAM amorcera la signalisation suite à la reconnaissance du complexe pCMH.

Les contacts avec les peptides sont médiés par les boucles hypervariables CDR3 (*complementary-determining region*) des domaines variables du RCT. Les contacts avec le CMH sont assurés par des a.a. conservés au sein de la région variable des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du RCT ( $V_\alpha$  et  $V_\beta$ ) contenus au sein des boucles CDR1 et CDR2<sup>138</sup>. Le RCT interagirait d'abord avec le CMH afin d'induire le positionnement adéquat requis pour l'interaction subséquente avec le peptide. La signalisation a lieu seulement si des contacts stables sont permis grâce à la

reconnaissance du peptide. L'affinité d'interaction entre les complexes pCMH et le RCT est de l'ordre du micro molaire ( $\mu\text{M}$ ) pour un peptide agoniste, ce qui est très faible comparativement à d'autres forces d'interactions protéines-protéines connues. Malgré cela, le RCT est très sensible, car il peut répondre suite à la reconnaissance spécifique d'un seul complexe pCMH pour induire la cytotoxicité chez des LT effecteurs, alors que 10 complexes pCMH seraient requis pour l'activation complète d'un LT naïf<sup>139,140</sup>. En fait, les conditions de mesure de l'affinité en phase soluble ne reflètent pas la réalité biologique de l'interaction RCT-pCMH qui est stabilisée par l'ancrage à la membrane plasmique, l'interaction avec les molécules de signalisation et les corécepteurs<sup>141</sup>. En effet, des mesures de l'affinité *in situ* (entre les RCT sur un LT et des complexes pCMH fixés à une bicouche<sup>142</sup> ou un globule rouge<sup>143</sup>) démontrent une augmentation de l'affinité d'interaction entre le RCT et le pCMH<sup>142,143</sup>. Dans le répertoire T périphérique, le nombre de RCT distincts est estimé à  $2 \times 10^6$  chez la souris<sup>144</sup> et  $2.5 \times 10^8$  chez l'homme<sup>145</sup>. Une grande diversité de peptides peut ainsi être reconnue, assurant une réponse spécifique contre de nombreux Ag. Pour que le LT soit activé complètement, un grand nombre de RCT doit être stimulé et ce, durant des heures<sup>140</sup>. La signalisation via le RCT active principalement la voie de la PKC- $\theta$  (protéine kinase C- $\theta$ ), la voie calcique et la voie Ras-MAPK qui mènent à l'activation des facteurs de transcription AP-1, NF- $\kappa$ B et NFAT (Figure 5) qui contribuent à l'activation du programme génétique permettant la différenciation des LTe (Revue dans<sup>146</sup>).

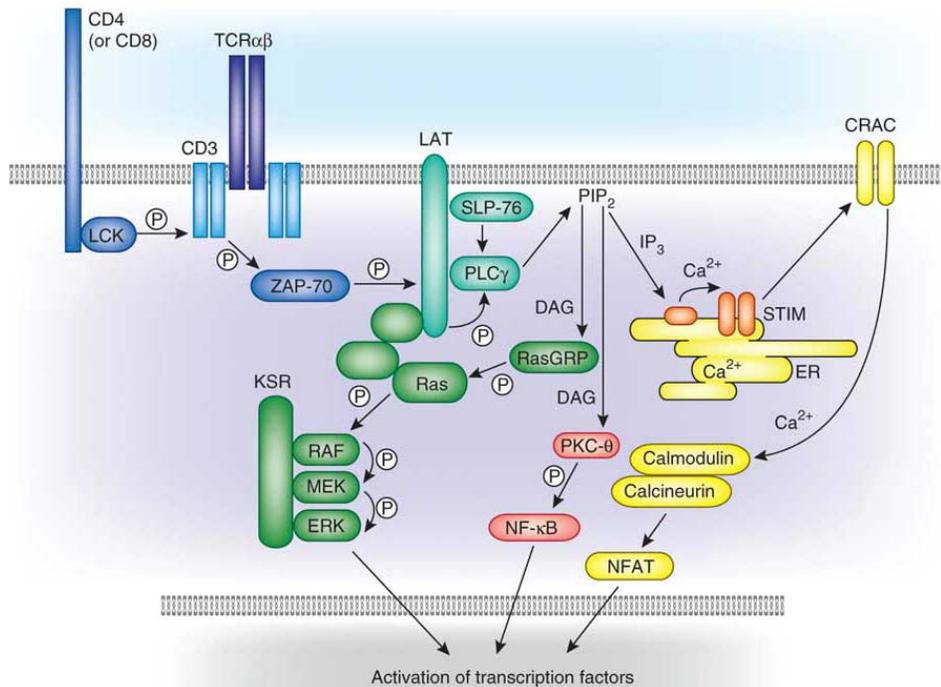


Figure 5. La Signalisation du RCT. Cascade de phosphorylation du complexe proximal de phosphorylation (bleu), signalisation de la voie Ras-MAPK (vert), signalisation par PKC-θ (rose) et signalisation de la voie calcique (jaune). Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Immunology <sup>141</sup> ©2012.

### 1.3.1.1.2 La synapse immunologique

La liaison d'un ligand d'une affinité suffisante induit la réorganisation du cytosquelette permettant la formation de la synapse immunologique (SI) au site d'interaction entre la CPA et le LT. Cette structure organisée rapproche les cellules et facilite la signalisation du RCT grâce à l'exclusion des molécules encombrantes et des molécules inhibant le signal RCT comme les phosphatases. Lors de l'initiation du signal, il y a rapidement formation de micro-agrégats contenant le RCT et le CD28 au site de contact avec la CPA. La surface de contact entre la CPA et le LT va ensuite augmenter ce qui permettra la formation de nouveaux micro-agrégats (0 à 2 minutes suivant la reconnaissance de l'Ag). Ces micro-agrégats vont recruter les molécules de signalisation et initier l'activation du LT. Ensuite, les micro-agrégats s'agglomèrent pour finalement former une SI plus dense (La contraction, 2 à 10 minutes

suivant la reconnaissance de l'Ag). La synapse immunologique mature peut durer de minutes à plusieurs heures. Les molécules comme CTLA-4 ou PD-1 se joindront à la synapse immunologique afin d'influencer la transmission du signal d'activation. La SI mature (Figure 6) est composée du cSMAC (*central supramolecular activation complex*), du pSMAC (*peripheral SMAC*) et du dSMAC (*distal SMAC*). Du côté du LT, le cSMAC comprend le RCT, les corécepteurs (CD8/CD4) et les récepteurs de costimulation ou d'inhibition (CD28 ou CTLA-4) ; le pSMAC est riche en molécules d'adhésion ou reliées au cytosquelette (LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*)) alors que le dSMAC est riche en actine, en CD43, en CD44 et en CD45, qui sont des molécules encombrantes. Des micro-agrégats se forment constamment au niveau du dSMAC et migreront vers le centre de la SI afin de soutenir le signal RCT (Figure 6). (Revue dans<sup>141,147-150</sup>). La formation de radeaux lipidiques, qui sont des structures organisées au niveau de la membrane plasmique riches en cholestérols et en sphingolipides et enrichie en molécule de signalisation, est nécessaire pour l'activation des LT. Ces radeaux lipidiques se retrouvent au cSMAC mais pas au niveau des micro-agrégats<sup>150</sup>. La SI permet d'amplifier le signal reçu et de soutenir l'interaction de longue durée entre le LT et la CPA

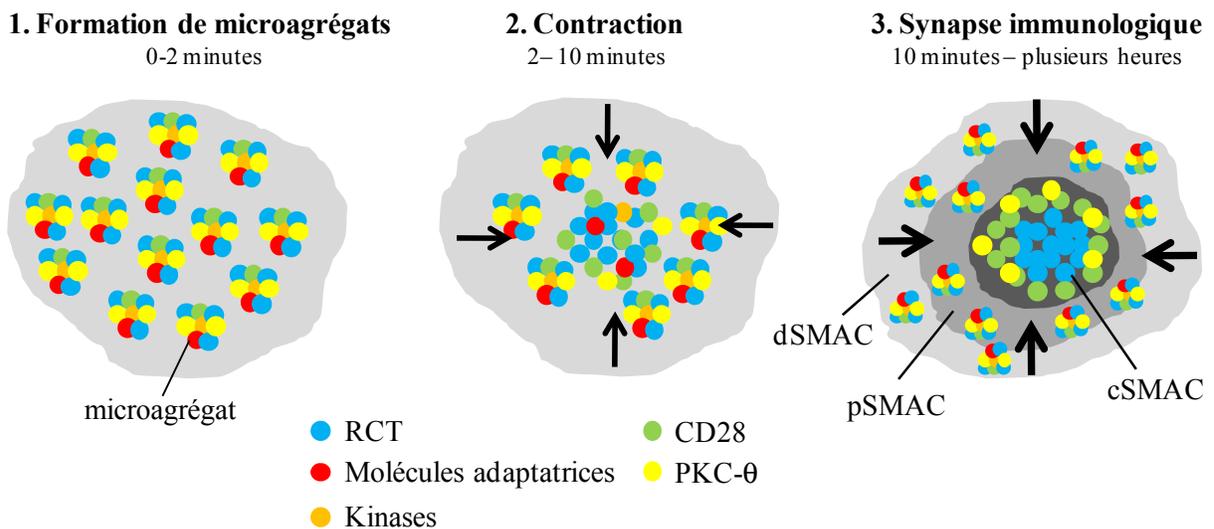


Figure 6. La synapse immunologique. Inspiré de<sup>149</sup>

#### 1.3.1.1.3 L'influence sur la réponse des LT CD8<sup>+</sup>

La force du signal RCT peut influencer la réponse des LT CD8<sup>+</sup>. En effet, l'altération des peptides pour diminuer leur affinité diminue la réponse des LT CD8<sup>+</sup>. Le groupe de Bevan a montré que des LT CD8<sup>+</sup> répondant à un peptide de haute affinité prolifèrent plus, sont retenus plus longtemps au sein des PALS (*periarteriolar lymphocytes sheaths*) et contractent plus tardivement que les clones répondant à un peptide de plus faible affinité<sup>151</sup>. Un autre groupe a démontré qu'un signal optimal via le RCT est requis pour la formation de LTm CD8<sup>+</sup>. Des souris transférées avec des OT-1 (LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du peptide OVA<sub>257-264</sub> de l'ovalbumine (OVA) présenté par le H2-K<sup>b</sup>), dont un a.a. dans le domaine transmembranaire de la chaîne  $\beta$  du RCT a été muté ( $\beta$ TMDmut), ont été infectées avec *Listeria monocytogenes* exprimant OVA (*Lm*-OVA). Les OT-1  $\beta$ TMDmut ont un défaut de signalisation les empêchant de recruter le RCT et la PKC à SI diminuant l'activation de NF- $\kappa$ B donc le signal transmis. La réponse effectrice générée est normale mais, les LTm ne sont pas générés<sup>152</sup>. Notre laboratoire a aussi démontré que la quantité d'Ag présentée par les CD au moment de l'activation influence la génération de LTm sans affecter la réponse effectrice. Une plus grande quantité d'Ag à la surface des CD, donc une plus grande avidité d'interaction, augmente la génération de LTm<sup>122</sup>.

#### 1.3.1.2 Signal 2 : la costimulation et la coinhibition

Cette section aborde le concept de la costimulation et de la coinhibition lors de l'activation des LT. Les différentes molécules impliquées ainsi que leurs voies de signalisations seront décrites ici. De plus, les rôles précis que jouent ces molécules dans la réponse immune des LT CD8<sup>+</sup> seront aussi abordés.

Initialement, le concept de costimulation voulait que le LT, pour être activé complètement, perçoive 2 signaux : la reconnaissance du complexe pCMH via son RCT et la costimulation via CD28, l'absence de costimulation entraînant l'anergie<sup>153</sup>. Le concept de

costimulation a évolué pour inclure l'ensemble des molécules coactivatrices et coinhibitrices. Les cascades de signalisation, induites par les molécules de costimulation, chevauchent souvent les voies induites par le RCT. L'activation des récepteurs coactivateurs amplifie le signal du RCT alors que l'activation des récepteurs coinhibiteurs diminue le signal du RCT. Ainsi, les signaux de costimulation influencent le niveau d'activation des LT et ses choix de différenciation. La costimulation peut être vue selon le modèle de la marée (*tide model*)<sup>154</sup>, qui propose que suite au signal RCT et au premier signal de costimulation via CD28, il y a une augmentation des corécepteurs. Au pic de la vague (de l'activation), la balance entre la signalisation des différents corécepteurs activateurs et inhibiteurs déterminera le niveau d'activation final ainsi que le destin du LT activé<sup>154</sup>. Durant la période d'activation, il y a une dominance des corécepteurs activateurs qui laisse ensuite la place à une dominance des corécepteurs inhibiteurs<sup>154,155</sup>. La costimulation est régulée de façon spatiotemporelle puisque certaines molécules sont présentes chez le LTn CD8<sup>+</sup> mais d'autres doivent être induites par l'activation. Plusieurs molécules de costimulation ont été localisées à la synapse immunologique et sont donc présentes au site de contact avec la CPA afin d'interagir avec leur ligand respectif<sup>156</sup>. Puisqu'un ligand peut être reconnu par plusieurs récepteurs, une régulation par compétition est aussi possible. Les récepteurs de costimulation se subdivisent en deux grandes familles : la superfamille des immunoglobulines de type CD28 et la superfamille des récepteur TNF (*tumor necrosis factor*).

#### 1.3.1.2.1 La superfamille des immunoglobulines de type CD28

Les différents récepteurs de la superfamille CD28 et leurs ligands sont détaillés dans la section suivante. La figure 7 récapitule les différentes interactions entre les molécules ainsi que l'effet activateur ou inhibiteur de l'interaction.

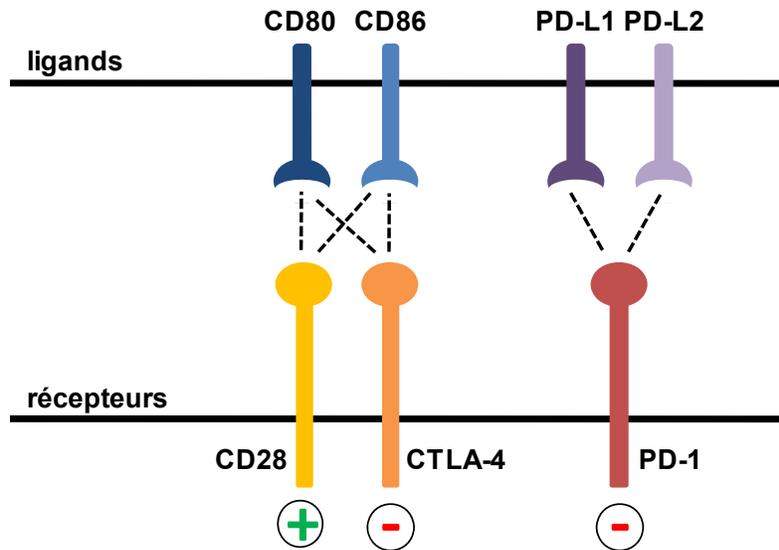


Figure 7. Les récepteurs de la superfamille CD28. Les lignes pointillées montrent les interactions possibles entre les récepteurs et les ligands. Le signe + indique une costimulation activatrice, le signe – une costimulation inhibitrice. Inspiré de <sup>155</sup>.

#### 1.3.1.2.1.1 CD28

Le premier récepteur de costimulation identifié fut le CD28<sup>153</sup>. Il est exprimé de façon constitutive sur les LTn CD8<sup>+</sup>. Ses ligands sont le CD80 (B7.1) et le CD86 (B7.2) qui sont exprimés par les CPA ; soit les CD, les LB et les monocytes. Le signal via CD28 active la PI3K qui induit une multitude de gènes permettant la régulation de différentes voies comme la progression du cycle cellulaire, l'apoptose et l'état métabolique<sup>157</sup>. Le CD28 peut aussi lier GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) menant à la translocation nucléaire de NFAT augmentant la transcription de l'IL-2 et stabilisant son ARNm<sup>155</sup> (Figure 8). Ceci a pour effet d'amplifier le signal RCT. De plus, le signal via CD28 augmente la transcription de molécules anti-apoptotiques comme Bcl2 et Bcl-X<sub>L</sub>. Ainsi, le CD28 contribue à augmenter la prolifération et la survie des LT<sup>155,157</sup>. L'absence de signal via le récepteur CD28 induit l'anergie du LT c'est-à-dire un état d'hyporéactivité caractérisé par une incapacité à proliférer et à sécréter de l'IL-2 <sup>158</sup>. L'anergie est causée par une diminution de l'activation de Ras, de la voie calcique et de NFAT ainsi que de NF-κB, des voies communes avec le RCT<sup>159-162</sup>.

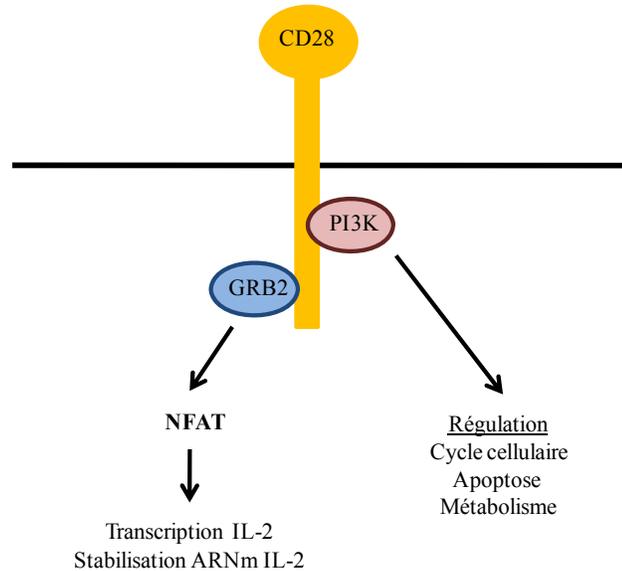


Figure 8. La signalisation du récepteur CD28

Le signal de costimulation via CD28 est primordial pour une activation complète du LT CD8<sup>+</sup> au moment de la reconnaissance antigénique. En absence de signal CD28, l'expansion des effecteurs de même que leur cytotoxicité sont diminuées dans de nombreux modèles infectieux comme VSV (Virus de la stomatite vésiculaire) (utilisation d'Ac CTLA4-Ig<sup>163</sup>, utilisation de souris CD28<sup>-/-</sup><sup>164</sup>) ou influenza A (utilisation de souris CD80<sup>-/-</sup>CD86<sup>-/-</sup><sup>165</sup>, utilisation de souris CD28<sup>-/-</sup><sup>166</sup>). Cependant, suite à une infection de souris CD28<sup>-/-</sup> ou CD80<sup>-/-</sup>CD86<sup>-/-</sup> avec LCMV (virus de la chorioméningite lymphocytaire) Armstrong, pratiquement aucune différence n'est observée dans l'expansion clonale des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques envers des épitopes de différentes affinités<sup>164,167</sup>. Dans les souris CD28<sup>-/-</sup>, le virus LCMV Armstrong est contrôlé aussi efficacement que dans les souris sauvages<sup>164</sup>. Cette différence entre VSV et LCMV s'expliquerait par la quantité d'Ag présent. Lors d'une infection avec LCMV Armstrong, due à la réplication rapide et importante du virus, la quantité d'Ag présente est élevée permettant un signal TCR soutenu rendant le signal de costimulation dispensable<sup>164,167</sup>. Lors une infection de souris CD80<sup>-/-</sup>CD86<sup>-/-</sup> avec LCMV Traub, une souche se disséminant et ayant la capacité d'établir une infection chronique, la réponse des LT CD8<sup>+</sup> dépend de la costimulation CD28<sup>167</sup>. Cela appuie le concept que les propriétés du virus comme la quantité d'Ag disponible influencent la nécessité de la costimulation CD28. Il est aussi possible que

d'autres molécules de costimulation comme CD70 soient différemment induites suite à différentes infections compensant pour l'absence de costimulation via CD28.

Le signal via CD28 influence aussi le phénotype des LTm CD8<sup>+</sup> et leur fonctionnalité. Dans un modèle d'infection de souris CD28<sup>-/-</sup> avec le virus de la vaccine (VV), moins de LTe CD8<sup>+</sup> spécifiques sont produits, mais au stade mémoire autant de LTm sont présents. Cependant, ces LTm CD28<sup>-/-</sup> ont un phénotype différent exprimant moins de CD27 et de CD122 et produisant moins d'IL-2<sup>167,168</sup>. De plus, lors d'une seconde exposition à l'Ag en absence de signal via CD28, l'expansion des effecteurs secondaires est moins importante<sup>167,168</sup>. Lors d'infections avec influenza, HSV ou LCMV, les LTm CD8<sup>+</sup> requièrent aussi un signal via CD28 pour répondre efficacement lors d'une seconde infection<sup>167,169</sup>. Il faut considérer que l'absence de signal CD28 affecte la réponse des LT CD4<sup>+167</sup>. Puisque l'aide CD4 influence la fonctionnalité des LTm CD8<sup>+170</sup>, elle pourrait être responsable du phénotype observé en absence de CD28.

#### 1.3.1.2.1.2 CTLA-4

Le récepteur inhibiteur CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, CD152) interagit aussi avec les molécules CD80 et CD86. Une compétition entre CTLA-4 et CD28 existe pour l'interaction avec leurs ligands communs. Différents mécanismes permettent à CTLA-4 d'inhiber le signal RCT. D'abord, l'affinité de CTLA-4 pour CD80 et CD86 est plus élevée (environ 10x), favorisant cette interaction<sup>171,172</sup>. Ensuite, l'expression de CTLA-4 est augmentée suite à l'activation du LT et localisée au cSMAC permettant de physiquement exclure la liaison de CD80 et CD86 à CD28<sup>173</sup>. De plus, l'augmentation de l'expression de CTLA-4 est suivie de l'endocytose de CD28 qui n'est alors plus disponible pour lier ses ligands<sup>174</sup>. Il y a aussi endocytose de CTLA-4 suite à son activation entraînant ses ligands (CD80 et CD86) par transendocytose limitant ainsi le signal de costimulation pouvant être donnée par la CPA<sup>175</sup>. Finalement, son interaction avec ses ligands diminue le signal RCT grâce à l'activation de la phosphatase SHP-2 capable de déphosphoryler CD3ζ<sup>176</sup>. CTLA-4 défait aussi les radeaux lipidiques ce qui termine la signalisation et inhibe la prolifération des LT<sup>177</sup>. L'expression de CTLA-4 est importante pour contrôler les réponses immunes puisque

si ce récepteur est délété ou inhibé, il y aura hyperprolifération suite à une infection et induction d'autoimmunité<sup>178</sup>.

Chez les LT CD8<sup>+</sup>, les études in vivo sont en accord avec un rôle inhibiteur de CTLA-4. En effet, des LT OT-1, n'exprimant pas CTLA, transférée dans des souris subséquemment immunisées avec des Ac anti-DEC-OVA et anti-CD40 sécrètent plus de cytokines (IFN- $\gamma$  et granzyme B) et ont une meilleure activité cytotoxique<sup>179</sup>. Lors d'infection de souris avec *Lm*, l'inhibition de CTLA-4 à l'aide d'un Ac bloquant au moment de l'activation augmente le nombre de LTm générés et leur fonctionnalité (sécrétion de cytokine et contrôle de la bactérie)<sup>180</sup>.

#### 1.3.1.2.1.3 PD-1

Le récepteur inhibiteur PD-1 (*Programmed death-1*, CD279) est encodé par le gène *Pdcd1*. Une grande homologie de séquence du gène et des ses éléments régulateurs existe chez les mammifères. PD-1 est exprimé par les LT activés, mais peut aussi être présent chez les LB, les cellules NK, les NKT, les monocytes, les macrophages et les CD. PD-1 possède deux ligands : PD-L1 (B7-H1 ou CD274) et PD-L2 (B7-DC ou CD273). PD-L1 est exprimé de façon constitutive sur une variété de cellules comme les LT et LB, les CD, les macrophages, mais aussi des cellules non-hématopoïétiques. Quant à la molécule PD-L2, son expression est beaucoup plus restreinte. Elle a été détectée sur certains LB et son expression peut être induite sur les CD activées, les monocytes et les macrophages<sup>181,182</sup>. Chez les LT, suite à la liaison de PD-1 à un de ses ligands, les tyrosines des motifs ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) et ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) sont phosphorylés permettant le recrutement des phosphatases SHP 1 et 2 (*SH2-domain containing tyrosine phosphatase 1 et 2*) qui diminuent le signal RCT en déphosphorylant CD3 $\zeta$  et Zap-70, résultant en une diminution de l'activation de PKC- $\theta$ <sup>183</sup>.

La délétion de PD-1 chez la souris cause des maladies auto-immunes spontanées comme l'arthrite, la gastrite ou la cardiomyopathie<sup>184,185</sup>, illustrant le rôle primordial que joue cette molécule dans le contrôle de la réponse immune. Suite à leur activation via le RCT et la

costimulation, les LT CD8<sup>+</sup> expriment PD-1 de façon transitoire. Lors d'une infection aiguë, suite à l'élimination de la source antigénique il y a diminution de l'expression de PD-1. L'expression continue de PD-1 est caractéristique des LT CD8<sup>+</sup> épuisés et est associée à leur perte de fonctionnalité. L'inhibition de la voie PD-1, en combinaison avec l'inhibition d'autres voies inhibitrices, permet de restaurer la fonction des LT CD8<sup>+</sup> contre différents cancers (mélanomes, adénocarcinomes) et infections chroniques (*Plasmodium*, LCMV)<sup>186</sup>. Plus précisément, lors d'infection avec LCMV clone 13, l'inhibition de PD-1 serait importante pour restaurer l'activité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> afin d'éliminer les cellules infectées<sup>187</sup>. De plus, un signal de costimulation est requis pour restaurer la fonction des LT CD8<sup>+</sup> épuisés donc l'inhibition de PD-1 pourrait contribuer à augmenter le signal d'activation perçu par le LT CD8<sup>+</sup><sup>187</sup>.

Vu l'importance du rôle de PD-1 lors d'infections chroniques et dans le développement de cancer, la régulation de sa transcription a été caractérisée. Grâce à des analyses *in silico*, trois régions conservées chez les mammifères nommées CR-A, B et C (*Conserved Region*) ont été identifiées au sein du gène *Pdcd1*. Ces régions sont hypersensibles à la DNase I, elles sont donc accessibles aux facteurs de transcription et contiennent potentiellement des éléments régulateurs. Les régions CR-B et CR-C sont situées en amont du site de l'initiation de la transcription de *Pdcd1* alors que la région CR-A correspond au premier exon<sup>188,189</sup>. Chez les LT CD8<sup>+</sup>, suite à l'activation, de nombreux facteurs de transcription régulent la transcription de *Pdcd1*. D'abord, la liaison du RCT induit la translocation nucléaire de NFATc1 qui augmente la transcription de *Pdcd1* en se liant à la séquence GGAAA de la région CR-C<sup>188</sup>. Toujours chez les LT CD8<sup>+</sup>, la présence d'IFN- $\alpha$ , simultanément avec le signal RCT, augmente l'expression de PD-1 via la liaison directe d'IRF9 à un ISRE (*IFN stimulation responsive element*) situé entre -1021 et -1052 pb en amont du site d'initiation de la transcription<sup>190</sup>. La présence de cytokines de la famille  $\gamma$ c (IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21) dans le milieu environnant peut aussi contribuer à l'augmentation de l'expression de PD-1 chez des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> humains en absence de signal RCT, principalement sur les cellules mémoires<sup>191</sup>. Cependant, les sites exacts d'interaction des STAT associés à ces cytokines n'ont pas été identifiés. Une étude récente démontre que l'IL-6 et l'IL-12, des cytokines

inflammatoires, peuvent aussi contribuer à l'augmentation de l'expression de PD-1 via l'induction de STAT3 et STAT4 respectivement. STAT3 et STAT4 collaborent avec NFATc1 et CTCF (*insulator protein CCCTC-binding factor*) en se liant à de nouvelles séquences régulatrices pour activer la transcription de *Pdcd1*. Ces nouvelles régions régulatrices sont situées à -26.7 kb, -3.7kb et à + 17.1 kb du site de l'initiation de la transcription<sup>189</sup>. Un autre facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la transcription de *Pdcd1* est T-bet qui est induit en présence d'inflammation. L'ablation de T-bet, grâce à des souris T-bet<sup>fl/fl</sup>-CD4-Cre, augmente l'expression de PD-1 et le phénotype épuisé des LT CD8<sup>+</sup>. À l'opposé, la surexpression de T-bet diminue l'expression de PD-1<sup>192</sup>. T-bet réprime directement l'expression de PD-1 puisqu'un site de liaison a été identifié à environ -0.5kb du site d'initiation de la transcription, à la jonction de la région CR-B<sup>192</sup>. Très récemment, il a été démontré que Blimp-1 réprime aussi l'expression de PD-1. Comme pour T-bet, l'expression de Blimp-1 est inversement corrélée avec l'expression de PD-1. Blimp-1 réprime l'expression de PD-1 de trois façons. D'abord, il réprime directement l'expression de NFATc1, un activateur de la transcription de PD-1. Ensuite, la liaison de Blimp-1 au promoteur de *Pdcd1* (-786 à -775pb) empêche la liaison de NFATc1 à son site situé dans la région CR-C. Finalement, la présence de Blimp-1 au promoteur modifie le profil d'acétylation et de méthylation des régions conservées induisant une structure répressive de la chromatine<sup>193</sup>. La liaison des facteurs de transcription régulant la transcription de *Pdcd1* est schématisée à la figure 9. Dans un modèle d'infection chronique avec LCMV, une persistance de l'Ag entraîne le maintien de l'expression de PD-1 grâce à la déméthylation permanente des régions régulatrices CR-B et CR-C de son locus. La déméthylation permet de conserver la chromatine dans un état ouvert pour maintenir la transcription du gène<sup>194</sup>.

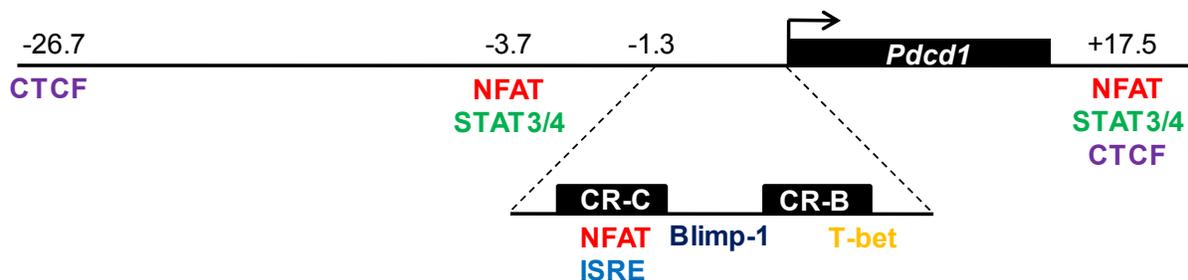


Figure 9. Schématisation des éléments régulateurs connus au gène *Pdccl1*. Les chiffres représentent les distances en kb par rapport au site d'initiation. D'après les articles<sup>188-190,192-194</sup>.

#### 1.3.1.2.2 La superfamille des récepteurs TNF

Les membres de la superfamille des récepteurs TNF se subdivisent en trois groupes: les récepteurs contenant un domaine de mort (DD, *death domain*), les récepteurs leurres (*decoy receptor*) et les récepteurs liés au TRAF (*TNF receptor-associated factor*). Dans la famille des TRAF, les paires récepteurs/ligands CD27/CD70, OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BBL, CD30/CD30L et GITR/GITRL ont tous une activité costimulatrice (Figure 10). La signalisation de ces récepteurs fonctionne de façon similaire. Les récepteurs présents sur les LT vont interagir avec un trimère de ligand et adopteraient aussi une configuration trimérique permettant de recruter différents TRAF (Figure 7)<sup>195</sup> pour activer différentes voies de signalisation dont NF-kB, JNK, MAPK, AP1, Erk et NFAT, les mêmes molécules distales que le RCT, contribuant à amplifier le signal d'activation.

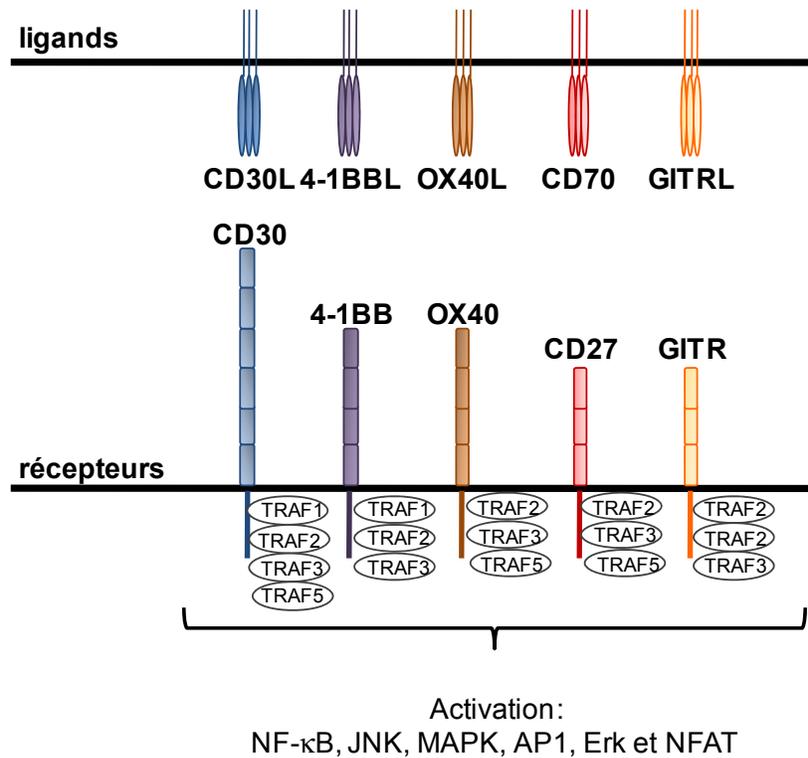


Figure 10. Les récepteurs TNF, leur TRAF et les voies de signalisation induites. Inspiré de<sup>155,196,197</sup>

Le tableau 2 décrit les fonctions respectives des récepteurs TNF lors de la réponse immunitaire des LT CD8<sup>+</sup>. Les sections suivantes présentent les données résumées dans ce tableau. Collectivement, ces molécules ont diverses fonctions, soit: d'augmenter l'amplitude de la réponse, c'est-à-dire le nombre de LTe et conséquemment de LTm (1), d'augmenter la génération de LTm sans affecter le nombre de LTe (2), d'augmenter la survie des LTe et/ou des LTm (3), d'augmenter la diversité des clones activés (4), de favoriser l'accumulation des LTe au site d'infection (4) et d'inhiber la réceptivité des LTe envers l'effet régulateur des Treg (5). Les LT CD8<sup>+</sup> expriment différentes combinaison de ces récepteurs TNF qui peuvent agir en synergie<sup>198,199</sup>. Par exemple, lors d'infection influenza, le CD27 agirait en synergie avec 4-1BB et OX40 pour augmenter la quantité et la qualité des LTm CD8<sup>+</sup> générés<sup>199</sup>.

Récepteurs	Ligands	Expression des récepteurs	Expression des ligands	Fonctions lors de la réponse des LT CD8+
<b>CD27</b> TNFRSF7	CD70 (TNFSF7)	-LTn augmentée par l'activation puis diminuée <sup>200</sup>	-CD -LB -LT activés <sup>201</sup>	-Augmente l'amplitude de la réponse effectrice et mémoire <sup>200,202-205</sup> -Augmente la survie des LTe <sup>202</sup> -Important pour l'accumulation des LTe au site d'infection <sup>206,207</sup> -Augmente la diversité des clones activés <sup>208</sup>
<b>4-1BB</b> CD137 TNFRSF9	4-1BBL TNFSF9	-LT CD8 <sup>+</sup> activés, mime le patron d'expression du CD69 <sup>200,209,210</sup> -CD <sup>211,212</sup>	-CD -LB -macrophages activés <sup>211</sup>	-Augmente l'amplitude de la réponse effectrice et mémoire <sup>166,199,200,213,214</sup> -Augmente la génération de LTm <sup>215,216</sup> -Augmente la survie des LTm <sup>217,218</sup>
<b>OX40</b> TNFRSF4 CD134	OX40L TNFSF4 gp34	-LT CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> activés <sup>219,220</sup>	-CD -LB <sup>221</sup>	-Augmente l'amplitude de la réponse effectrice et mémoire <sup>205,220,222,223</sup> -Augmente la génération de LTm <sup>199,224</sup> -Augmente la survie des LTe <sup>225</sup>
<b>CD30</b> TNFRSF8	CD30L TNFSF8 CD153	-LT activés <sup>197</sup>	-CD -LB -macrophages <sup>197</sup>	-Augmente la génération de LTm <sup>198,226</sup>
<b>GITR</b> TNFRSF 18	GITRL TNFSF18	LTn, augmenté par l'activation <sup>227</sup>	-CD -LB -macrophages <sup>228,229</sup>	-Augmente amplitude de la réponse effectrice et mémoire <sup>230,231</sup> -Augmente la survie des LTe et LTm CD8 <sup>+</sup> <sup>232</sup> -Inhibe la réceptivité des LT CD8 <sup>+</sup> envers l'effet régulateur des Treg <sup>228</sup>

Tableau 2. Le rôle des récepteurs TNF lors de la réponse immune des LT CD8<sup>+</sup>

#### 1.3.1.2.2.1 CD27

Le récepteur CD27 (TNFRSF7) est exprimé sur les LT CD8<sup>+</sup> naïfs. Suite à leur activation, son expression est augmentée et ensuite diminuée suggérant une activité précoce dans la réponse CD8<sup>+</sup>. Son ligand est le CD70 (TNFSF7) présent chez les CD, les LB et les LT activés<sup>197,200,201,233</sup>. L'expression de CD70 sur les CD est importante pour l'activation des LT CD8<sup>+</sup><sup>204</sup>.

La signalisation via CD27 est requise pour une expansion clonale maximale des LTe CD8<sup>+</sup> ce qui influence directement la quantité de LTm formé dans des modèles d'infections avec VSV, *Listeria monocytogenes*<sup>204</sup>, une souche virulente de VV<sup>205</sup> et avec influenza<sup>202</sup>. Par exemple, moins de LTe CD8<sup>+</sup> sont présents au pic de la réponse dans des souris CD27<sup>-/-</sup> infectée avec l'influenza générant ainsi moins de LTm et induisant une réponse plus faible lors d'une seconde infection<sup>202</sup>. Toutefois, l'expression de CD27 n'influence pas la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> *in vitro* mais plutôt leur survie indépendamment du CD28<sup>202</sup>. L'expression de CD27 est aussi importante pour l'accumulation de LTe au site d'infection, soit les poumons lors d'infection avec influenza<sup>206</sup>. La liaison de CD27 induit la production d'IL-2 requise pour la survie au site d'infection avec influenza mais ne permet pas de restaurer les nombres cellulaires dans la rate et les ganglions<sup>207</sup>. Des données concordantes ont été obtenues dans des souris surexprimant CD70 où l'infection avec influenza augmente l'expansion des LT CD8<sup>+</sup><sup>203</sup>. Plus récemment, il a été démontré que l'expression de CD27 permet une réponse plus importante des LT CD8<sup>+</sup> ayant une plus faible affinité augmentant la diversité clonale des LTe et des LTm générés. Ainsi, une protection accrue contre des variantes du virus de l'influenza est observée<sup>208</sup>. Finalement, encore dans un modèle d'infection influenza, le CD27 agirait en synergie avec 4-1BB et OX40 pour augmenter la quantité et la qualité des LTm CD8<sup>+</sup> générés<sup>199</sup>.

#### 1.3.1.2.2.2. 4-1BB

Le récepteur 4-1BB (CD137, TNFRSF9) est exprimé suite à l'activation des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. *In vivo*, son expression augmente quelques heures après l'activation via le RCT et redescend mimant pratiquement le patron d'expression de la molécule d'activation précoce CD69<sup>209,210</sup>. Le récepteur 4-1BB se retrouve sur d'autres cellules dont différents types de CD où il peut augmenter l'expression de molécule de costimulation (CD80, CD86) et la sécrétion de cytokine (Il-6, Il-12) pouvant ainsi influencer la réponse des LT CD8<sup>+</sup><sup>211,212</sup>. Son ligand 4-1BBL (TNFSF9) a été identifié sur les CD, les LB et les macrophages activés<sup>197,211</sup>.

Le récepteur 4-1BB joue plusieurs rôles lors de la réponse des LT CD8<sup>+</sup>. Premièrement, plusieurs études démontrent que 4-1BB augmente l'expansion clonale des

effecteurs. D'abord cet effet de costimulation a été observé *in vitro* où la liaison de 4-1BB augmente la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> suite à une stimulation anti-CD3<sup>234</sup>. Ensuite, lors d'immunisation CFA-OVA et lors d'infection influenza ou LCMV, l'inhibition de l'interaction 4-1BB/4-1BBL ou l'utilisation de souris 4-1BB<sup>-/-</sup> ou 4-1BBL<sup>-/-</sup> diminue drastiquement le nombre de LTe retrouvé et conséquemment la génération de LTm<sup>199,213,214</sup>. À l'opposé, lors d'infection influenza A (PR8), l'administration d'un Ac anti-4-1BB agoniste augmente la réponse effectrice des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'épitopes dominants mais aussi sub-dominants dans les poumons des souris infectées<sup>166</sup>. Deuxièmement, dans certains modèles, 4-1BB est impliqué dans la génération de LTm CD8<sup>+</sup>. Lors d'infection avec influenza A (HKx31) des souris 4-1BBL<sup>-/-</sup>, la réponse effectrice n'est pas affectée mais le nombre de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'Ag décline à partir du jour 21. De plus lors d'une seconde infection avec influenza, la réponse secondaire des souris 4-1BBL<sup>-/-</sup> est plus faible<sup>215</sup>. La divergence entre les études de Hendriks<sup>199</sup>/Halstead<sup>166</sup> et Bertram<sup>215</sup> s'explique probablement par l'utilisation de 2 souches différentes d'influenza pouvant influencer la nécessité des molécules de costimulation. En appui à cette hypothèse, il a été montré que l'expression de 4-1BBL est requise pour la survie contre un virus d'influenza A plus virulent (PR8) mais pas contre un virus éliminé plus rapidement (X31)<sup>217</sup>. Troisièmement, 4-1BB permet la survie des LT CD8<sup>+</sup> mémoires. En effet, l'IL-15, une cytokine impliquée dans la l'homéostasie des LTm CD8<sup>+</sup> induit 4-1BB qui augmente leur survie. Des LTm générés *in vitro* et transféré dans des hôtes 4-1BBL<sup>-/-</sup> déclinent au cours du temps<sup>218</sup>. Un autre groupe a montré que le signal via 4-1BB, en absence d'Ag, induit la prolifération des LTm CD8<sup>+</sup>. En effet, seuls les LTm incorporent le BrdU suite à l'administration d'un Ac agoniste contre 4-1BB. En accord avec l'étude précédente qui montre que l'IL-15 agit en amont de 4-1BB, l'effet de cet Ac ne dépend pas de l'IL-15<sup>235</sup>. Plus récemment, il a été montré que 4-1BBL permet l'accumulation de LTm CD8<sup>+</sup> spécifique au virus MCMV. L'administration d'un Ac bloquant anti-4-1BBL donné au début de l'infection (jour 0 à 5) mais pas plus tardivement (jour 7 à 13) diminue le nombre de LTm générée suggérant que la nécessité du signal via 4-1BB est requis lors de l'expansion du LT CD8<sup>+</sup><sup>216</sup>.

La plupart des études décrites dans le paragraphe précédent ne permettent pas de distinguer quels types cellulaires sont affectés par le signal via 4-1BB. Comme les récepteurs

4-1BB sont exprimés à la fois chez les LT et les CD, cette question est pertinente. À ce sujet, une étude très récente démontre que l'expression de 4-1BBL par les CD en trans (sur les CD ne présentant pas l'Ag spécifique) permet une meilleure activation des LT CD8<sup>+</sup> en augmentant l'état de maturation des CD présentant l'Ag<sup>236</sup>. L'immunisation sous-cutanée avec des vecteurs lentiviraux (qui cible les CD *in vivo*) codant pour un Ag et 4-1BBL induit une réponse immune des LT CD8<sup>+</sup> moins fonctionnelle (production de granzyme B diminuée) que l'immunisation avec un mélange de vecteurs lentiviraux exprimant un Ag ou 4-1BBL<sup>236</sup>. Donc, l'impact de 4-1BB sur la réponse des LT CD8<sup>+</sup> n'est pas seulement due à son expression sur les LT CD8<sup>+</sup> mais aussi à son expression sur les CD.

#### 1.3.1.2.2.3 OX40

L'expression d'OX40 (TNFRSF4, CD134) est induite chez les LT activés<sup>219,220</sup>, principalement chez les LT CD4<sup>+</sup> où son expression est maximale après 48h de stimulation antigénique<sup>237</sup>. Son ligand OX40L (TNFSF4, gp34) est exprimé chez les CD, les LB et les macrophages<sup>197,221,233</sup>.

Chez les LT CD8<sup>+</sup>, l'induction d'OX40 requiert une forte stimulation antigénique ou une forte virulence de l'infection. En effet, grâce à des souris OX40<sup>-/-</sup>, il a été montré que l'infection avec des souches virulentes de VV, se répliquant rapidement, induit une réponse effectrice dépendante d'OX40. À l'opposé, des infections avec des souches de VV se répliquant plus lentement, donc moins virulentes, mènent à une réponse indépendante d'OX40. Dans cette étude, le nombre de LTe et de LTm CD8<sup>+</sup> générés est toutefois proportionnel à la virulence du virus suggérant un rôle d'OX40 dans l'amplitude de la réponse<sup>205</sup>. En effet, l'ajout d'un Ac agoniste contre OX40 augmente la réponse contre VV-Lister (souche atténuée)<sup>205</sup> et contre VV-Wester Reserve (souche virulente)<sup>222</sup>. En accord avec ces données, dans un modèle d'immunisation avec CFA-OVA, moins d'effecteurs ont été dénombrés lorsqu'un Ac bloquant contre OX40L a été injecté. OX40 favorise aussi la survie des cellules favorisant leur accumulation<sup>225</sup>. Dans un modèle d'infection avec VV de souris OX40<sup>-/-</sup>, moins de LTe sont générés, autant contre les épitopes dominants que subdominants,

et ceux-ci produisent moins d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  diminuant leur fonctionnalité. Conséquemment le nombre de LTm CD8<sup>+</sup> formés est aussi diminué, affectant la protection à long terme contre une seconde exposition à l'Ag<sup>220</sup>. Finalement, chez des PBMC humain en culture, un Ac anti-OX40 a permis d'augmenter la prolifération (incorporation de thymidine) de LT CD8<sup>+</sup> *in vitro*<sup>223</sup>. Collectivement, ces études montrent que le récepteur OX40 permet l'accumulation des LTe en permettant leur prolifération (humain) et leur survie (souris) augmentant ainsi la quantité de LTm générée.

Certaines expériences ne démontrent aucun effet sur l'amplitude de la réponse effectrice mais seulement sur la réponse mémoire. D'abord, lors d'expérience où des LT OT-1 OX40<sup>-/-</sup> sont transférés dans des souris subséquemment infectée avec *Lm*-OVA, autant de LTe ont été générés. Toutefois, une plus faible proportion de MPEC (KLRG1<sup>faible</sup>, CD127<sup>élevé</sup>) est présente menant à une génération plus faible de LTm. Le nombre de LTm OX40<sup>-/-</sup> décline au cours du temps suggérant un rôle d'OX40 dans leur maintien. Puisque le nombre d'effecteurs générés ici est similaire, ces expériences démontrent qu'OX40 a un effet sur la génération de mémoire lors d'infection avec *Lm*<sup>224</sup>. Cet effet est confirmé dans un modèle d'infection influenza peu virulent, où OX40 augmente l'efficacité de la réponse secondaire<sup>199</sup>.

#### 1.3.1.2.2.4 CD30

Le récepteur CD30 (TNFRSF8) est exprimé sur une variété de cellules dont les LT activés. Son ligand est le CD30L (TNFSF8, CD153) exprimé sur les CD, les LB et les macrophages<sup>197</sup>.

Le récepteur CD30 joue un rôle dans la génération des LTm CD8<sup>+</sup>. Dans un modèle d'infection avec *Lm* de souris CD153<sup>-/-</sup>, un même nombre d'effecteurs LLO<sub>91-99</sub> spécifiques sont générés au pic de la réponse comparativement aux souris WT. Cependant, moins de LTm sont présentes 80 jours post-infections diminuant la protection contre une seconde infection<sup>226</sup>. Dans un modèle d'immunisation avec alum/OVA et transfert d'OT-1 exprimant ou non CD30, il n'y a pas de différence 4 jours post immunisation. L'absence de CD30 diminue cependant le

pourcentage d'OT-1 présentes au jour 14 post immunisation, appuyant l'effet de CD30 sur la génération de mémoire. Dans ce modèle alum/OVA et lors d'infection MCMV, l'expression de CD30 présente un effet synergique avec l'expression d'OX40 afin de réguler l'expansion en augmentant la prolifération des LTe<sup>198</sup>. L'effet de CD30 pourrait donc varier selon l'expression simultanée des autres récepteurs TNF.

#### 1.3.1.2.2.5 GITR

Le récepteur GITR (*Glucocorticoid-induced TNFR family related gene*, TNFRSF 18) est exprimé faiblement chez les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïfs. L'activation du LT de même que la signalisation via le récepteur CD28 augmente son expression<sup>197,227</sup>. Son ligand GITRL (TNFSF18) a été identifié sur les LB, les macrophages ainsi que les CD et son expression est augmentée de façon transitoire dans les heures suivant la liaison de leurs TLR<sup>228,229</sup>.

Le récepteur GITR, comme les autres membres de sa famille, est impliqué dans la costimulation des LT et leur survie. En effet, lors d'activation *in vitro* avec un anti-CD3, il a été montré que la liaison de GITR augmente la prolifération des LT CD8<sup>+230</sup>. Cet effet coactivateur a aussi été observé *in vivo*. Dans un modèle d'infection avec influenza (A/X31), GITR est requis pour l'expansion maximale des LTe primaire et secondaire, sans affecter la production de cytokine. GITR affecte la survie des LTe en augmentant l'expression de Bcl-x<sub>L</sub>. Tout comme pour 4-1BB, l'expression de GITR est requise pour la survie des souris suite à une infection sévère à influenza (A/PR8) mais pas contre cette infection légère à influenza (A/X31)<sup>231</sup>. Ce fait illustre encore une fois que l'effet des TNF récepteurs varie d'un modèle à l'autre, une infection forte les induisant fortement expliquant possiblement leur nécessité plus marquée dans ces contextes. Finalement, le récepteur GITR inhibe la réceptivité des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> envers l'effet régulateur des Treg. Cet effet est intrinsèque aux LT puisque les Treg GITR<sup>+/+</sup> et GITR<sup>-/-</sup> ont la même capacité de suppression<sup>228</sup>. De plus, La présence de GITR sur les LTm CD8<sup>+</sup> est requise pour leur survie grâce à l'induction ou au maintien de l'expression de 4-1BB (voir section 4-1BB)<sup>232</sup>.

### 1.3.1.3 Signal 3: les cytokines

Le troisième signal important lors de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> est le signal des cytokines inflammatoires, principalement via l'IL-12 et les interférons (IFN) de type I, qui induit la prolifération optimale des cellules, leur survie ainsi que leur différenciation en LTe puis en LTm fonctionnels<sup>238-241</sup>. Récemment, il a été démontré que le milieu inflammatoire induit par l'IL-12 et les IFN de type I permet d'augmenter la sensibilité à l'Ag, en augmentant la capacité de transmission du signal RCT des LTn et des LTm CD8<sup>+</sup><sup>242,243</sup>. Une autre cytokine jouant un rôle majeur lors de la réponse des LT CD8<sup>+</sup> est l'IL-2 qui est nécessaire pour l'expansion clonale, la différenciation en LTe et la formation de LTm fonctionnels<sup>170,244-247</sup>. L'IL-12, les interférons de type I de même que l'IL-2 sont produits par des cellules interagissant directement avec le LT CD8<sup>+</sup> ou étant présentes dans son environnement lors de son activation. Le LT CD8<sup>+</sup> peut donc percevoir ces signaux inflammatoires au moment de la reconnaissance antigénique ce qui augmente son niveau d'activation. Les effets de ces trois cytokines sur la réponse des LT CD8<sup>+</sup> sont abordés en détails dans cette section, ce qui n'exclut pas un rôle pour d'autres cytokines.

#### 1.3.1.3.1 IL-12

L'IL-12 est une cytokine proinflammatoire composée de la chaîne  $\alpha$  ou p35 (35kDa) et de la chaîne  $\beta$  ou p40 (40kDa). Le récepteur à l'IL-12 est aussi composé de deux chaînes IL-12R $\alpha$  et IL-12R $\beta$ . La signalisation via l'IL-12R mène à la phosphorylation du facteur de transcription STAT4<sup>248</sup>. Les LT activés expriment l'IL-12R rapidement et peuvent donc percevoir un signal via l'IL-12<sup>249</sup>. L'IL-12 est produit par les CD, les macrophages et les LB, suite à la reconnaissance de pathogènes<sup>248</sup>.

Plusieurs études démontrent qu'un signal via l'IL-12 permet une expansion clonale maximale et promeut la différenciation en SLEC. Tout d'abord, lors d'infection avec *Lm-OVA*, les souris p35<sup>-/-</sup> ou des chimères IL-12R $\beta$ 2<sup>-/-</sup> génèrent moins de LTe, qui contractent moins, pour former plus de LTm CD8<sup>+</sup> OVA-spécifiques. Les LTm générés en absence de

signal via l'IL-12 expriment CD62L, CD127 et sécrètent l'IL-2 ayant donc un phénotype T<sub>CM</sub><sup>250,251</sup>. Ces expériences démontrent que l'IL-12 joue un rôle dans l'expansion clonale lors de la réponse primaire, mais est délétère à la formation de LTm<sup>250,251</sup>. La sous-unité p35 de l'IL-12 étant commune avec l'IL-35 et la chaîne IL-12Rβ2 étant commune avec l'IL-23R<sup>248</sup>, un rôle de l'IL-35 ou l'IL-23 ne peut pas être exclu ici. Une augmentation de la production d'IL-12 favorise l'expansion clonale maximale dans un modèle d'immunisation avec des DC-GP<sub>33</sub> (un peptide de la glycoprotéine de LCMV) + CpG DNA qui induit la production d'IL-12 et d'IFN de type I<sup>252,253</sup>. En effet, les OT-1 IL-12Rβ1<sup>-/-</sup> produisent moins de LTe, et conséquemment de LTm, que les OT-1 de type sauvage<sup>253</sup>. Les LTm formés en absence de signal via l'IL-12 ont aussi un phénotype T<sub>CM</sub> (CD62L<sup>élevé</sup>CD127<sup>élevée</sup>), confirmant les données publiées précédemment<sup>250,253</sup>. En fait, un rôle direct de l'IL-12 dans la différenciation des SLEC a été démontré. Premièrement, lors de stimulation *in vitro* de LT CD8<sup>+</sup> P14 avec des cellules chargées avec le peptide GP<sub>33</sub>, l'IL-12 induit l'expression du facteur de transcription T-bet de façon dose dépendante. À son tour, T-bet régule la différenciation en SLEC de façon dose dépendante<sup>251,254</sup>. La régulation de T-bet par l'IL-12 a aussi été observée *in vivo* dans un modèle d'infection *Lm* de souris p35<sup>-/-</sup> ou WT<sup>251</sup>. Deuxièmement, l'immunisation avec des CD, qui est peu inflammatoire, induit la génération de LTe avec un phénotype MPEC et accélère la génération de LTm<sup>106,255,256</sup>. L'ajout d'IL-12 lors d'immunisation avec des CD permet d'augmenter la formation de SLEC au pic de la réponse<sup>257</sup>. Ceci démontre le rôle important de l'IL-12 dans la différenciation de cette population d'effecteurs.

À l'opposé des études précédentes, certains groupes ont démontré un effet positif de l'IL-12 sur la formation de LTm CD8<sup>+</sup>. Des études *in vitro* où des LT OT-1 exprimant ou non STAT4 sont cultivés sur des CPA artificielles exprimant H2-K<sup>b</sup>-OVA et CD80 (BOK) avec ou sans IL-12 ont démontré que l'IL-12 via STAT4 est requise pour l'acquisition des fonctions effectrices (sécrétion d'IFN-γ et cytolyse) et la survie des LT OT-1 grâce à l'expression de Bcl-3 et des molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL<sup>249</sup>. Ces LT OT-1 activés en présence d'IL-12 sont aussi plus sensibles à l'IL-7 et à l'IL-15, importantes pour la prolifération homéostatique et la survie des LTm<sup>249</sup>. Finalement, des LT OT-1 activés *in vitro* 72 h avec des BOK avec ou sans IL-12 ont été transférés *in vivo*. Les LT OT-1 activés en présence d'IL-12

ont proliféré et ont persisté permettant une meilleure réponse lors d'une infection avec *Lm*-OVA (meilleure expansion et meilleur contrôle de la bactérie) 30 jours post-transfert<sup>258</sup>. Les signaux fournis par l'IL-12 durant les 72 premières heures d'activation influencent donc la génération de LTe, mais aussi de LTm CD8<sup>+</sup>. Un autre groupe a démontré que suite à l'infection avec *Lm*-OVA ou VV-OVA de souris transférée avec des LT OT-1 IL-12Rβ1<sup>-/-</sup>, aucun effet sur le nombre de LTe générés n'est observé, mais très peu de LTm sont formés<sup>258</sup>. Les infections *Lm* et VV induisent la production d'IL-12, d'IL-6 et les interférons de type I<sup>259,260</sup>. En absence d'IL-12, ces autres cytokines inflammatoires pourraient compenser le rôle de l'IL-12 sur la réponse effectrice. En effet, lors d'infection *Lm*, la délétion du récepteur des IFN de type I et de l'IL-12Rβ1 diminue la génération de LTe et de LTm plus drastiquement que ces délétions individuelles<sup>258,259</sup>. Cette observation suggère que l'IL-12 ou les IFN de type I ont des effets similaires, l'absence de l'un pouvant être compensée par l'autre. Cependant, en fonction des infections étudiées (VV, VSV, *Lm*, LCMV) une différence dans la dépendance envers un signal via l'IL-12 ou les interférons de type I pour l'expansion clonale maximale est observée<sup>259</sup>. Ceci pourrait expliquer les différents résultats obtenus quant au rôle de l'IL-12 dans la génération de LTm aussi. L'ensemble de ces observations suggèrent qu'un signal via l'IL-12 est requis pour la différenciation en LTm, mais qu'un signal fort, excédant un certain seuil, favorise la génération de SLEC

#### 1.3.1.3.2 Interférons de type I

La famille des interférons de type I comprend l'IFN-β et 13 IFN-α, reconnus pour leur activité antivirale. Tous ces interférons lient le même récepteur nommé IFNAR (IFNαβ receptor) composé des deux sous-unités IFNAR-1 et 2. L'activation de ce récepteur par un IFN de type I induit la signalisation permettant de recruter les kinases JAK-1 et Tyk-2 qui phosphorylent STAT1 et STAT2, engendrant leur dimérisation et leur translocation au noyau en compagnie d'IRF-9. Ce complexe permet d'activer les gènes grâce à la liaison à des ISRE situés dans les promoteurs des gènes cibles<sup>261</sup>. La majorité des bactéries et des virus, en liant les TLR, induisent la production d'IFN de type I par les cellules du système immunitaire<sup>262</sup>.

Des études utilisant des souris IFNAR<sup>-/-</sup> ou des LT CD8<sup>+</sup> IFNAR<sup>-/-</sup> et différents modèles d'activation (infections *Lm* et LCMV, activation *in vitro* avec des billes) ont démontré que les IFN de type I sont importants pour l'expansion clonale maximale des LTe, affectant ainsi la génération de LTm<sup>241,258,263</sup>. Les IFN de type I favorisent la survie des cellules<sup>241,263</sup> et influencent aussi leurs propriétés effectrices comme la cytotoxicité et la sécrétion de cytokine<sup>264</sup>. Chez les LT CD8<sup>+</sup>, la signalisation via l'IFNAR peut aussi induire la phosphorylation de STAT4 ce qui est important pour l'effet des IFN de type I sur leur activation (prolifération et cytolyse)<sup>241,265</sup> et contribue potentiellement à la régulation de gènes communs avec l'IL-12<sup>264</sup>. Suite à une infection avec VSV, en absence des IFN de type I, moins de SLEC sont générés, mais pas suite à une infection *Lm*<sup>259</sup>. Donc, comme l'IL-12, les IFN de type I peuvent contribuer à l'expansion des LTe et à la différenciation en SLEC. Un article récent démontre que l'IL-12 ainsi que les IFN de type I influencent l'expansion LT CD8<sup>+</sup> en permettant une expression soutenue du CD25, augmentant la réceptivité à l'IL-2 et ainsi la prolifération<sup>266</sup>.

#### 1.3.1.3.3 IL-2

L'IL-2 est une cytokine de la famille des cytokines  $\gamma$ c produite principalement par les LT CD4<sup>+</sup>, mais aussi par les LT CD8<sup>+</sup>, les cellules NK, les NKT, LB et les CD<sup>267-271</sup>. Le récepteur de haute affinité de l'IL-2 est composé de 3 chaînes :  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  (CD122) et commune  $\gamma$  (CD132). L'IL-2 peut aussi signaler via un récepteur dimérique de plus faible affinité composé de CD122 et CD132. La signalisation induit l'activation de différentes voies, soit JAK-STAT (principalement STAT5), la voie PI3K-AKT et les MAPK<sup>272,273</sup>.

L'IL-2 a été identifiée pour la première fois en 1976 en tant que facteur de croissance dans des cultures de LT *in vitro*<sup>274</sup>. Chez le LT CD8<sup>+</sup>, le signal via l'IL-2 est nécessaire pour augmenter la prolifération, donc l'amplitude de la réponse et la différenciation en SLEC. Par exemple, suite à l'immunisation avec *Lm* ou VV, l'expression de CD25 sur les LT CD8<sup>+</sup> est requise pour une expansion maximale et la génération de SLEC lors des réponses primaire et secondaire<sup>244</sup>. L'IL-2 joue aussi un rôle sur la fonctionnalité des LTm CD8<sup>+</sup>. Lors d'une

infection avec LCMV, l'absence de CD25 chez les LT CD8<sup>+</sup> affecte peu le nombre de LTe et de LTm formés alors que la réponse secondaire est grandement diminuée. Les LTm CD8<sup>+</sup> CD25 déficients prolifèrent, mais ne s'accumulent pas lors d'une seconde infection avec le même agent pathogène<sup>170,245</sup>. De plus, un signal faible de l'IL-2 au moment de l'activation diminue l'expansion clonale et altère la réponse secondaire, alors qu'un signal fort favorise la prolifération et la différenciation en SLEC. En effet, 3,5 jours suivant une infection LCMV, l'expression élevée de CD25 (signal fort) permet d'identifier les cellules qui proliféreront plus et deviendront des SLEC, alors qu'une expression plus faible est associée à la réexpression de CD127 et CD62L, à la survie des LT CD8<sup>+</sup> et leur capacité de s'accumuler lors d'un challenge<sup>247</sup>. Lors d'infection de souris avec LCMV, les LT CD8<sup>+</sup> n'exprimant pas CD25 présentent une diminution des SLEC et des fonctions effectrices corroborant ces données<sup>246</sup>. L'IL-2 contribue à la différenciation en SLEC grâce à l'induction du facteur de transcription Blimp-1<sup>275,276</sup>. À son tour, Blimp-1 inhibe l'expression de CD25 7 à 9 jours post infection avec LCMV, un moment où les SLEC ne requièrent plus le signal via l'IL-2 pour se différencier et où son absence contribue à induire leur apoptose<sup>277</sup>. Globalement, ces études démontrent que l'IL-2 est importante pour la prolifération et la différenciation en SLEC lors de la réponse primaire ou secondaire des LT CD8<sup>+</sup>.

#### **1.3.1.4 L'interaction avec la cellule présentatrice d'antigène**

Pour chaque épitope, il existe environ 80 à 1200 LTn CD8<sup>+</sup> qui leur sont spécifiques<sup>278,279</sup>. Pour augmenter la probabilité de rencontrer leur Ag spécifique sur une CPA, les LTn recirculent constamment entre les ganglions lymphatiques. L'activation du LT est divisée en trois phases d'après son niveau de motilité. Premièrement, 5 à 10 h post immunisation, le LT CD8<sup>+</sup> s'immobilise à plusieurs reprises formant des contacts transitoires (1-30 minutes) avec des CD présentant son Ag spécifique (phase I). Deuxièmement, 10 à 20 h post immunisation, le LT CD8<sup>+</sup> établit un contact prolongé pouvant atteindre plusieurs heures (30 minutes à 3 heures) avec une CD (Phase II). Troisièmement, 20 à 40 heures post immunisation, le LT CD8<sup>+</sup> regagne sa motilité interagissant de façon transitoire avec les CD (Phase III)<sup>280,281</sup>. Ces deux études ont été réalisées avec des immunisations de CD chargées avec un Ag<sup>280,281</sup>, mais il est probable que ces mêmes séquences se produisent aussi lors

d'interactions productives avec d'autres CPA. Dès les premières heures suivant l'activation (2-8 heures), les LT CD8<sup>+</sup> acquièrent un phénotype activé (augmentation de l'expression de CD25, CD69 et CD44). Quant à l'acquisition des fonctions effectrices (sécrétion IL-2, IFN- $\gamma$ ), elle corrèle avec les interactions stables avec des CD (phase II). Finalement, la prolifération débute alors que les LT CD8<sup>+</sup> retrouvent leur motilité (Phase III)<sup>281</sup>. Une fois activés, les LTe CD8<sup>+</sup> sortent des ganglions lymphatiques ou de la rate afin de migrer au site d'infection. Grâce à des CPA artificielles exprimant l'Ag et la molécule de costimulation CD80, il a été montré qu'une stimulation de 2 h est suffisante pour induire l'activation<sup>282</sup> alors qu'une stimulation de 20 h est nécessaire pour induire l'accumulation et la différenciation en LTe fonctionnels<sup>283</sup>. D'autres études démontrent qu'une activation de 24h à 48h est suffisante pour induire la différenciation en LTm fonctionnels. En effet, des LT CD8<sup>+</sup> reconnaissant GP-33 activés *in vitro* durant 24 h et transférés *in vivo* ont formé des LTm<sup>284</sup>. De plus, lors d'infection *Lm*, la diminution de la durée de l'infection par l'administration d'antibiotique après 24 h permet aussi la génération de LTm<sup>285</sup>. Une interaction de 48 h est cependant nécessaire pour la formation optimale des LTm<sup>286</sup>.

### 1.3.1.5 Les propriétés et les phénotypes cellulaires des LT effecteurs

L'activation des LTn CD8<sup>+</sup> induit un programme génétique menant à la différenciation en effecteur. Des études d'analyse de signatures géniques ont démontré qu'environ 4000 gènes sont différemment exprimés entre les LTe et les LTn<sup>287,288</sup>. Premièrement, tel que mentionné précédemment, il y a acquisition d'un phénotype activé. Suite à une infection LCMV, au pic de la réponse, l'expression de plusieurs molécules est augmentée chez les LTe notamment l'expression de CD44, CD43, CD27 et CD28. D'autres molécules comme CD62L ou Bcl-2 sont diminuées chez les LTe<sup>287</sup>. Cette liste de molécules n'est pas exhaustive, la quantité de molécules variant entre les LTn et les LTe est bien plus importante<sup>287,288</sup>. Deuxièmement, l'acquisition de fonctions effectrices comme la sécrétion de cytokine et l'activité de cytolyse débute<sup>289</sup>. La production de ces cytokines peut varier selon les conditions d'activation et de l'infection qui est en cours. Les principales cytokines produites par les LT CD8<sup>+</sup> sont l'IL-2, le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et l'IL-10<sup>290</sup>. L'activité de cytolyse est possible grâce à la sécrétion de perforine et de granzymes ainsi qu'à l'expression de FASL<sup>291</sup>. Troisièmement, l'expression

des gènes associés à la prolifération sera augmentée afin de provoquer l'expansion massive des LT CD8<sup>+</sup>. Chaque LT pouvant subir jusqu'à 19 rondes de division cellulaire, la population présente au pic de la réponse peut représenter 20 000 à 400 000 fois le nombre de précurseurs naïfs<sup>289</sup>. Quatrièmement, afin d'assurer cette prolifération massive, il y a un changement de l'état métabolique des cellules<sup>292,293</sup>. Cinquièmement, l'expression des récepteurs de chimiokines et des molécules d'adhésion sera modifiée afin de favoriser la sortie des organes lymphoïdes vers le site d'infection. L'expression de CD62L et de CCR7, des molécules importantes pour l'entrée des LT dans les ganglions lymphatiques, est diminuée<sup>294</sup>. De façon concomitante, l'expression de récepteurs de chimiokines comme CXCR3 et CCR5 est augmentée afin de favoriser la migration aux sites d'infection<sup>288,295,296</sup>.

Lors de la réponse effectrice, selon l'expression de KLRG1 et CD127, quatre populations de LTe sont présentes. Les LTn expriment fortement le CD127, mais pas la molécule KLRG1<sup>287</sup>. Suite à une infection, il y a d'abord diminution de l'expression de CD127 pour former les EEC (*Early Effector Cells*) exprimant KLRG1<sup>faible</sup>CD127<sup>faible</sup> qui représentent une population moins différenciée pouvant générer des SLEC et des MPEC<sup>287,297</sup>. Par la suite, l'expression de KLRG1 augmente chez certains LTe formant les SLEC exprimant KLRG1<sup>élevé</sup>CD127<sup>faible</sup> destinés à mourir par apoptose. Une autre population augmente l'expression de CD127 pour générer les MPEC qui expriment KLRG1<sup>faible</sup>CD127<sup>élevé</sup> et c'est parmi cette population que se retrouvent les LT CD8<sup>+</sup> qui formeront les LTm<sup>297</sup>. La quatrième population exprimant KLRG1<sup>élevé</sup>CD127<sup>élevé</sup> est nommée DPEC (*Double Positive Effector Cells*), mais elle a très peu été étudiée. Lors d'une infection, l'expression élevée de KLRG1 permet d'identifier les LTe qui mourront par apoptose. En effet, 4 ou 5 jours suivant une infection LCMV (avant le pic de la réponse), alors que l'expression de CD127 est uniformément diminuée, le transfert de LTe exprimant un niveau élevé de KLRG1 dans des souris receveuses permet la différenciation en SLEC suivie par une apoptose massive tandis que le transfert des LTe exprimant un niveau intermédiaire de KLRG1 permet la différenciation des MPEC qui survivent à long terme<sup>254,287</sup>. Au pic de la réponse, l'expression élevée de CD127 identifie les MPEC qui se différencieront en LTm. Huit jours suite à une infection avec LCMV, les LTe triés selon leur expression forte de CD127 et transférés dans

des souris receveuses formeront des LTm capables de répondre rapidement lors d'une infection avec *Lm*-GP<sub>33</sub> (un peptide de la glycoprotéine de LCMV)<sup>298</sup>. À l'opposé, le transfert de LTe exprimant faiblement CD127 ne permet pas la génération de LTm<sup>298</sup>. Suite à une infection avec VSV-OVA, l'expression de CD127 par les LT OT-1 est aussi nécessaire pour la formation de LTm<sup>297,299</sup>. Toutefois, outre l'expression de CD127 et KLRG1 et leur capacité à survivre, les SLEC et les MPEC ont un phénotype et des fonctions effectrices similaires (sécrétion cytokine et cytotoxicité)<sup>254</sup> ce qui est confirmé par une hybridation sur puce d'ADN démontrant que seulement 79 gènes varient entre ces deux populations<sup>287</sup>. Cependant, les LTe KLRG1<sup>intermédiaire</sup> (MPEC) sécrètent plus d'IL-2 que les KLRG1<sup>élevé</sup> (SLEC)<sup>287</sup>.

### 1.3.1.6 L'épuisement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Lorsque l'Ag persiste dans l'organisme comme dans des cas d'infection chronique (HIV, hépatite C) ou de cancer, les LT CD8<sup>+</sup> deviennent épuisés, contribuant à l'incapacité de l'organisme à éliminer l'envahisseur. Cet état d'épuisement est caractérisé par l'expression de molécules coinhibitrices, une fonctionnalité défaillante et une incapacité à proliférer. Les LT CD8<sup>+</sup> épuisés expriment plusieurs récepteurs inhibiteurs dont PD-1, Lag-3, 2B4, CTLA-4 et CD160, tous des membres de la superfamille CD28<sup>155,300</sup>. PD-1 joue un rôle primordial dans l'établissement de l'épuisement puisque le traitement de souris infectées chroniquement avec LCMV clone 13, traitées avec un Ac bloquant contre PD-1, recouvrent leur capacité à proliférer et leur fonctionnalité, diminuant la charge virale<sup>301,302</sup>. Toutefois, PD-1 n'agit pas seul puisque le blocage simultané de plusieurs récepteurs inhibiteurs augmente le recouvrement des fonctions effectrices<sup>300</sup>. Dans des modèles d'infection chronique avec LCMV clone 13, il a été démontré que les LT CD8<sup>+</sup> avaient une sécrétion moindre d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-2, une cytotoxicité défaillante, de même qu'une incapacité à proliférer. La perte de fonction effectrice s'effectue de façon hiérarchique, débutant par la perte de sécrétion d'IL-2, de TNF- $\alpha$  et finalement de l'IFN- $\gamma$ . Le niveau d'épuisement est corrélé avec la quantité d'Ag présent et peut ultimement mener à la délétion des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'Ag<sup>303-305</sup>. Une fois épuisés, les LT CD8<sup>+</sup> requièrent la présence de l'Ag pour survivre, mais

pas de l'IL-7 ni de l'IL-15, des cytokines requises pour la prolifération homéostatique des LTm<sup>306</sup>.

### 1.3.2 La phase de contraction

Lorsque l'infection ou la source d'Ag est éliminée, la majorité des LTe (90 %) meurent par apoptose durant la phase de contraction. Les différents mécanismes d'apoptose ne sont probablement pas mutuellement exclusifs, contribuant tous à la contraction, mais il n'est pas encore évident si ces mécanismes opèrent de façon ordonnée ou aléatoire.

L'apoptose peut être induite activement et de façon extrinsèque par la liaison de récepteurs de surface activés par leur ligands comme FasL (CD95L), TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ou TNF. Leurs récepteurs sont respectivement nommés Fas (CD95), TRAILR1/2 et TNFR1. Ces récepteurs contiennent des domaines de mort dans leur portion intracellulaire (*death domain*, DD). Lors de la liaison de CD95L à CD95, il y a trimérisation des récepteurs. Les domaines DD permettent de recruter la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated DD), qui recrute les pro-caspase 8 et 10. La proximité des procaspases permet leur activation autoprotéolytique pour ensuite activer les caspases effectrices 3,6 et 7 ce qui mène à l'apoptose. Les caspases 8 et 10 peuvent aussi induire l'apoptose en clivant BID (*BH3-interacting-domain death agonist*) pour former tBID (*truncated BID*), qui permet le relargage du cytochrome C de la mitochondrie et l'induction de l'apoptosome, qui clive la pro-caspase 9, qui clive à son tour les caspases effectrices 3, 6 et 7<sup>307,308</sup>. Les autres récepteurs de mort induisent l'apoptose de façon similaire en induisant les caspases effectrices et en déstabilisant la mitochondrie<sup>309,310</sup>. Les LTe ne doivent pas être sensibles à l'apoptose à tout moment, une régulation de ces récepteurs est donc présente. Par exemple, l'induction de l'apoptose par CD95 est régulée à plusieurs niveaux. D'abord, la sensibilité à l'apoptose par FAS est régulée par l'expression de cFLIP, une molécule qui a la capacité d'inhiber l'activation des caspases 8 et 10. Ainsi, les LTe n'exprimant pas cFLIP sont plus sensibles à l'apoptose par CD95<sup>311,312</sup>. Ensuite, l'expression de molécules de pro-survie comme Bcl-2 ou

Bcl-X<sub>L</sub> peut stabiliser la mitochondrie<sup>313</sup>. Finalement, l'inhibition de CD95L suite au signal de costimulation diminue l'interaction possible avec son récepteur<sup>314</sup>.

Le manque de signaux de survie (nutriments, cytokines) peut induire l'apoptose de façon passive ou intrinsèque aux cellules. Cette mort est aussi nommée ACAD (*Activation Cell-Autonomous Death*). En effet, lors d'infection, il a été démontré que plusieurs cytokines régulent l'expansion clonale ainsi que la contraction des LT CD8<sup>+</sup>. La capacité des LTe à répondre à différentes cytokines peut aussi influencer leur capacité de survie. Des expériences où de l'IL-2 ou de l'IL-15 ont été ajoutées lors de la contraction ont augmenté la génération de LTm présents, en appui avec le mécanisme d'apoptose induit par la compétition pour les cytokines<sup>315,316</sup>. Cette mort par ACAD dépend essentiellement de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, ce qui induit le relargage de cytochrome C qui lie APAF (*apoptotic-protease-activating factor 1*) pour former l'apoptosome qui recrute la pro-caspase 9 menant à l'apoptose. Le ratio intracellulaire des molécules de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) pouvant stabiliser ou déstabiliser la mitochondrie est important pour réguler ce mécanisme d'apoptose. Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> ont un rôle pro-survie, alors que BIM et PUMA sont pro-apoptotiques. La molécule BIM (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*) joue un rôle important lors de la contraction. Chez des souris BIM<sup>-/-</sup> infectées avec HSV ou LCMV, les LT CD8<sup>+</sup> Ag spécifiques survivent en plus grand nombre suite à l'élimination de l'infection générant plus de LTm<sup>317,318</sup>. Des expériences avec des OT-1 BIM<sup>-/-</sup> en compétition avec des OT-1 sauvages démontrent que l'effet de BIM est intrinsèque<sup>319</sup>. D'autres études démontrent que la contraction serait programmée dès l'activation du LT CD8<sup>+</sup>. En effet, la diminution de la durée d'une infection *Lm* par des antibiotiques ou la diminution de la dose bactérienne administrée n'affecte pas le moment où la contraction débute ni sa cinétique<sup>320</sup>. La cinétique de contraction serait prédéterminée, mais l'ajout d'un excédent de cytokines augmenterait la prolifération et la survie des LTe, diminuant ainsi leur niveau de contraction.

La restimulation des cellules effectrices par l'Ag en absence des molécules de costimulation peut aussi induire l'AICD (*Activation Induced-Cell Death*). Ce terme est né en

1989 lorsque le groupe de Green a observé que des hybridomes T et des thymocytes mourraient par apoptose suite à une stimulation de leur TCR<sup>321</sup>. Cette induction de l'apoptose dépend de la liaison des récepteurs par FasL, TRAIL et TNF, mais aussi de mécanismes indépendants de ces récepteurs de mort<sup>308</sup>. Si des LTe sont stimulés via leur TCR 4 à 7 jours post-infection, il y a induction de CD95L, qui peut induire l'apoptose chez la cellule qui l'exprime ou chez une cellule voisine. L'importance de CD95/CD95L dans le contrôle de la prolifération est démontrée par le fait que des souris ou des patients où cette voie est non fonctionnelle présentent des symptômes de lymphoprolifération<sup>322-324</sup>.

### 1.3.3 La phase mémoire

Suite à la phase de contraction, les LTm CD8<sup>+</sup> qui survivront à long terme sont formés. Ces LTm peuvent survivre durant plusieurs mois chez la souris et plusieurs années chez l'humain et assureront la protection à long terme de l'organisme contre une réexposition au pathogène. Les LTm se distinguent des LTn par plusieurs propriétés, notamment leur phénotype (1), l'acquisition rapide de propriété effectrice lors d'une seconde rencontre avec l'Ag (2), une prolifération homéostatique importante (3) ainsi qu'une indépendance du signal RCT pour leur survie (4). Plusieurs populations de LTm existent : les T<sub>CM</sub>, les T<sub>EM</sub> et les T<sub>RM</sub>.

#### 1.3.3.1 Les populations de LTm

Les différentes populations de LTm se distinguent d'après l'expression de molécules qui régulent leur localisation anatomique. À la fin des années 1990, les LTm retrouvés dans la circulation sanguine humaine ont été subdivisés en deux populations : les LTm centraux (T<sub>CM</sub>) et les LTm effecteurs (T<sub>EM</sub>)<sup>325</sup>. Ces populations ont aussi été identifiées et exhaustivement caractérisées chez la souris suite à des infections avec *Lm* et LCMV<sup>326</sup>. Les T<sub>CM</sub> sont caractérisés par une expression élevée de CCR7, CD62L et CD27. Ils résident principalement dans les organes lymphoïdes secondaires et ils n'ont pas une fonction cytolytique immédiate. Les T<sub>EM</sub> sont caractérisés par une faible expression de CCR7 et CD62L ainsi qu'une expression faible ou intermédiaire de CD27. Ils se retrouvent dans les tissus non lymphoïdes

(poumons, foie, etc.) et ils sont capables de cytolysse immédiate lors de la rencontre de leur Ag spécifique servant de première ligne de défense<sup>325-327</sup>. Les T<sub>CM</sub> produisent d'importante quantité d'IL-2 et prolifèrent plus rapidement que les T<sub>EM</sub> leur permettant de générer plus d'effecteurs secondaires capables d'éliminer une infection avec LCMV ou VV plus efficacement<sup>326</sup>. Des marquages CFSE et des expériences d'incorporation de BrdU ont montré que les T<sub>CM</sub> ont aussi une prolifération homéostatique plus importante que les T<sub>EM</sub><sup>326</sup>. Les T<sub>CM</sub> et T<sub>EM</sub> maintiennent un phénotype caractérisé par l'expression élevée de CD44, Ly6C, CD122, CD132 et CD11a<sup>288,326</sup>.

Plus récemment, une population de LTm résidant dans les tissus suite à une infection, a été identifiée et nommée T<sub>RM</sub> (*tissus-resident memory*)<sup>328,329</sup>. Des expériences de parabiose murine montrent que les LTm dans plusieurs tissus (ganglions lymphatiques, rate, foie, moelle osseuse) atteignent un équilibre en 1 ou 2 semaines, démontrant leur migration continue. Toutefois, la migration vers certains tissus (épithélium de la peau, lamina propria (intestin), cerveau) est limitée suite à une infection VSV<sup>330</sup>. Cette différence s'explique par le fait que suite à différentes infections (HSV et VSV cutanée, LCMV i.p.), des T<sub>RM</sub> sont générés et ceux-ci demeurent dans les organes non lymphoïdes, comme la peau ou l'intestin, pour assurer une protection localement. Ces T<sub>RM</sub> expriment CD103 et CD69<sup>296,328,329,331</sup>.

### 1.3.3.2 Les propriétés et les phénotypes cellulaires des LT mémoires CD8<sup>+</sup>

Plusieurs études ont été réalisées sans distinction entre les différentes populations de LTm connues aujourd'hui. Ces études ont tout de même contribué à définir les propriétés des LTm. Chez la souris, il faut un minimum de 40 jours afin de former des LTm fonctionnels et cette différenciation peut prendre plusieurs mois<sup>288,326</sup>. En effet, suite à une infection LCMV, lorsque des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'Ag sont triés à différents temps (jours 8, 15, 22 ou 40 post-infection) et transférés dans des souris receveuses, seuls les LT triés au jour 40 sont capables de prolifération homéostatique et acquièrent la capacité de répondre rapidement lors d'une seconde infection, deux propriétés des LTm<sup>288</sup>. Toutefois, l'inflammation présente au

moment de l'activation influence le rythme de conversion des LTe en LTm. Une inflammation faible accélère la différenciation en LTm<sup>106,332</sup>.

Plusieurs facteurs confèrent aux LTm la capacité de répondre plus rapidement lors d'une seconde infection. Premièrement, suite à une infection, le nombre de précurseurs mémoires est augmenté par rapport au réservoir initial de LTn spécifiques pour le même Ag<sup>326</sup>. Deuxièmement, les LTm répondent à la présence de cytokines (IL-12, IL-15, IL-18, IFN de type I), indépendamment de la reconnaissance de leur Ag<sup>242,333</sup>. Par exemple, lorsque des LTm générés suite à une infection LCMV sont isolés et exposés à l'IL-12 et à l'IL-18 durant 5 h *in vitro* (préactivation) puis transférés dans des souris receveuses infectées avec LCMV, la diminution de la charge virale est plus importante qu'en absence d'exposition à ces cytokines<sup>242</sup>. Cette préactivation des LTm augmente leur prolifération et leur sécrétion de cytokines (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) suite à l'exposition à leur Ag spécifique<sup>242</sup>. Troisièmement, au sein du ganglion lymphatique, les LTm ont une capacité accrue de migrer vers les CPA activées par un pathogène favorisant la rencontre avec leur Ag spécifique. En effet, dans un modèle d'infection à LCMV, les T<sub>CM</sub> expriment des niveaux plus élevés de CXCR3, ce qui augmente la rapidité avec laquelle ils migrent vers les macrophages sécrétant les ligands CXCL9 et CXCL10<sup>334</sup>. Quatrièmement, les fonctions effectrices (sécrétion de cytokines et cytolysse) et la prolifération sont activées plus rapidement chez les LTm que les LTn. Les ARN messagers de l'IFN- $\gamma$  et de la perforine sont présents chez les LTm, ce qui leur permet de produire les protéines très rapidement au moment de la seconde rencontre avec leur Ag spécifique<sup>335,336</sup>. Des modifications de la chromatine facilitent la transcription des gènes conférant les propriétés effectrices rapides des LTm<sup>337-339</sup>. Dans un modèle d'infection avec *Lm*, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LTm a pour effet de recruter et d'activer rapidement des cellules innées (monocytes, neutrophiles, macrophages, CD, cellules NK et NKT) qui contribuent à contrôler le pathogène<sup>340</sup>. Cinquièmement, le RCT serait plus sensible, mais ce phénotype est controversé. Certains groupes démontrent que l'augmentation de la sensibilité n'est pas causée par une augmentation de l'affinité du RCT, mais plutôt par une modification de la transmission du signal RCT. En effet, les LTm expriment plus de LCK, requis pour initier la signalisation du RCT, que les LTn<sup>341</sup>. De plus, suite à la stimulation du RCT *in vivo*

et *in vitro* avec une même quantité de peptides, la phosphorylation d'ERK1/2 est plus importante chez les LTm que chez les LTe<sup>288</sup>. Les LTm contiennent aussi plus de nanoagrégats (*nanoclusters*) de RCT que les LTn ce qui facilite la synapse immunologique favorisant leur activation (expression de CD25 et CD69 et sécrétion d'IFN- $\gamma$ )<sup>342</sup>. Finalement, l'exposition de LTm, générés suite à une infection *Lm*, à l'inflammation induite par une autre infection (LCMV), augmente la sensibilité de leur RCT. En effet, lors de restimulation *in vitro*, une quantité plus faible de peptides est requise pour induire la production maximale d'IFN- $\gamma$  chez les LTm exposés à l'inflammation comparativement aux LTm non exposés. L'exposition des LTm à l'inflammation augmente aussi la phosphorylation de ERK1/2 suite à la stimulation du RCT avec un anti-CD3 *in vitro*<sup>243</sup>. À l'opposé, le groupe de Bevan a observé que, comparativement aux LTn, en absence d'inflammation, les T<sub>CM</sub> nécessitent une quantité plus grande d'Ag *in vivo*, donc un signal plus fort du RCT, pour induire la phosphorylation de ZAP-70 et leur prolifération. Ainsi, le RCT des LTm serait moins sensible que le RCT des LTn<sup>343</sup>. Une expression plus faible du RCT et l'augmentation de l'expression de phosphatase chez les LTm contribuent à diminuer l'intensité du signal RCT<sup>343</sup>. Cependant, cette étude n'a pas étudié l'acquisition des fonctions effectrices chez les LTn et les T<sub>CM</sub>. Chez les LT CD4<sup>+</sup>, une phosphorylation importante des chaînes du CD3, donc un signal fort du RCT, est requise pour induire leur prolifération alors qu'un signal plus faible permet leur sécrétion des cytokines<sup>344</sup>. Il est donc possible que le signal du RCT influence différemment la sécrétion de cytokines et la prolifération chez les LTm. Un autre groupe a observé que les LTn prolifèrent plus que les LTm<sup>345</sup>. C'est possiblement l'augmentation du nombre précurseur et la réceptivité plus grande aux cytokines, et non la sensibilité accrue du RCT en soi, qui permettent une accumulation plus importante des LTm suite à une seconde infection avec le même pathogène. D'autres études seront nécessaires afin de mieux comprendre les facteurs importants pour la prolifération des LTm.

### 1.3.3.3 L'homéostasie et la survie des LT mémoires CD8<sup>+</sup>

Afin de survivre, les LTm CD8<sup>+</sup> requièrent des signaux via l'IL-7 et l'IL-15<sup>299,346,347</sup>. L'IL-7 agit en permettant la survie des LTm. Lors d'infection avec VSV-OVA de souris

transférées avec des OT-1 et des OT-1 IL-7R<sup>-/-</sup>, les LTm IL-7R<sup>-/-</sup> ne survivent pas en raison d'une diminution de l'expression de Bcl-2<sup>299</sup>. La surexpression de Bcl-2 permet de restaurer la survie des LT CD8<sup>+</sup> déficient en IL-7R<sup>348</sup>. Des souris dont l'IL-7R est muté (Y449) empêchant la signalisation du récepteur ont été générées. L'infection avec *Lm*-SIY (le peptide SIYRYYYGL (SIY) est immunodominant lorsque présenté par le K<sup>b</sup> chez les C57BL/6) de ces souris IL-7R Y449 génère une réponse effectrice similaire à celle de souris sauvages mais peu de LTm CD8<sup>+</sup> spécifiques envers SIY sont présents 60 jours post-immunisation et ne sont pas maintenus au cours du temps (jour 100). La prolifération des cellules entre les jours 60 et 100 ne peut pas expliquer la diminution des LTm CD8<sup>+</sup> IL-7R<sup>α</sup> Y449 car elles incorporent efficacement le BrdU<sup>349</sup>. Un défaut dans la transmission du signal via le récepteur à l'IL-7 affecte donc la survie des LTm.

Quant à l'IL-15, il permet la prolifération homéostatique des LTm. L'infection avec LCMV de souris IL-15<sup>-/-</sup> ou IL-15R<sup>α</sup><sup>-/-</sup> permet de générer une réponse effectrice similaire aux souris IL-15<sup>+/+</sup> et de former des LTm fonctionnels<sup>347</sup>. Cependant, le nombre de LTm CD8<sup>+</sup> Ag-spécifiques décroît au cours du temps en raison d'une diminution de leur prolifération homéostatique. En effet, les LTm de souris IL-15<sup>-/-</sup> ou IL-15<sup>+/+</sup> marqués au CFSE et transférés dans des souris receveuses IL-15<sup>-/-</sup> ne prolifèrent pas alors que le transfert dans des souris receveuse IL-15<sup>+/+</sup> permet leur prolifération démontrant le rôle de l'IL-15 dans la prolifération homéostatique<sup>347</sup>. Afin de maintenir le nombre de LTm constant, certaines cellules doivent mourir suite à la prolifération homéostatique. Lors de la prolifération des T<sub>CM</sub> (CD62L<sup>élevé</sup>CD27<sup>élevé</sup>), une population nommée T<sub>DIM</sub> (*death intermediate memory cells*) est générée. Ces T<sub>DIM</sub> expriment faiblement CD62L et CD27, ils sont non fonctionnels et ils présentent une signature apoptotique les destinant à la mort, ce qui les distingue des T<sub>EM</sub><sup>350</sup>.

Les LTm CD8<sup>+</sup> ne requièrent pas de signal RCT via l'interaction avec le CMH pour leur survie. D'abord, des LTm CD8<sup>+</sup> transférés dans des souris n'exprimant pas de CMH I survivent au cours du temps et maintiennent leur fonctionnalité (sécrétion rapide de cytokines et prolifération)<sup>351</sup>. Plus récemment, suite à une immunisation avec des CD-OVA, l'expression

du RCT chez les CD8<sup>+</sup> Ag-spécifiques a été abolie au stade mémoire (jour 40 post-immunisation) grâce à un système inductible à la tétracycline. En absence de RCT, les LTm CD8<sup>+</sup> survivent au cours du temps (150 jours), sont fonctionnels (sécrétion IFN- $\gamma$ ) et s'autorenouvellent au même rythme que les LTm CD8<sup>+</sup> exprimant le RCT puisque le BrdU est incorporé de façon similaire. En absence de RCT, les LT CD8<sup>+</sup> sont donc concurrentiels pour obtenir les signaux de cytokines nécessaires à leur homéostasie<sup>352</sup>.

#### **1.3.4 Les modèles de différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires**

Comment la mémoire immunologique CD8<sup>+</sup> est-elle formée ? Le LT CD8<sup>+</sup> est-il prédestiné à devenir un LTe ou un LTm ? Doit-il nécessairement passer par un stade effecteur avant de devenir mémoire ? Le devenir de l'effecteur demeure-t-il malléable par son environnement une fois les contacts avec les CPA terminés ? Voilà des questions qui passionnent le domaine de l'immunologie fondamentale. Plusieurs études tentent de répondre à ces questions. Cinq modèles sont proposés pour d'expliquer le mécanisme de génération des LTe et des LTm ainsi que la diversité des populations retrouvées (figure 11).

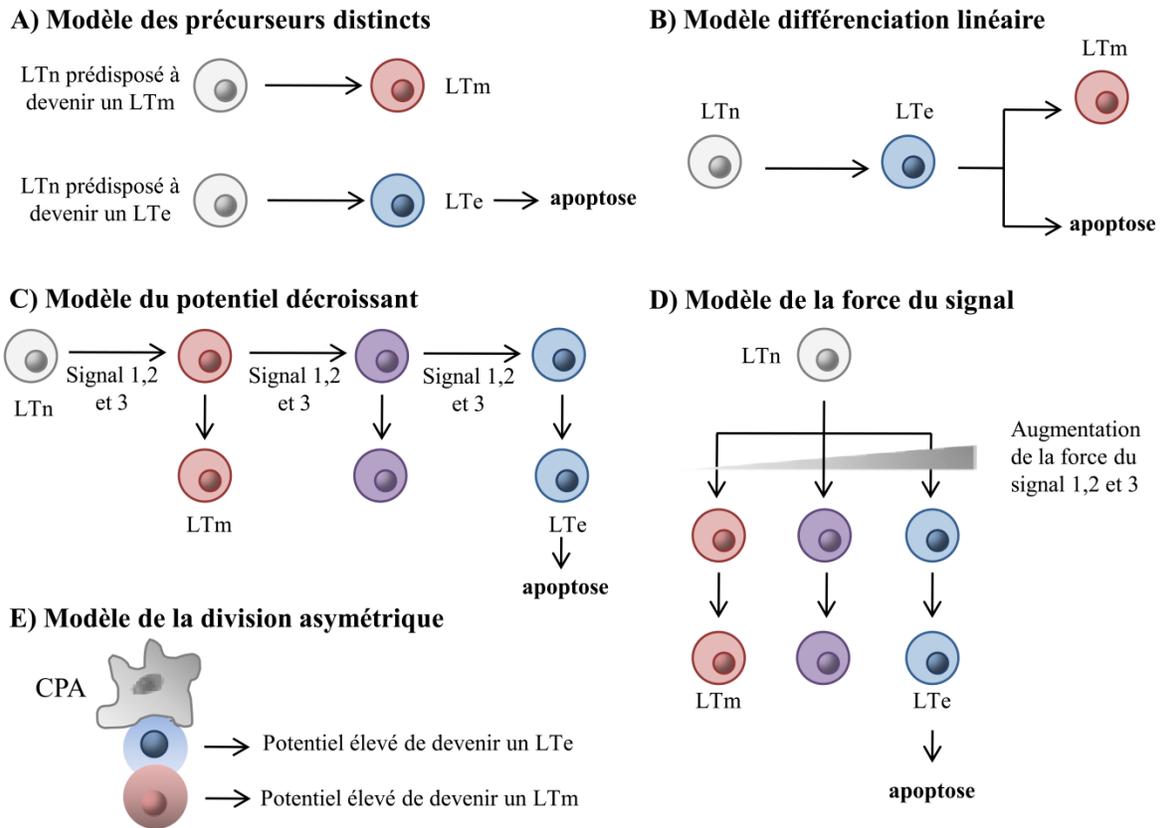


Figure 11. Les cinq modèles de différenciation des LT CD8<sup>+</sup> mémoires. En gris, le LTn n'ayant pas encore reçu de signal d'activation. En rouge, le LTm ayant le plus haut potentiel d'autorenouvellement et de survie au cours du temps. En mauve, un LT dans un état intermédiaire de différenciation. En bleu, le LTe. Inspiré de <sup>353</sup>.

### 1.3.4.1 Le modèle des précurseurs distincts

Le modèle des précurseurs distincts propose que les LTn soient prédisposés à devenir soit un LTe soit un LTm suite à leur activation (Figure 11A). Cette prédisposition repose sur des concentrations naturellement distinctes de différentes molécules de signalisation et de facteurs de transcription au sein du LTn CD8<sup>+</sup> ce qui influencerait sa réponse de façon intrinsèque. Toutefois, cette hypothèse est techniquement difficile à démontrer. Allant à l'encontre de ce modèle, des études démontrent qu'un seul LTn a la capacité de générer la diversité de LTe et de LTm retrouvée lors de la réponse immune. Pour ce faire, deux équipes

ont transféré une seule cellule (OT-1<sup>354</sup> ou du répertoire polyclonal<sup>355</sup>) alors qu'une autre équipe a attribué un code barre génétique à chaque OT-1<sup>356,357</sup> ou une combinaison de marqueurs allotypiques à 8 OT-1<sup>358</sup> permettant de suivre les progénitures dérivant d'un seul LTn. Ces trois études favorisent donc les quatre modèles décrits ci-après. Cependant, puisque chaque clone produit une progéniture variant quant à son expansion clonale et son phénotype<sup>355,357,358</sup>, une contribution des facteurs intrinsèques et extrinsèques ne peut pas être exclue. Ces études excluent cependant la possibilité qu'un seul LTn CD8<sup>+</sup> induise une progéniture ayant un phénotype unique.

#### 1.3.4.2 Le modèle de la différenciation linéaire

Le modèle de la différenciation linéaire propose que tous les LTn qui sont activés passent par un stade effecteur avant de survivre en tant que LTm ou de mourir par apoptose (Figure 11B). Le fait que les LTm puissent être issus d'effecteurs favorise ce modèle. En effet, dans un modèle LCMV, tous les LTe expriment la granzyme B et ont la même capacité cytolytique, malgré leur potentiel distinct à former des LTm d'après leur expression de KLRG1<sup>287,359</sup>. De plus, suite à l'infection influenza de souris *reporter* où l'expression de la granzyme B induit la production de EYFP (*enhancer yellow fluorescence protein*) de façon permanente, certains LTm formés expriment EYFP. Cette expérience élégante démontre que des LTm peuvent provenir de LTe ayant exprimé la granzyme B<sup>360</sup>.

#### 1.3.4.3 Le modèle du potentiel décroissant

Le modèle du potentiel décroissant propose que les LTe adoptent un phénotype qui corrèle avec leur historique de stimulation (Figure 11C). Plus les effecteurs sont en contact avec l'Ag, les signaux de costimulation et les cytokines, plus ils prolifèrent et plus ils acquièrent les propriétés d'effecteurs destinés à mourir. Plusieurs études soutiennent ce modèle. D'abord, dans des modèles où la durée de la présentation de l'Ag est plus courte et l'inflammation plus faible, comme l'immunisation avec des CD ou suite à l'administration d'antibiotiques lors d'une infection avec *Lm*, plus de précurseurs des mémoires sont formés et la formation de LTm est accélérée<sup>255,361</sup>. Ensuite, les LTn arrivant tardivement au sein des

organes lymphoïdes, alors que l'inflammation est plus faible, acquièrent un phénotype MPEC et forment plus de  $T_{CM}$ <sup>362</sup>. À l'opposé, l'ajout d'inflammation (injection d'IL-12 ou infection avec *Lm*) lors d'immunisation avec des CD augmente la génération de SLEC, soit des effecteurs différenciés<sup>254</sup>. De plus, une étude démontre que, dans un modèle LCMV, plus les LTe sont en contact longtemps avec l'Ag, plus ils adoptent un phénotype d'effecteurs destinés à mourir<sup>287</sup>. Finalement, l'environnement influence le phénotype des LTe issus de clones distincts. En effet, lorsqu'un seul LT  $CD8^+$  spécifique de l'OVA issu du répertoire polyclonal est transféré dans une souris receveuse subséquemment infectée avec *Lm*-OVA ou VSV-OVA, le profil des LTe générés est différent en fonction de l'infection donc de l'environnement inflammatoire<sup>355</sup>. L'infection *Lm* induit un biais vers la différenciation en SLEC et en DPEC alors que l'infection VSV favorise les EEC et les MPEC. De plus, suite à une infection orale avec *Lm*-OVA, les LTe retrouvés dans l'intestin et la rate n'ont pas le même phénotype<sup>355</sup>. Tous les LTe dérivent du même LTn transféré, l'environnement influence donc leur devenir.

#### **1.3.4.4 Le modèle de la force du signal**

Le modèle de la force du signal propose que le devenir du LT soit influencé par la force du signal global (Ag, costimulation et cytokines) reçu au moment de son activation (Figure 11D)<sup>363</sup>. La principale différence avec le modèle du potentiel décroissant est que les signaux sont donnés de façon précoce pour influencer le devenir du LT  $CD8^+$ . Un signal fort serait ici nécessaire pour induire l'expansion clonale maximale et la différenciation des MPEC. Toutefois, un signal global au dessus d'un certain seuil induirait la différenciation terminale des effecteurs. Les expériences démontrant le rôle d'un signal RCT fort pour la génération optimale de  $LTm$ <sup>122,139,152</sup> de même que le fait qu'une brève stimulation est suffisante pour induire la prolifération, la formation de LTe et de  $LTm$ <sup>282-284</sup> sont en faveur de ce modèle.

#### **1.3.4.5 Le modèle de la division asymétrique**

Le modèle de la division asymétrique propose que les effecteurs et les précurseurs des mémoires proviennent d'une même cellule suite à une division asymétrique (Figure 11E).

Suite à la division cellulaire induite lors de l'activation du LTn, la cellule proximale à la synapse immunologique acquiert un phénotype d'effecteur et la cellule distale un phénotype de précurseur des mémoires. En appui à cette théorie, il a été montré que suite à cette première division, plusieurs composantes cellulaires sont ségréguées inégalement. La cellule proximale à la synapse immunologique hérite de niveau plus élevé de CD8, CD3, LFA-1, IFN $\gamma$ R, CD69, CD43, CD44, CD25 et de niveau plus faible de CD62L et de CD127 (IL-7R $\alpha$ ). La cellule proximale a donc un phénotype d'effecteur et la cellule distale de MPEC. Si les cellules sont triées selon leur expression de CD8 et transférées dans des hôtes, les CD8<sup>faible</sup> (distales) assurent une meilleure protection lors d'un challenge indiquant qu'elles ont formé plus de LTm<sup>364</sup>. De plus, comparativement à la cellule distale, la cellule proximale conserve une expression plus forte de T-bet, un facteur de transcription important pour la génération de SLEC<sup>365</sup>. Une analyse des gènes exprimés par une seule cellule démontre que suite à la première division, la cellule distale a un profil de T<sub>CM</sub> alors que la cellule proximale a un profil de SLEC<sup>366</sup>. La division asymétrique peut donc contribuer à la génération de la diversité du phénotype observée chez les LT CD8<sup>+</sup>. Ces expériences appuient aussi le modèle de la force du signal puisque la cellule proximale reçoit un signal plus fort que la distale.

Ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs. Il est probable que les LTn CD8<sup>+</sup> soient intrinsèquement distincts et que cela les prédispose à adopter un certain phénotype. Par la suite la force et la durée de leur exposition à l'Ag et à inflammation influenceront leur phénotype. Finalement, la division asymétrique des composantes cellulaires peut ajouter à cette diversité lors de chacune des divisions. Les signaux reçus au moment de la présentation de l'Ag de même que ceux perçus tout au long de l'infection vont affecter les choix de différenciation des LTE. Il est aussi probable que la CPA avec laquelle le LT va interagir de même que l'activation d'autres voies de signalisation affectent la qualité des signaux reçus ainsi que l'expression de différents facteurs de transcription et contribue ainsi à la diversité des différentes populations de LT CD8<sup>+</sup> générées au cours de la réponse immune.

### 1.3.5 Les facteurs de transcription impliqués dans la réponse des LT CD8<sup>+</sup>

L'ensemble des signaux perçus au moment de la reconnaissance antigénique module le programme génétique induit chez le LT CD8<sup>+</sup>, ce qui influence son devenir. Certains facteurs de transcription jouent un rôle dans la différenciation terminale des LT CD8<sup>+</sup> et l'acquisition des fonctions effectrices alors que d'autres permettent la différenciation en LTm. Les principaux facteurs de transcription contrôlant ces événements identifiés à ce jour sont détaillés dans les sections suivantes. Il faut être conscient que ces facteurs de transcription sont présents simultanément dans la cellule et que c'est leur ratio, leur expression relative, qui dictera le devenir du LT CD8<sup>+</sup>. La figure 12 représente l'expression relative de ces facteurs de transcription par les SLEC et les MPEC. Les SLEC et les MPEC ont un patron d'expression réciproque des 3 paires de facteurs de transcription suivant : T-bet et Eomes, Blimp-1 et Bcl-6, Id2 et Id3. Cette expression différentielle des facteurs de transcription est certainement responsable de l'établissement du programme génétique permettant au MPEC de survivre, alors que les SLEC sont voués à la mort par l'apoptose.

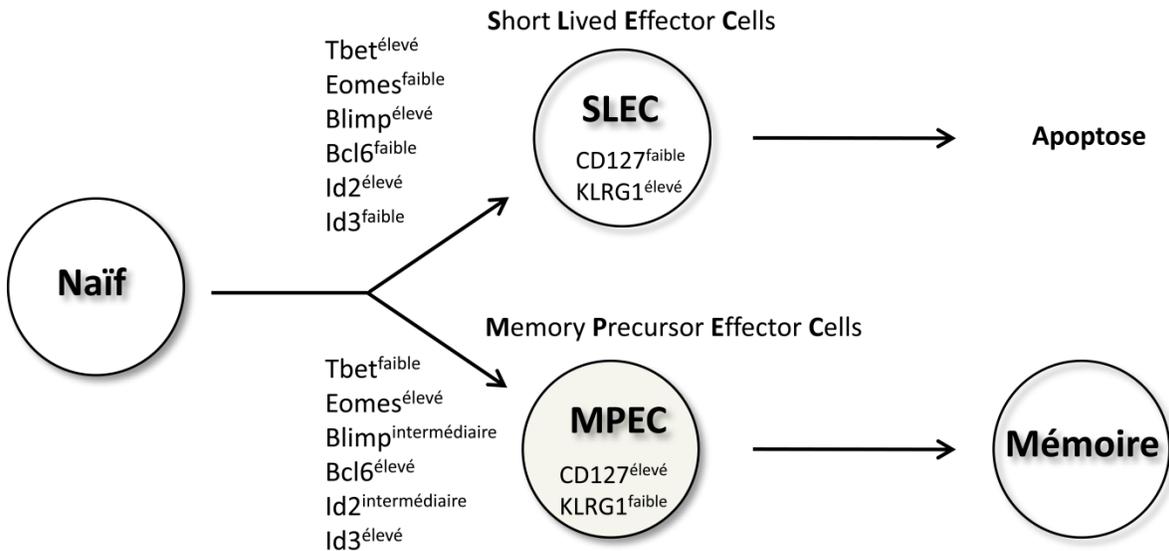


Figure 12. Expression relative des facteurs de transcription par les SLEC et les MPEC.

### 1.3.5.1 T-bet et Eomes

Les facteurs de transcription T-bet, encodé par le gène *Tbx21*, et eomesodermin (Eomes) font partis de la famille des facteurs de transcription T-box. T-bet et Eomes sont inversement exprimés : T-bet est plus exprimé chez les SLEC, des cellules complètement différenciées, et décroît chez les LTm CD8<sup>+</sup> alors que l'expression d'EOMES est plus forte chez les MPEC et les LTm CD8<sup>+</sup> <sup>251,254,367,368</sup>. T-bet est plus exprimé chez les T<sub>EM</sub> <sup>369</sup> alors qu'EOMES est plus fortement exprimé chez les T<sub>CM</sub> <sup>368</sup>. T-bet et Eomes ne sont pas détectables chez les LTn CD8<sup>+</sup>. Leur expression est induite par le signal RCT <sup>370</sup>. À l'aide de stimulation anti-CD3/CD28 *in vitro*, il a été démontré que T-bet est induit rapidement (expression maximale à jour 3), alors qu'Eomes est induit plus tardivement (expression maximale à jour 8). Suite au signal RCT, l'expression d'Eomes dépend de l'activation de N-ras et subséquemment de la voie PI3Kγ-AKT, mais pas de la voie ERK <sup>371</sup>. L'inflammation régule aussi l'expression de T-bet et Eomes. Le signal via le récepteur à l'IL-12, induit l'expression de T-bet chez les LT CD8<sup>+</sup> de façon dose-dépendante <sup>251,254</sup>. À l'opposé, un signal via l'IL-12 inhibe l'expression d'Eomes <sup>251</sup>.

T-bet et Eomes ont des fonctions redondantes afin de générer des LTe CD8<sup>+</sup> fonctionnels. En effet, ils collaborent pour induire la production d'IFN-γ et permettre l'activité cytolytique grâce à la production de granzyme B et de perforine. Dans un modèle d'infection LCMV de souris dont les LT n'expriment pas T-bet seulement, Eomes seulement ou T-bet et Eomes (T-bet<sup>fl/fl</sup>-CD4-Cre, Eomes<sup>fl/fl</sup>-CD4-Cre ou T-bet<sup>fl/fl</sup> Eomes<sup>fl/fl</sup>-CD4-Cre), la double délétion est requise afin d'observer un défaut de production d'IFN-γ et une diminution de l'activité cytolytique des LTe, causée par une diminution de la production de granzyme B ainsi que de perforine <sup>372</sup>. T-bet et Eomes collaborent aussi afin de maintenir les mémoires en induisant l'expression de CD122, qui est la chaîne β du récepteur à l'IL-15 et à l'IL-2 <sup>254,368</sup>.

T-bet est associé à la différenciation terminale des effecteurs, alors qu'Eomes est associé à la capacité des cellules à survivre au cours du temps. T-bet est requis pour la génération des SLEC (CD127<sup>faible</sup> KLRG1<sup>élevé</sup>) <sup>254</sup>. En effet, T-bet a la capacité de réprimer

l'expression de CD127 (IL-7R $\alpha$ ) chez les LTe CD8<sup>+</sup> lors d'une infection avec LCMV<sup>369</sup>. De plus, T-bet est responsable de l'augmentation de l'expression de KLRG1. La surexpression de T-bet est suffisante pour induire la différenciation en SLEC et son absence abolit leur différenciation<sup>254</sup>. Ainsi, T-bet contribue directement à l'acquisition du phénotype effecteur ainsi que des fonctions effectrices. Quant à EOMES, en plus de contribuer à l'acquisition des fonctions effectrices, il permet aux LTm CD8<sup>+</sup> de survivre en étant compétitifs pour occuper leur niche et de percevoir les signaux via la cytokine IL-15<sup>368,373</sup>. Suite à une infection avec LCMV, l'expression d'Eomes favorise la migration des LTm vers la moelle osseuse. Les T<sub>CM</sub> déficients en Eomes expriment moins CXCR3 et CXCR4 des récepteurs associés à la localisation des LTm dans la moelle osseuse. De plus, les LTm CD8<sup>+</sup> déficients en Eomes expriment moins le CD122, les rendant moins réceptif à l'IL-15<sup>368</sup>.

### 1.3.5.2 Blimp-1 et Bcl-6

Les facteurs de transcription Blimp-1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*, aussi PRDM1) et Bcl-6 (B-cell lymphoma 6) ont d'abord été identifiés chez les LB, comme leur nom l'indique. Ces deux répresseurs transcriptionnels ont des fonctions antagonistes pour influencer le devenir des LB et des LT. L'expression de Bcl-6 et de Blimp-1 est inversement corrélée et chacun de ces facteurs a la capacité d'inhiber la transcription de l'autre<sup>374</sup>. Reflétant cette inhibition mutuelle, la délétion de Blimp-1 augmente les niveaux d'expression de Bcl-6<sup>275,375</sup>. Dans la dernière décennie, leurs rôles ont été étudiés chez les LT CD8<sup>+</sup>. L'expression de Blimp-1 est maximale chez les SLEC et décroît chez les LTm, étant le moins exprimé chez les T<sub>CM</sub><sup>275</sup>. L'expression de Blimp-1 est induite par différentes cytokines, principalement l'IL-2, mais aussi l'IL-4, l'IL-12, IL-21 et l'IL-27<sup>246,376,377</sup>. L'expression de Bcl-6, induite suite à l'activation des LT<sup>378,379</sup>, est plus importante chez les MPEC que les SLEC<sup>275,380</sup>. Elle augmente chez les LTm CD8<sup>+</sup><sup>380</sup> étant plus exprimé chez les T<sub>CM</sub> que les T<sub>EM</sub><sup>381</sup>.

Blimp-1 induit la différenciation terminale des LB en plasmablastes<sup>374</sup>. De même, chez les LT CD8<sup>+</sup>, il promeut la différenciation terminale en SLEC. En absence de Blimp-1 chez les

LT CD8<sup>+</sup>, plus de MPEC sont présents au pic de la réponse et les LTm formés ont un phénotype T<sub>CM</sub> suite à une infection LCMV<sup>275,277</sup> et influenza<sup>375</sup>. Notre laboratoire a démontré que, suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup>, l'IL-2 est nécessaire pour augmenter l'expression de Blimp-1 et conséquemment induire la formation des SLEC lors d'immunisation avec des CD, un modèle peu inflammatoire<sup>276</sup>. L'expression de Blimp-1 augmente la production de cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) et augmente la cytolyse en régulant la production de granzyme B<sup>276,375</sup>. Blimp-1 influence aussi l'expression d'autres facteurs de transcription importants dans la génération des SLEC et des MPEC comme T-bet, Eomes et Bcl-6<sup>275,375</sup>. Dans le modèle influenza, Blimp-1 permet la sortie des organes lymphoïdes vers le site d'infection. En effet, l'absence de Blimp-1 augmente l'expression de CCR7 et diminue l'expression de CCR5, causant une diminution des LTe présents aux poumons<sup>375</sup>. Finalement, dans le modèle influenza, Blimp-1 permet une meilleure réponse effectrice secondaire<sup>375</sup>. Lors d'immunisation avec les CD, la délétion de *Blimp-1* n'affecte pas la formation de LTm ni la réponse secondaire<sup>276</sup>. Il est possible que la faible inflammation induise l'expression de Blimp-1 à un niveau plus faible que lors d'infection, diminuant sa capacité à réprimer Bcl-6, n'affectant donc pas la réponse mémoire. Blimp-1 est aussi un répresseur d'Id3 qui, lui, promeut la survie des cellules, un mécanisme contribuant à inhiber la génération de LTm en empêchant la survie des cellules lors de la contraction<sup>382</sup>. Récemment, il a été démontré que Blimp-1 inhibe directement deux gènes, *il2ra* et *cd27*, importants pour les LTm CD8<sup>+</sup>. Blimp-1 y recrutent la méthyltransférase G9a et l'histone déacétylase HDAC2 induisant des modifications répressives des histones. Les gènes *il2ra* et *cd27* sont réprimés tardivement par Blimp-1 (jour 7 à 9) suite à l'infection LCMV, un moment où les SLEC ne requièrent plus ces signaux (cytokine et costimulation) et où l'absence de ces signaux contribue à induire leur apoptose<sup>277</sup>. En plus de préciser le mécanisme permettant à Blimp-1 de défavoriser la différenciation en LTm, cette étude élucide un des mécanismes de répression par Blimp-1 qui pourrait s'appliquer à d'autres gènes.

Le facteur de transcription Bcl6 est impliqué dans la génération des LTm, plus particulièrement des T<sub>CM</sub>. Tout d'abord, il a été observé que, sans infection chez des souris Bcl6<sup>-/-</sup>, moins de LTm CD8<sup>+</sup> (CD44<sup>élevé</sup>Ly6C<sup>élevé</sup>CD122<sup>élevé</sup>) et moins de T<sub>CM</sub>

(CD44<sup>élevé</sup>Ly6C<sup>élevé</sup>CD62L<sup>élevé</sup>) sont présents dans la rate<sup>381,383</sup>. De façon concordante, des souris surexprimant Bcl-6 ont plus de LTm et de T<sub>CM</sub><sup>381,383</sup>. De plus, suite à l'immunisation avec des CD-OVA, 1 et 4 semaines post-immunisation, plus de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques envers l'OVA sont présents dans des souris surexprimant Bcl-6, comparativement aux souris sauvages, et l'inverse se produit chez les souris Bcl6<sup>-/-383</sup>. L'amplitude de la réponse est donc affectée par Bcl-6. L'expression de Bcl-6 augmente la quantité de LTe et de LTm formée et permet l'accumulation de T<sub>CM</sub> (CD44<sup>élevé</sup>Ly6C<sup>élevé</sup>CD62L<sup>élevé</sup>)<sup>381</sup>. Suite à une immunisation avec VV-OVA, dans des souris surexprimant Bcl-6, plus de T<sub>CM</sub> sont retrouvés 10 semaines post-infection et ceux-ci ont une plus grande capacité de prolifération. Des résultats opposés sont observés chez les souris Bcl6<sup>-/-381</sup>. Plus récemment, il a été démontré que Bcl-6 est nécessaire pour l'accumulation des LTm KLRG1<sup>faible</sup>CD127<sup>élevé</sup> (T<sub>CM</sub>) de façon intrinsèque. Pour ce faire, des souris CD8 $\alpha$ <sup>-/-</sup> irradiées ont été reconstituées avec un mélange de moelle osseuse de souris Bcl6<sup>-/-</sup> ou Bcl6<sup>+/+</sup> et CD8 $\alpha$ <sup>-/-</sup> pour générer des souris dont les LT CD8<sup>+</sup> expriment ou non Bcl-6. Cette stratégie a pour but de caractériser le rôle de Bcl-6 de façon intrinsèque dans la réponse des LT CD8<sup>+</sup> et ce, dans un environnement normal, puisque les souris Bcl-6<sup>-/-</sup> survivent mais leurs organes sont enflammés en raison d'une infiltration d'éosinophiles<sup>384</sup>. Ces chimères ont été infectées avec LCMV. Au pic de la réponse, le phénotype des LTe Bcl6<sup>-/-</sup> ou Bcl6<sup>+/+</sup> Ag spécifiques est similaire mais, au jour 40 un nombre similaire de LTm est présent alors que le nombre de LTm KLRG1<sup>faible</sup>CD127<sup>élevé</sup> Bcl6<sup>-/-</sup> est diminué par rapport aux Bcl-6<sup>+/+380</sup>. Cette étude ne permet pas de comparer l'amplitude de la réponse puisque les nombres de LTe présents ne sont pas montrés. Le rôle de Bcl-6 dans la génération et le maintien des LTm demandera plus d'étude. En effet, des souris où l'expression de Bcl-6 serait éliminée seulement chez les LT CD8<sup>+</sup> devraient être étudiées, pour caractériser l'impact de sa délétion dans un environnement normal.

### 1.3.5.3 Id2 et Id3

Les *Inhibitor of DNA binding* (Id) 2 et 3 sont reconnus pour leur capacité à inhiber la liaison à l'ADN des protéines E, qui sont des facteurs de transcription. Ces inhibiteurs régulent plusieurs aspects de l'hématopoïèse<sup>385</sup>. L'expression d'Id2 augmente suite à l'activation du LT

CD8<sup>+</sup> pour être maximale au pic de la réponse, chez les SLEC. L'expression d'Id3 est aussi augmentée chez les LTe, mais sera maintenue chez les LTm<sup>275,382,386</sup>.

Id2 est responsable de la survie des LTe tôt lors de la réponse immune et de la génération de T<sub>EM</sub>. En effet, l'analyse de la réponse contre une infection *Lm* dans des souris Id2<sup>-/-</sup> démontre que l'absence d'Id2 diminue le nombre de LTe présents au pic de la réponse et, conséquemment, le nombre de LTm formés<sup>387</sup>. Id2 n'affecte pas la prolifération des cellules mais leur survie, en influençant l'expression de molécules comme Bcl2 et BimEL (Bim Extra Long)<sup>387</sup>. Chez les souris Id2<sup>-/-</sup>, moins de T<sub>EM</sub> (CD62L<sup>faible</sup>CD122<sup>faible</sup>) sont présents et les LTm formés suite à une infection *Lm* ont un phénotype T<sub>CM</sub> (CD62L<sup>élevé</sup>CD122<sup>élevé</sup>CD27<sup>élevé</sup>CD127<sup>élevé</sup>)<sup>387</sup>. En accord avec ces données, il a été montré que l'inactivation d'Id2 par *knock in* empêche la formation de SLEC suite à une infection *Lm*<sup>386</sup>.

Quant à Id3, il est requis pour la survie lors de la phase de contraction permettant la génération de LTm, mais pas pour la différenciation en LTe. En effet, dans un modèle d'infection avec VV-gp100, où des LT CD8<sup>+</sup> pmel-1 *rag1*<sup>-/-</sup>*Id3*<sup>-/-</sup> spécifiques du peptide gp100 (un peptide de mélanome) sont transférés, aucune différence dans le nombre de LTe et de SLEC générés n'est observée<sup>382</sup>. Toutefois, en absence d'Id3, la quantité de LTm présente 35 jours post-infection est drastiquement diminuée. À l'opposé, la surexpression d'Id3 augmente la survie de SLEC qui seraient normalement éliminés par apoptose, puisqu'il diminue la contraction sans affecter la prolifération des LTe<sup>382</sup>. Cette action d'Id3 est indépendante d'Id2 et est médiée principalement par l'augmentation de la transcription de molécules impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN, rendant possiblement les LT CD8<sup>+</sup> moins sensibles à l'apoptose et augmentant ainsi leur survie<sup>382</sup>. Des souris *knock in* avec Id3-GFP, ont permis de montrer que les MPEC se retrouvent parmi les cellules exprimant fortement Id3 avant le pic de la réponse contre *Lm* ou VSV, et que la génération de LTm requiert Id3<sup>386</sup>.

## 1.3.6 Les voies/interactions/molécules influençant la réponse des LT CD8<sup>+</sup>

### 1.3.6.1 Les molécules d'adhésion

Lors de l'activation du LT CD8<sup>+</sup>, il y a d'abord des contacts brefs avec la CPA et des contacts prolongés sont ensuite établis. L'expression de LFA-1 est induite chez les LT CD8<sup>+</sup> suite au signal RCT et interagit avec ICAM-1 exprimée par les CD<sup>388</sup>. Cette interaction LFA-1/ICAM-1 est requise pour permettre ces contacts prolongés et influence la réponse des LT CD8<sup>+</sup>. Lorsque des souris sauvages ou des souris ICAM-1<sup>-/-</sup> sont transférées avec des OT-1 puis immunisées avec des Ac anti-DEC205:OVA et anti-CD40, les interactions entre les OT-1 et les CD *in vivo* sont plus stables et plus longues en présence d'ICAM-1. Au pic de la réponse, il en résulte une proportion similaire de LTe. Toutefois, la contraction est plus prononcée chez les souris ICAM-1<sup>-/-</sup> générant moins de LTm pour répondre à l'Ag lors d'une seconde exposition. Les LTe et les LTm générés en absence d'ICAM-1 produisent aussi moins d'IFN- $\gamma$ <sup>389</sup>. Une étude précédente a démontré qu'en absence d'ICAM-1, les LTm CD8<sup>+</sup> naturels (présents en absence d'infection chez la souris) et spécifiques de l'Ag ont un phénotype T<sub>EM</sub><sup>390</sup>. L'expression des molécules d'adhésion a donc la capacité d'influencer la réponse des LT CD8<sup>+</sup>. La force et la durée de l'interaction entre le LT CD8<sup>+</sup> et la CD augmentent probablement l'intensité du signal RCT et des molécules de costimulation, ce qui influence la qualité des signaux reçus ainsi que l'état d'activation final du LT et la génération de LTm.

### 1.3.6.5 L'aide des LT CD4<sup>+</sup>

L'aide des LT CD4<sup>+</sup> joue un rôle lors de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> afin qu'ils forment des LTm fonctionnels<sup>391,392</sup>. Selon les données actuelles, le mécanisme de l'aide des LT CD4<sup>+</sup> est le suivant : lorsqu'un LT CD4<sup>+</sup> reconnaît son Ag spécifique sur une CPA, celui-ci donne un signal via son CD40L pour activer la CPA<sup>393</sup> ce qui engendre une augmentation des molécules de costimulation (CD80, CD86, CD70) ainsi que la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6 et IL-12)<sup>394</sup>. L'expression de CD27, le récepteur de CD70, par les LT CD8<sup>+</sup> est importante afin de permettre la transmission de l'aide du LT CD4<sup>+</sup> via la CPA<sup>395-397</sup>.

Une fois que le LT CD8<sup>+</sup> interagit avec cette CPA, il y a induction de la production d'IL-2 qui agit sur le LT CD8<sup>+</sup> de façon autocrine<sup>269</sup>. Il est possible que le LT CD8<sup>+</sup> n'atteigne pas le niveau d'activation requis pour une production maximale d'IL-2. Dans ce cas, la production de l'IL-2 par les LT CD4<sup>+</sup> peut contribuer à l'activation optimale du LT CD8<sup>+</sup>. La diminution de la production d'IL-2 par les LT CD4<sup>+</sup> peut expliquer la non fonctionnalité des LTm, puisque l'IL-2 est requise pour une expansion maximale lors d'une seconde infection avec le même pathogène<sup>170,245</sup>. Un autre mécanisme qui contribue au défaut d'expansion lors de la réponse secondaire est l'augmentation de la production de TRAIL chez les LTm lors d'une seconde infection (28 jours post infection primaire avec LCMV), ce qui augmente leur AICD<sup>398</sup>. Cependant, l'équipe de Badovinac a démontré que l'absence de TRAIL retardait simplement le défaut de prolifération puisque 90 jours suivant l'infection avec LCMV, la réponse secondaire redevient inefficace, ce qui n'est pas le cas suivant 60 jours<sup>101</sup>. La présence de LT CD4<sup>+</sup> contribue aussi au maintien des LTm CD8<sup>+</sup>. En effet, une population de LTm générée suite à une infection LCMV et transférée dans une souris CMH II<sup>-/-</sup> décroît au cours du temps<sup>399</sup>. Finalement, l'aide des LT CD4<sup>+</sup> influence la migration des LT CD8<sup>+</sup>. D'abord, l'interaction du LT CD4<sup>+</sup> avec une CD présentant son Ag spécifique augmente leurs productions de CCL3 et de CCL4 ce qui a pour effet d'attirer les LTn CD8<sup>+</sup> exprimant CCR5 et augmente la probabilité que le LT CD8<sup>+</sup> entre en contact avec la CD présentant son Ag spécifique au sein du ganglion<sup>400</sup>. De plus, de façon indirecte, l'aide des LT CD4<sup>+</sup> contribue à la migration des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs au site d'infection. Dans un modèle murin d'infection avec HSV-2 au niveau du vagin, le recrutement des LT CD8<sup>+</sup> au site d'infection nécessite la présence des LT CD4<sup>+</sup>. Plus précisément, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup> induit la production de CXCL9 et de CXCL10 au site d'infection permettant le recrutement des LTe CD8<sup>+</sup> exprimant CXCR3<sup>295</sup>.

La dépendance de la réponse CD8<sup>+</sup> envers l'aide des LT CD4<sup>+</sup> varie d'un modèle à l'autre<sup>392,399,401,402</sup>. En fait, une forte inflammation menant à la production de cytokines et d'IFN de type I peut compenser le manque d'aide des LT CD4<sup>+</sup>. Ainsi, l'utilisation de souches plus ou moins virulentes et la dose administrée peuvent influencer la nécessité de l'aide des LT CD4<sup>+</sup> pour une réponse complète des LT CD8<sup>+</sup>. De plus, certains pathogènes ont la

capacité d'activer efficacement les CPA, par la liaison de PAMP aux TLR, augmentant l'expression de molécules de costimulation chez les CPA, diminuant la nécessité de l'aide des LT CD4<sup>+</sup><sup>401</sup>.

### 1.3.6.6 La voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine

Les protéines WNT ont été découvertes chez la drosophile et leur nom découle de la contraction de **W**ingless/**I**ntegration I. Les protéines WNT sont impliquées dans de multiples choix de différenciation cellulaire, notamment lors de l'hématopoïèse, de la différenciation thymique et du maintien des cellules souches. En absence de signal WNT, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée par la GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) et ubiquitinée, ce qui mène à sa dégradation par le protéasome et empêche la signalisation via TCF-1 (*T cell factor 1*, encodé par le gène *Tcf7*). Le récepteur Frizzled est activé par la liaison de son ligand WNT inactivant la GSK3 $\beta$ , ce qui stabilise la  $\beta$ -caténine, qui transloque au noyau afin de déplacer un corépresseur et s'associer au facteur de transcription TCF-1, pour activer la transcription de différents gènes<sup>403</sup>. Suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup>, l'expression de gènes associés à la voie WNT (*Tcf7*, *Lef1*, *Tle1-4*) est diminuée chez les LTe et augmentée chez les LTm<sup>404,405</sup>.

L'activation de la voie WNT par un inhibiteur de GSK3 $\beta$  lors de la reconnaissance de l'Ag *in vitro* et *in vivo* a diminué la prolifération des cellules et leur différenciation en LTe (CD44<sup>élevé</sup>CD62L<sup>faible</sup>), favorisant la formation de T<sub>CM</sub> (CD44<sup>élevé</sup>CD62L<sup>élevé</sup>)<sup>405</sup>. Dans des modèles où la voie WNT est constitutivement activée, suite à l'infection avec *Lm*, VV ou LCMV, l'expansion des LT CD8<sup>+</sup> Ag-spécifiques est diminuée par rapport aux souris sauvages. Cependant, la contraction est diminuée en raison d'une survie accrue générant plus de LTm, ce qui augmente la réponse secondaire<sup>404</sup>. De plus, en absence de TCF-1 chez les LT OT-1, l'infection avec *Lm*-OVA diminue la formation de T<sub>CM</sub> en raison d'une diminution de l'expression d'Eomes, causant une diminution de la sensibilité à l'IL-15, qui diminue la prolifération homéostatique de ces cellules<sup>406</sup>. En accord avec ces données, TCF-1 n'est pas requis pour la réponse effectrice contre LCMV, mais pour la génération de T<sub>CM</sub> capables de

proliférer lors d'une seconde infection<sup>407</sup>. Ces deux études ont aussi observé qu'en l'absence de TCF-1 lors d'une infection avec *Lm* ou LCMV, l'expression de KLRG1 augmente, ainsi plus de SLEC sont générés suggérant que TCF-1 favorise la formation de MPEC<sup>406,407</sup>. L'activité de la voie WNT/ $\beta$ -caténine doit donc être diminuée pour l'expansion clonale maximale des SLEC mais augmentée pour la génération de T<sub>CM</sub>.

## 1.4 La voie de signalisation Notch

Une autre voie pouvant affecter la réponse des LT CD8<sup>+</sup> est la voie de signalisation Notch. La voie de signalisation Notch a été nommée ainsi suite à l'identification d'une souche de *Drosophila melanogaster* ayant les ailes dentelées (*notch* en anglais). Cette voie est conservée du ver jusqu'à l'homme et régule de multiples choix cellulaires au cours du développement de ces différents organismes. Le contexte d'activation de la signalisation Notch déterminera si la différenciation, la prolifération ou l'apoptose de la cellule sera induite. Plusieurs études démontrent un rôle de la voie de signalisation Notch chez les LT, mais l'étude de ses effets lors de la réponse immune des LT CD8<sup>+</sup> demeurent incomplets. En raison de son implication dans les choix de différenciation cellulaire, la voie de signalisation Notch pourrait être impliquée dans le développement des LTe et des LTm CD8<sup>+</sup>. Le rôle de la voie Notch dans le développement des LTm n'a jamais été caractérisé.

### 1.4.1 La biologie des récepteurs Notch

Chez les mammifères, 5 ligands de Notch et 4 récepteurs Notch ont été identifiés. Les ligands de Notch sont Jagged 1 et 2 (J1 et J2) (des homologues de Serrate chez la drosophile) ainsi que Delta-like 1, 3 et 4 (Dll1, Dll3 et Dll4) (des homologues de Delta chez la drosophile). Les récepteurs Notch sont nommés Notch 1 à 4 (N1, N2, N3 et N4) (Figure 13). Plusieurs domaines conservés sont présents sur ces ligands et récepteurs. Les récepteurs Notch sont des hétérodimères transmembranaires de type I liés de façon non covalente<sup>408</sup>. Dans la portion extracellulaire des récepteurs se retrouvent les répétitions de type EGF (*Epidermal Growth Factor-like repeats*) et LIN (*cysteine-rich Notch/LIN12 repeats*). Dans la portion

intracellulaire du récepteur se trouve le domaine RAM (R, *RBP-Jkappa-associated module*) et six répétitions ankyrines (ANK) impliquées dans les interactions protéines/protéines. Deux séquences de localisation nucléaires (NLS) sont aussi présentes, de même qu'un domaine de transactivation (TAD) et une séquence PEST (P) régulant la stabilité de la protéine. Les ligands de Notch sont aussi des protéines transmembranaires de type I contenant un domaine DSL (*Delta, Serrate and Lag2*) et des répétitions de type EGF. Seuls les ligands J1 et J2 contiennent un domaine riche en cystéine (CR, *cystein rich*)<sup>408,409</sup>

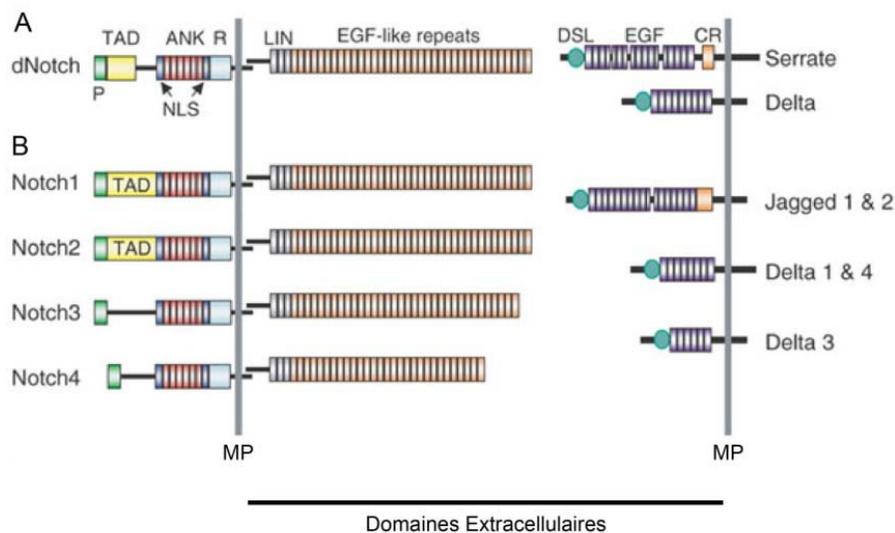


Figure 13. Schéma des récepteurs et des ligands de Notch chez la drosophile (A) et chez les mammifères (B). MP : membrane plasmique, P : séquence PEST, TAD : domaine de transactivation, NLS : séquence de localisation nucléaire, ANK : répétitions ankyrine, R : domaine RAM, LIN : cysteine-rich Notch/LIN12 repeats, DSL : Delta, Serrate and Lag2, CR : domaine riche en cystéine. Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Immunology,<sup>409</sup>, ©2004.

Pour être pleinement fonctionnels, les récepteurs Notch transitent dans le trans-golgi où ils subissent un premier clivage au site S1 par une furine (Figure 14). Ce clivage permet la formation du récepteur hétérodimérique comprenant un domaine extracellulaire et un domaine transmembranaire. Les récepteurs peuvent subir des modifications post traductionnelles

influençant leurs liaisons avec les ligands<sup>410</sup>. Par exemple, une O-fucosyltransférase peut ajouter des résidus O-fucose aux récepteurs Notch, permettant la glycosylation par des protéines Fringe, augmentant l'affinité du récepteur Notch pour les ligands Delta-like et diminuant l'affinité pour les ligands Jagged<sup>411-413</sup>.

## 1.4.2 Les mécanismes généraux de signalisation

### 1.4.2.1 La signalisation canonique

L'interaction d'un récepteur Notch avec son ligand induit un changement de conformation exposant le site de clivage S2, permettant ainsi le clivage par la métalloprotéase ADAM10, permettant à son tour la libération et l'endocytose du domaine extracellulaire de Notch (NECD) par la cellule qui exprime le ligand de Notch. La portion du récepteur Notch ancrée à la membrane peut alors servir de substrat pour le complexe  $\gamma$ -sécrétase qui clive le site S3, libérant le domaine intracellulaire de Notch (NICD) (figure 14). Le NICD va alors transloquer au noyau où il déplace des corépresseurs afin de se lier à RBPJk chez la souris (aussi connu sous le nom de CSL (CBF-1 (humain), *S*uppressor of *H*airless (drosophile) et LAG-1 (*C. elegans*)) et interagir avec MAML (*M*astermind-like), pour recruter d'autres coactivateurs notamment p300 une histone acetyltransférase qui permet l'ouverture de la chromatine<sup>414-416</sup>. Les corépresseurs comprennent des molécules contribuant à la localisation nucléaire de RBPJk (SMRT) et des histones déacétylases (HDAC1, HDAC2) aidant à maintenir la chromatine dans une conformation fermée<sup>417</sup>. Plusieurs gènes seront activés par le déplacement de corépresseurs et le recrutement de coactivateurs, dont les membres de la famille Hes (*H*airy/*e*nhancer of *s*plit) et Deltex, mais aussi des gènes tissus et contextes spécifiques (revue dans<sup>410,418</sup>) (Figure 14). Cependant, RBPJk n'est pas toujours présent à son site consensus<sup>419</sup> et certains sites lient seulement RBPJk<sup>420</sup>. Un site de liaison RBPJk n'est donc pas nécessairement un site associé à la signalisation Notch. La voie de signalisation Notch ne contient pas d'étape d'amplification du signal donc chaque récepteur Notch donne un seul NICD. Ceci suggère une relation stœchiométrique entre le signal donné et perçu, ainsi qu'un lien direct entre la force du signal et la réponse cellulaire.

Une fois clivé et relâché, le NICD peut encore subir des modifications post-traductionnelles. D'abord, il peut être phosphorylé sur différents sites dans son domaine PEST, le stabilisant ou le déstabilisant. De plus, la phosphorylation permet d'enclencher l'ubiquitination, ce qui influence la demi-vie du NICD<sup>421</sup>. Ensuite, il peut être hydroxylé par FIH1 (*factor inhibiting HIF1 $\alpha$* ) aussi impliqué dans la réponse hypoxique. Toutefois la pertinence biologique de ce phénomène doit être investiguée. Finalement, le NICD peut être acétylé, ce qui régule sa demi-vie (revue dans<sup>410</sup>).

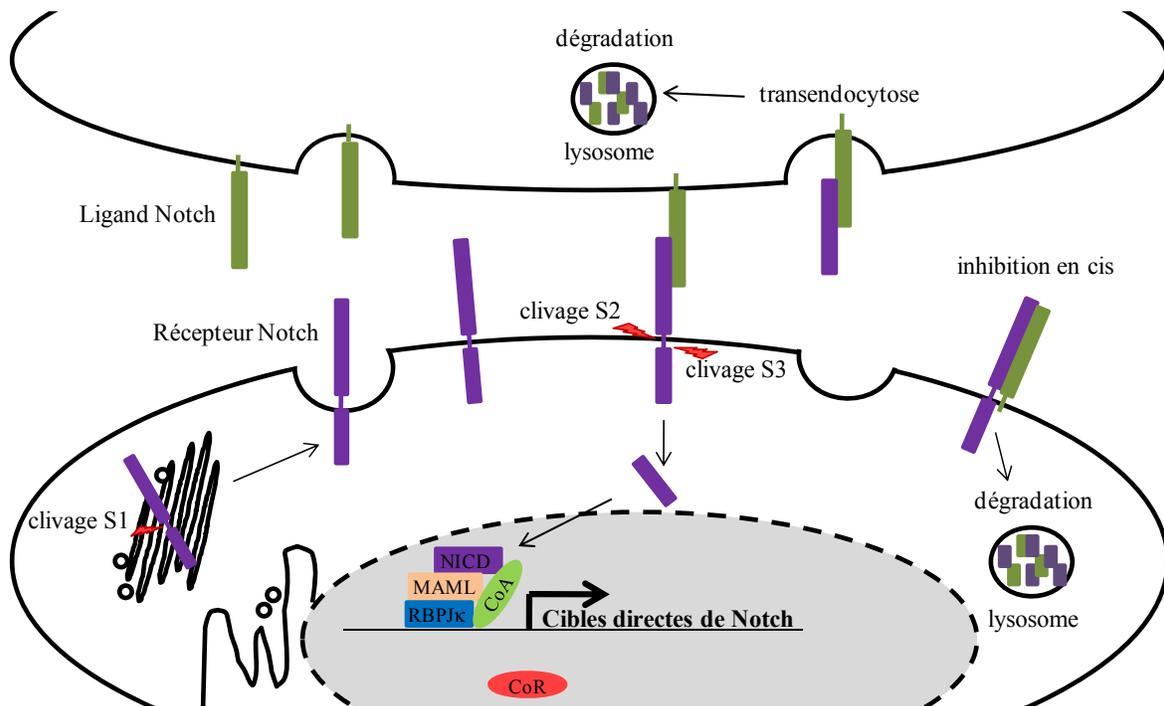


Figure 14. La voie de signalisation Notch. Pour être fonctionnels, les récepteurs Notch transitent dans le trans-golgi où ils subissent un premier clivage au site S1 par une furine. L'interaction d'un récepteur avec son ligand induit un changement de conformation permettant les clivages séquentiels aux sites S2 et S3 pour libérer le NICD. Le NICD transloque au noyau où il interagit avec MAML et RBPJk, afin de déplacer des corépresseurs (CoR) et recruter des coactivateurs (CoA). La transendocytose mène à la dégradation du NECD. Une interaction en cis induit la dégradation du récepteur et du ligand. Inspiré de<sup>422</sup>.

Une cellule peut exprimer à la fois les ligands et les récepteurs Notch. Cependant, c'est le ratio ligands/récepteurs qui détermine si la cellule donne ou reçoit un signal Notch. Une interaction en trans (entre deux cellules) engendre une signalisation activatrice. À l'opposé, une interaction en cis (sur la même cellule) inhibe la signalisation via le récepteur Notch et diminue aussi la capacité de la cellule à donner un signal via son ligand<sup>410</sup>. Ceci a été démontré, entre autres, à l'aide d'un modèle *in vitro* où des lignées cellulaires expriment différents niveaux de ligands Dll1 et de récepteurs N1<sup>423</sup>. Il a aussi été démontré que les cellules peuvent recevoir et envoyer un signal simultanément. Ce phénomène a été observé *in vitro* dans les complexes CD/LT CD4<sup>+</sup> humains au moment de la reconnaissance antigénique, où il y a ségrégation des récepteurs et des ligands au sein de la synapse immunologique. En effet, dans le cSMAC, le LT CD4<sup>+</sup> exprime les récepteurs Notch et les ligands dans le pSMAC et vice-versa pour la CD<sup>424</sup>. En raison de la localisation cellulaire distincte des composantes de la voie Notch, la signalisation bidirectionnelle est compatible avec l'inhibition en cis.

#### 1.4.2.2 La signalisation non canonique

La voie de signalisation Notch non canonique est activée indépendamment de la liaison avec les ligands ou n'implique pas la signalisation via RBPJK chez la souris<sup>425</sup>. Il existe une signalisation non canonique chez les LT, puisque des souris N1<sup>fl/fl</sup>N2<sup>fl/fl</sup>-CD4-Cre sont plus susceptibles à une infection avec *Leishmania major* dont l'élimination dépend des T<sub>H</sub>1 alors que des souris RBPJK<sup>fl/fl</sup>-CD4-Cre sont aussi résistantes que les souris C57BL/6<sup>426</sup>. Plusieurs exemples d'interaction du NICD avec d'autres facteurs de transcription sont rapportés dans la littérature. Certaines interactions ont été identifiées directement chez les LT CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> où la voie de signalisation de Notch peut interagir avec les facteurs de transcription CREB et NF-κB<sup>427 428 429</sup> (Voir section 1.3.4.2).

### 1.4.3 Les interactions avec d'autres voies

#### 1.4.3.1 La voie de signalisation du RCT

La voie de signalisation de Notch est aussi liée à la voie du RCT. Plusieurs groupes ont observé la présence de récepteur Notch (ou du NICD) à la synapse immunologique<sup>344,424,430</sup> où il peut interagir avec CD3 et VAV<sup>344</sup>. Le recrutement de N1 et d'ADAM10 (requis pour le clivage du NICD) à la synapse immunologique des LT CD4<sup>+</sup> nécessite une signalisation forte, c'est-à-dire une phosphorylation importante des ITAM<sup>344</sup>. Ces études suggèrent que la voie de signalisation Notch peut avoir un effet directement sur la signalisation en aval du RCT. Suite à l'activation (anti-CD3/CD28) de LT CD4<sup>+</sup> provenant de souris n'exprimant pas N1 (Mx-Cre<sup>+/-</sup>-N1<sup>fl/fl</sup>), une diminution de la prolifération, de l'expression de CD25 et de CD69 ainsi que de la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  est observée. Ces effets ne sont pas présents suite à la délétion de RBPJ $\kappa$  (Mx-Cre<sup>+/-</sup>-RBPJ $\kappa$ <sup>fl/fl</sup>) suggérant un rôle RBPJ $\kappa$  indépendant. L'inhibition pharmacologique de l'activation de NF- $\kappa$ B chez les LT CD4<sup>+</sup> isolés de souris n'exprimant pas RBPJ $\kappa$  et stimulés *in vitro* restaure le phénotype observé en absence de N1, suggérant un effet dépendant de NF- $\kappa$ B<sup>431</sup>. En effet, dans des LT Jurkat activés *in vitro* (anti-CD3/CD28), N1 interagit avec PKC- $\theta$  (signal proximal du RCT) et permet le recrutement de CARMA et de BCL10 à la synapse immunologique pour former un signalosome et ainsi contribuer à l'activation de NF- $\kappa$ B. Cette fonction de N1 précède l'accumulation du NICD au noyau et requiert sa présence au cytosol (ou à la membrane)<sup>432</sup>. Ces données démontrent que N1 amplifie le signal du RCT en interagissant avec des molécules cytosoliques pour contribuer à l'activation précoce des LT. Dans un modèle de GVHD aigue, 5 jours post transfert de splénocytes C57BL/6 dans des souris Balb/c, les LT CD8<sup>+</sup> exprimant un gène codant pour un dominant négatif de MAML (DNMAML) (triés et restimulés antiCD3/CD28) présentent une diminution de la signalisation Ras/MAPK et NF- $\kappa$ B<sup>433</sup>. Les LTn CD8<sup>+</sup> DNMAML ne présentent pas de défaut de signalisation Ras/MAPK et NF- $\kappa$ B<sup>433</sup>. Ceci suggère donc que le défaut de signalisation peut être acquis en absence de signalisation Notch canonique. Puisque la présence de Notch au cytosol peut influencer l'activation de NF- $\kappa$ B<sup>432</sup>, il est possible qu'en absence de signalisation Notch canonique, l'augmentation de l'expression des récepteurs Notch à la surface cellulaire soit moindre, induisant le défaut de signalisation observé.

### 1.4.3.2 Le facteur de transcription Bcl-6

Le répresseur transcriptionnel **Bcl-6**, entre autres associé au développement des LTm CD8<sup>+</sup>, a la capacité de réprimer l'activation de certains gènes par Notch chez l'embryon de grenouille *Xenopus*. En effet, lors de l'établissement de l'asymétrie gauche/droite chez l'embryon, Bcl6 se lie au NICD, empêchant le recrutement de MAML et s'associant plutôt avec BCoR (Bcl6 corépresseur) afin d'inhiber certains gènes effecteurs classiques spécifiques de la voie Notch, comme ESR1 (*enhancer of split related 1*). Ce mécanisme permet de maintenir l'expression de Pitx requise pour le maintien de l'asymétrie droite/gauche alors qu'autrement l'expression de ce gène serait inhibée par ESR1. La sélection des gènes inhibés se ferait grâce à la liaison de Bcl6 aux promoteurs ciblés<sup>434</sup>. Un phénomène similaire a été observé chez la souris dans un modèle de neurogénèse corticale à partir de cellules souches embryonnaires<sup>435</sup>. Dans ces cellules, lors de la différenciation des neurones, la signalisation Notch est maintenue, mais la transcription du gène cible Hes5 doit être inhibée. Pour ce faire, Bcl6 empêche la liaison de MAML et recrute Sirt-1, une déacétylase induisant une modification épigénétique stable, favorisant la formation d'hétérochromatine et permettant la différenciation en neurone<sup>435</sup>. Compte tenu du rôle de Bcl-6 dans la différenciation des LTm CD8<sup>+</sup>, il est plausible qu'une interaction Bcl-6/Notch influence les gènes activés pour orienter la différenciation.

### 1.4.3.3 Le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$

Il a récemment été rapporté que l'expression de HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible factor-1*) augmente la réponse effectrice des LT CD8<sup>+</sup> lors d'une infection chronique à LCMV<sup>436</sup>. HIF-1 $\alpha$  agit comme un senseur des niveaux d'oxygène disponibles. En normoxie, HIF-1 $\alpha$  est instable, lié par des ubiquitine et dégradé rapidement<sup>437</sup>. En hypoxie, HIF-1 $\alpha$  est stabilisé et interagit avec HIF-1 $\beta$  pour activer différents HRE (*hypoxia response elements*) aux promoteurs de certains gènes notamment des gènes impliqués dans la glycolyse, comme la phosphoglycérate kinase 1 (PGK1)<sup>438</sup>. Il a été démontré, chez les cellules souches neurales, que Notch et HIF-1 $\alpha$  pouvaient collaborer pour inhiber la différenciation en condition hypoxique. Pour ce faire, HIF-1 $\alpha$  stabilise le NICD, lui permettant d'activer certains gènes

spécifiques de la voie de Notch (Hes, Hey)<sup>439,440</sup>. Une telle interaction est donc possible dans d'autres types cellulaires comme les LT CD8<sup>+</sup> où HIF-1 $\alpha$  et le NICD pourraient collaborer, pour favoriser la différenciation des LTe lors de leur expansion.

#### 1.4.3.4 La $\beta$ -caténine

Il a été rapporté que la signalisation Notch pouvait antagoniser la voie WNT/ $\beta$ -caténine dans certains organismes (rongeurs, grenouille, mouche). Cet effet a été observé seulement dans certains types cellulaires, ce n'est donc pas une interaction qui a assurément lieu. L'expression des récepteurs Notch et de la  $\beta$ -caténine active est inversement corrélée<sup>425</sup>. Chez des cellules souches embryonnaires (ESC, *embryonic stem cells*) murines, les récepteurs Notch liés à la membrane peuvent interagir directement avec la  $\beta$ -caténine pour l'inactiver par des modifications post-traductionnelles. La surexpression du NICD diminue l'expression de la  $\beta$ -caténine active et totale, mais n'influence pas l'expression de son ARNm. Cet effet est maintenu en absence de RBPJk et MAML, mais requiert Numb et le lysosome<sup>425,441</sup>. L'activation de la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine influence la réponse des LT CD8<sup>+</sup> en favorisant la formation de LTm fonctionnels<sup>404-407</sup> (section 1.2.7.3). Ainsi, suite à la reconnaissance de l'Ag par LT CD8, la présence des récepteurs Notch à la surface cellulaire pourrait inhiber l'activation de la  $\beta$ -caténine, favorisant la différenciation en SLEC.

Ces quelques exemples démontrent que des interactions avec d'autres molécules ou facteurs de transcription peuvent réguler la signalisation via Notch et que les récepteurs Notch peuvent aussi influencer d'autres voies de signalisation. La complexité des effets de la voie de signalisation Notch est sans cesse grandissante. Ces interactions avec la voie de signalisation de Notch pourraient contribuer à la différenciation de différentes cellules dont les LT.

## 1.4.4 La voie de signalisation Notch et les lymphocytes T

La voie de signalisation Notch est requise tout au long du développement, de l'embryon à l'adulte. Une fonction importante de la voie de signalisation Notch dans le système immunitaire est l'engagement des progéniteurs vers la lignée T. En effet, les récepteurs N1 des progéniteurs thymiques précoces (ETP, early thymic progenitor) doivent interagir avec Dll4, afin de se différencier vers la lignée T et d'inhiber la différenciation vers la lignée B et myéloïde<sup>442-446</sup>. Ici, il sera spécifiquement question du rôle de Notch chez les LT matures lors de la réponse immunitaire.

### 1.4.4.1 Le rôle de Notch lors de la réponse des LT CD4<sup>+</sup>

L'expression des récepteurs N1, N2 et N3 est augmentée suite à la reconnaissance de l'Ag (signalisation via le RCT) par le LT CD4<sup>+</sup><sup>447,448</sup>. Les premières études chez les LT CD4<sup>+</sup> ont démontré que les ligands de Notch exprimés par les CD permettent de polariser la réponse vers un phénotype T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2. En effet, les CD exprimant Dll4 induisent une réponse T<sub>H</sub>1, alors que les CD exprimant J2 induisent une réponse T<sub>H</sub>2 *in vitro*<sup>449</sup>. Cette étude démontre aussi que le NICD agit directement via une interaction avec un site RBPJK contenu dans l'amplificateur (*enhancer*) du gène *il-4*<sup>449</sup>. Il a aussi été montré que la stimulation de LT CD4<sup>+</sup> avec une protéine de fusion Dll1-FC (fragment constant des Ac) induit une réponse T<sub>H</sub>1 *in vitro et in vivo*<sup>450</sup>. Ces premières études soulèvent la question suivante : comment le récepteur Notch peut-il discriminer entre la liaison avec un ligand Jagged versus Delta-like et ainsi influencer simultanément la différenciation des T<sub>H</sub>1 et des T<sub>H</sub>2? Au cours des années suivantes, un rôle de Notch autant dans la différenciation des T<sub>H</sub>1 que des T<sub>H</sub>2 s'est précisé. Des études ont démontré que Notch régule directement l'expression de Gata3, un facteur de transcription essentiel pour la différenciation T<sub>H</sub>2<sup>419,451</sup>, alors que d'autres études ont démontré un impact de la signalisation Notch sur la différenciation des T<sub>H</sub>1. L'utilisation d'inhibiteur de  $\gamma$ -secretase (GSI) et la surexpression du NICD de N1 ont permis de démontrer que la signalisation Notch influence la production d'IFN- $\gamma$  en grâce à la liaison du NICD au promoteur de *Tbx21* (gène codant pour T-bet). De plus, le traitement de souris avec un GSI diminue la gravité de l'EAE (*Experimental autoimmune encephalomyelitis*), une maladie

autoimmune dépendante de la réponse  $T_H1$ <sup>452</sup>. Plus récemment, la liaison du NICD au promoteur de *Tbx21* et son rôle dans la polarisation  $T_H1$  chez les LT  $CD4^+$  ont été confirmés dans un modèle d'anémie aplasique<sup>453</sup>. D'autres modèles d'études ont généré des résultats légèrement différents. En effet, dans un modèle d'EAE, à l'aide de souris où l'inhibition de Notch est spécifique de la signalisation canonique chez les LT (*ROSA26<sup>DNMAMLf</sup>-CD4-cre* (souris DNMAML, RBPJK-CD4-Cre), il a été montré que la signalisation Notch est requise pour la migration et la fonctionnalité des cellules (production IL-17A et IFN $\gamma$ ) au sein du système nerveux central. Cependant, dans ce modèle, en absence de signalisation Notch, les fonctions effectrices des LT  $CD4^+$  ne sont pas affectées dans les organes périphériques<sup>454</sup>. À l'aide des mêmes modèle murins mais dans un modèle de GVHD aiguë (transfert moelle osseuse de souris C57BL/6 dans des souris Balb/C), les LT  $CD4^+$  sécrètent moins d'IFN- $\gamma$  et ont un phénotype anergique<sup>433,455,456</sup>. Les souris où la signalisation canonique de Notch est absente souffrent d'une GVHD moins sévère, associée à une augmentation de l'expansion des Treg, mais l'activité cytotoxique et la capacité d'éliminer des cellules leucémiques est préservée<sup>433,455,456</sup>. Contrairement aux autres études décrites précédemment, aucune différence d'expression de T-bet n'a été observée en absence du signal Notch dans des modèles d'EAE et de GVHD<sup>433,454,455</sup>. Donc, contrairement aux études précédentes, dans ces modèles la signalisation Notch n'influencerait pas directement le choix  $T_H1$  via T-bet. Ces observations contradictoires concernant la régulation de T-bet sont possiblement dues à l'utilisation de différentes techniques d'inhibition de la voie de Notch et l'utilisation des différents modèles d'infection étudiés. En effet, la signalisation Notch peut avoir des effets indépendants de RBPJK<sup>429,431</sup> et les GSI ont des effets non spécifiques<sup>457</sup> pouvant ainsi affecter la réponse des LT  $CD8^+$ . De plus, des cytokines comme l'IL-12 peuvent induire l'expression de T-bet et contribuer à l'expression de T-bet en absence de signal Notch.

Pour ajouter à l'énigme, certaines études observent que la voie de signalisation Notch n'est pas impliquée dans la différenciation  $T_H1/T_H2$  des LT  $CD4^+$ . En effet, l'induction de la signalisation de Notch par la liaison de différents ligands Notch (Dll1 ou J1), lors d'activation *in vitro* de LT  $CD4^+$ , augmente autant la production d'IFN- $\gamma$  que d'IL-4 et elle ne permet pas un choix en absence de cytokines polarisantes<sup>458</sup>. De plus, les LT  $CD4^+$  de souris

Notch1<sup>lox/lox</sup>CD4-Cre sont aussi capables de se différencier en T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2 *in vitro*<sup>459</sup>. Cette dernière étude illustre possiblement la redondance entre les récepteurs Notch et la nécessité de bloquer la signalisation globalement. De plus, le rôle de Notch ne se limite pas à la différenciation T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2. Notch a aussi été associé à la production accrue d'IL-17 par les T<sub>H</sub>17 et il a été montré que RBPJK se lie aux promoteurs de l'IL-17 et de Rorc suggérant une régulation de la transcription via Notch<sup>460</sup>. Globalement, Notch participe autant à la régulation des T<sub>H</sub>1, des T<sub>H</sub>2 que des T<sub>H</sub>17. Une publication récente vient unifier la majorité de ces observations. En effet, le groupe de Pear démontre que suite à une polarisation par les cytokines, la signalisation via Notch augmente la transcription et la production des cytokines respectives au T<sub>H</sub>1 (IFN $\gamma$ ), au T<sub>H</sub>2 (IL-4) ou au T<sub>H</sub>17 (IL-17) et des facteurs de transcriptions associés à chaque phénotype (T-bet, Gata3, Rorc). Cette publication vient aussi confirmer la régulation directe par Notch des gènes de l'*Il4*, *Tbx21*, *Gata3*, *Il17a* et *Rorc*. En fait, le NICD se relocalise sur ces promoteurs peu importe la condition de polarisation à laquelle la cellule est soumise. De plus, il est démontré que Notch se lie aussi dans l'amplificateur du promoteur de l'IFN- $\gamma$  où il agit en synergie avec T-bet pour en augmenter la transcription<sup>461</sup>. Seul, Notch ne peut pas induire ni inhiber la différenciation. Il augmenterait plutôt la sensibilité des LT CD4<sup>+</sup> aux cytokines environnantes, surtout lorsqu'elles sont présentes en quantité limitante<sup>461</sup>. En effet, lorsque les LT CD4<sup>+</sup> sont cultivés en présence de cytokines polarisantes (IFN- $\gamma$ , IL-4 ou IL-17), en absence de signal Notch (GSI), une concentration élevée de cytokines affecte peu la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> alors qu'une faible concentration inhibe la différenciation de façon plus marquée. Chez le LT CD4<sup>+</sup> activé, Notch servirait donc à augmenter la force globale du signal perçu afin de dépasser le seuil d'activation requis pour engager la différenciation. Ceci expliquerait aussi que dans des modèles infectieux où l'inflammation est forte, tel *Leishmania*, Notch n'est pas requis pour la différenciation en T<sub>H</sub>1<sup>449,462</sup>.

#### 1.4.4.2 Le rôle de Notch lors de la réponse des LT CD8<sup>+</sup>

Suite à la reconnaissance de l'Ag (signalisation via le RCT) par le LT CD8<sup>+</sup>, l'expression des récepteurs N1 et N2 est augmentée<sup>427,447,463</sup> mais pas l'ARNm de N3 et N4<sup>427,456</sup>. Une augmentation de l'expression de N2 et N3 est observée chez les LT CD8<sup>+</sup> dans

un modèle de transplantation de cœur<sup>448</sup>. Ainsi, une signalisation via Notch est possible lors d'une réponse des LT CD8<sup>+</sup> mais une divergence des patrons d'expression des récepteurs selon les modèles étudiés existe. Suite à la stimulation avec un Ac anti-CD3 *in vitro* ou à une infection *in vivo* avec le virus de l'influenza<sup>464</sup>, les LT CD8<sup>+</sup> augmentent l'expression de N1 et N2 alors qu'une infection LCMV provoque seulement une augmentation de N1<sup>447</sup>, suggérant que le signal RCT, les molécules de costimulation ou l'inflammation peuvent influencer le patron d'expression des récepteurs Notch. D'ailleurs, le groupe d'Amsen a très récemment démontré que l'activation via le RCT et la perception de cytokine (IL-2, interféron de type I) par les LT CD8<sup>+</sup> affecte leur niveau d'expression des récepteurs N1 et N2<sup>464</sup>.

Tel qu'observé chez les LT CD4<sup>+</sup>, lorsque la voie de signalisation Notch est inhibée, la production de cytokines par les LT CD8<sup>+</sup> est diminuée<sup>463</sup>. L'utilisation d'un GSI ou de cellules provenant de souris exprimant un transgène N1-anti-sens, empêchant la production du récepteur N1, a montré qu'*in vitro*, la sécrétion d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  par les LT CD8<sup>+</sup> était diminuée. Une réduction de la prolifération a été observée avec le GSI, mais pas en présence du N1-anti-sens, suggérant une redondance entre les récepteurs Notch ou un effet collatéral du GSI<sup>463</sup>. Quelques années plus tard, le groupe de Osborne a aussi démontré que N1 se lie au promoteur d'*Eomes*, de *Prfl* (perforine) et de *GzmB* (granzyme B), influençant leur transcription, leur niveau de production et, conséquemment, leur activité cytolytique. Suite à l'exposition à un GSI, l'expression de T-bet est aussi diminuée chez les LT CD8<sup>+</sup> stimulés, mais aucune analyse de liaison du NICD à son promoteur n'a été faite<sup>428</sup>. De plus, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine démontrent que le NICD est requis pour la liaison optimale de NF- $\kappa$ B à son site (contigu au site de RBPJ $\kappa$ ) aux promoteurs d'*Eomes*, de *Prfl* et de la *GzmB*<sup>428</sup>. Cela suggère une collaboration entre la voie de signalisation de Notch et NF- $\kappa$ B, telle qu'observée au promoteur de l'IFN- $\gamma$  chez des LT activés (splénocytes anti-CD3/CD28 donc des CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) où le NICD interagit directement avec NF- $\kappa$ B au site de ce dernier<sup>429</sup>. Le NICD favorise aussi la rétention nucléaire de NF- $\kappa$ B<sup>429</sup>.

Il a aussi été démontré que N2 contrôle la transcription du gène de la granzyme B en formant un complexe avec pCREB1 (*phosphorylated cyclic-AMP-responsive element-binding protein 1*) et p300 sur son promoteur, et ce indépendamment d'Eomes connu pour réguler ce gène<sup>367,427</sup>. En corrélation avec ces observations, la diminution de la capacité de cytolysse des LTe CD8<sup>+</sup> n'exprimant pas N2 a été confirmée *in vivo*. Des études de promoteurs mutés et/ou tronqués avec des gènes reporters ont montré que les sites de liaison RBPJ $\kappa$  et CRE (*AMP-responsive element*) sont tous deux nécessaires à la transcription maximale du gène de la granzyme B suggérant une collaboration entre la voie de signalisation Notch et CREB<sup>427</sup>. CREB est un facteur de transcription qui peut être phosphorylé (Ser133) par plusieurs kinases (PKA, MAPK, CaMK (*Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependant protein kinases*)) suite à de nombreux stimuli (hormones, facteurs de croissances) afin d'induire la transcription de différents gènes<sup>465</sup>. Plus récemment, le groupe de Yasutomo a démontré que l'expression de N2 sur les LT CD8<sup>+</sup>, mais pas N1, jouait un rôle important dans l'élimination de cellules tumorales EG7 (thymomes EL4 exprimant OVA). En effet, la délétion de N2 chez les LT CD8<sup>+</sup> (souris N2<sup>fl/fl</sup>-E8I-Cre) diminue la capacité de contrôler EG7 alors que le traitement des LT CD8<sup>+</sup> avec un Ac agoniste de N2 en augmente le contrôle. Finalement, l'injection à proximité de la tumeur de CD dérivées de la moelle osseuse surexprimant Dll1, mais pas J1, accentue aussi la réponse contre EG.7 en augmentant la capacité cytotolytique des LT CD8<sup>+</sup><sup>466</sup>. L'importance du signal via Dll1 dans l'acquisition de l'activité cytotolytique a aussi été démontrée dans des modèles d'allogreffes. D'abord, suite à la transplantation d'un cœur BALB/c dans une souris C57BL/6, il y a augmentation de l'expression de Dll1 chez les CD et les macrophages. L'injection d'un Ac bloquant Dll1 en combinaison avec un Ac activant CTLA augmente la survie des souris lors de ces greffes cardiaques grâce à une diminution de la fréquence et de l'activité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup><sup>448</sup>. En accord avec ces données, l'injection de CD BALB/c surexprimant Dll1 dans des souris sur fond C57BL/6 augmente la production de granzyme B par les LT CD8<sup>+</sup><sup>427</sup>. Dans un modèle de GHVD aigue (transfert moelle osseuse de souris C57BL/6 dans des souris Balb/C) où l'inhibition de Notch est spécifique de la signalisation canonique et aux LT (ROSA26<sup>DNMAMLf</sup>-CD4-cre, RBPJ $\kappa$ -CD4-Cre) les résultats diffèrent quelque peu. Dans ce modèle, les LT CD8<sup>+</sup> sécrètent moins d'IFN- $\gamma$  et expriment fortement PD-1 mais maintiennent leur activité cytotoxique<sup>433,455</sup> suggérant une sécrétion de granzyme B

intacte ou l'induction de l'apoptose par une autre voie comme Fas. D'autres effet de l'inhibition du signal canonique de Notch ont été observé soit une absence de variation sur l'expression de T-bet et une augmentation de l'expression d'Eomes<sup>433,455</sup>. De plus, contrairement au modèle de greffes cardiaque, chez les souris DNMA1 ou N1 KO (N1<sup>fl/fl</sup>-CD4-Cre) il y augmentation des LT CD8 présents 21 jours post induction de la GVHD<sup>456</sup>. Le récepteur N1, le ligand Dll4 et dans une moindre mesure le ligand Dll1, sont responsable des phénotypes observés<sup>456</sup>. Les différences obtenues en inhibant la signalisation canonique et l'interaction Notch suggère qu'il existe une fonction Notch indépendante de la signalisation via le NICD.

Le rôle de la voie de signalisation de Notch a aussi été étudié chez les LT CD8<sup>+</sup> humain. Le groupe d'Unge démontre que des CD dérivés de monocytes (moCD) isolés du sang périphérique, stimulés durant 6h avec du LPS, expriment Dll1, Dll4 et J1 mais pas Dll3 et J2. Les LT CD8<sup>+</sup> isolés du sang périphérique, stimulés durant 4 jours avec des billes anti-CD3/anti-CD28 expriment les récepteurs N1 et N2. Ainsi, chez l'humain, une signalisation via Notch est aussi possible entre les CPA et les LT CD8<sup>+</sup>. Des expériences de cocultures *in vitro* où des LT CD8<sup>+</sup> spécifique de Mart-1 (isolés de donneurs sains) sont stimulés avec des moCD chargés avec leur Ag spécifique (MART-1<sub>26-35</sub>) montrent que l'inhibition de la voie de signalisation Notch par un GSI ou un Ac anti-Dll4 diminue la prolifération ainsi que la production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et de granzyme B<sup>467</sup>. Ces premières données chez l'humain sont en accord avec la majorité des résultats obtenus chez la souris renforçant la pertinence et la validité de ces études. Globalement, les études démontrent un rôle de la voie de signalisation Notch dans la régulation de certains facteurs de transcription comme Eomes, la cytotoxicité (production de perforine et de granzyme B) ainsi que la sécrétion de cytokines (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ). Toutefois une analyse de l'effet de la délétion de Notch sur les différentes populations de LTe CD8<sup>+</sup> générés et la formation de LTm suite à une immunisation *in vivo* n'a pas été réalisée. Puisque la voie de signalisation Notch influence l'expression de facteurs de transcription régulant la différenciation en SLEC et en MPEC, il est probable que des différences dans ses populations soient observées influençant aussi la génération de LTm.

Une importante question persiste par rapport au rôle de la voie de signalisation Notch dans leur activation périphérique : quelle est l'identité et la niche des cellules exprimant les ligands de Notch afin de fournir ce signal aux LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> lors de leur activation périphérique? Il a été démontré que les CD expriment différents profils des ligands de Notch suite à leur activation par différents signaux dangers (LPS, prostaglandine)<sup>449</sup> ou suite à leur infection par le virus de la dengue<sup>468</sup>. Très peu de données sont disponibles quant à l'expression des ligands de Notch sur les CD suite à une infection. Il a très récemment été démontré que les CD migratoires et les macrophages alvéolaires exprimaient les ligands de Notch suite à une infection avec influenza<sup>464</sup>. Puisque les CD expriment des ligands de Notch suite à leur activation par un signal danger et que les LT augmentent l'expression des récepteurs Notch suite à la reconnaissance de leur Ag spécifique, il est possible que les CD au moment de l'activation donnent le signal Notch. Cependant, les LT maintiennent l'expression des récepteurs durant plusieurs jours leur permettant de recevoir un signal Notch provenant de toutes les cellules avec lesquelles ils interagiront durant leur migration vers les sites infectés. D'ailleurs, le signal Notch est requis pour la différenciation de T<sub>FH</sub><sup>469</sup> et il a très récemment été démontré que les cellules stromales, principalement les fibroblastes folliculaires, exprimant Dll4 au sein des ganglions sont nécessaires pour leur fournir ce signal Notch<sup>470</sup>. Cette nouvelle information indique que les CPA ne sont pas nécessairement la principale source de ligands pour les LT lors de leur activation périphérique.

## 1.5 Raisonnement et hypothèses

Afin de développer des vaccins efficaces contre des maladies incurables, une meilleure compréhension des mécanismes de la réponse des LT CD8<sup>+</sup> est nécessaire. L'objectif général de mon doctorat était d'étudier les signaux importants pour le développement des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs et mémoires. La question a d'abord été abordée du point de vue des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Nous avons émis l'hypothèse que différentes CPA peuvent activer les LT CD8<sup>+</sup> si elles fournissent les trois signaux d'activation (présentation de l'Ag, expression des molécules de costimulation et sécrétion de cytokines). Vu leur potentiel d'utilisation comme source alternative de CPA en immunothérapie, nous avons choisi d'étudier la capacité des cellules B activées via le CD40 (CD40-B) à présenter l'antigène aux LT CD8<sup>+</sup> afin d'induire une réponse effectrice et mémoire. Ces CD40-B ont été comparés aux cellules dendritiques (CD) dérivées de la moelle osseuse dont les capacités d'activation des LT CD8<sup>+</sup> sont reconnues. La capacité des CD40-B à activer les LT CD8<sup>+</sup> a été démontrée *in vitro* et *in vivo*, mais n'avait pas été caractérisée de façon convaincante *in vivo*<sup>40,92,113,121,124,125</sup>. Comme les CD40-B expriment le CMH I, le CMH II et les molécules de costimulation et sécrètent des cytokines<sup>35,93</sup>, elles devraient activer efficacement les LT CD8<sup>+</sup> *in vivo*. Par rapport aux CD, les CD40-B présentent l'avantage qu'ils peuvent être obtenus facilement à partir du sang humain et amplifiés massivement *in vitro* pour en obtenir une énorme quantité<sup>40,108,109</sup>. L'étude des CD40-B comme CPA s'avère donc pertinente et nécessaire. Mon premier objectif a été de comparer la capacité des CD40-B et des CD à activer les LT CD8<sup>+</sup> *in vivo*. Les résultats de ces travaux sont présentés dans un premier article *CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naïve CD8<sup>+</sup> T cells to generate effector but not memory cells* publié dans le journal PLoS One. Par différentes approches, nous avons tenté d'identifier les signaux manquant empêchant la formation de mémoires. Certaines de ces données sont non publiées, mais seront décrites ou présentées en annexe et intégrées à la discussion.

Parmi les signaux fournis par les CPA au moment de la reconnaissance antigénique, nous proposons que la voie de signalisation Notch influence le développement des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs, mais aussi celui des LT CD8<sup>+</sup> mémoires en instaurant un programme génétique

particulier. Plusieurs études démontrent un rôle de la voie de signalisation Notch dans l'acquisition des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup>. Cependant, peu d'études en modèles d'immunisation ou d'infections ont été réalisées<sup>427,428,433,447,448,455,456,463,466,467</sup>. Il a été démontré que les récepteurs Notch sont présents à la synapse immunologique<sup>344,424,430</sup>. De plus, l'expression des récepteurs Notch est augmentée rapidement suite à la reconnaissance de l'Ag<sup>427,447,463</sup>, il peut donc y avoir une interaction avec les ligands présents sur les CPA. La voie de signalisation Notch a donc le potentiel d'influencer l'expression de gènes suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup>. Comme Notch joue un rôle dans les choix de différenciation et régule l'expression de T-bet et Eomes, il est légitime de croire que Notch régulera la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs en influençant la proportion des SLEC et des MPEC et, conséquemment, affectera la génération et la survie des mémoires. Comme la voie de signalisation Notch régule la transcription de gènes codant pour la perforine, la granzyme B ou l'IFN- $\gamma$ <sup>427,428</sup>, il est fort probable que cette voie contribue à la fonctionnalité des LTe et des LTm. Il est particulièrement pertinent d'étudier le rôle de Notch sur la génération de LT CD8<sup>+</sup> mémoires car cette question n'a jamais été abordée. Mon second objectif a donc été d'élucider le rôle de la voie de signalisation Notch dans la réponse des LT CD8<sup>+</sup>. Pour déterminer le rôle de la signalisation Notch dans les moments précoces suivant l'activation des LT CD8<sup>+</sup>, nous avons réalisé plusieurs expériences *in vitro* qui ont permis de publier l'article *Notch signalling regulates PD-1 expression during CD8<sup>+</sup> T-cell activation* dans le journal *Immunology and Cell Biology*. Grâce à nos souris où N1 et N2 sont délétés seulement chez les LT CD8<sup>+</sup> (N1<sup>fl/fl</sup> N2<sup>fl/fl</sup>-E8I-cre), nous avons démontré un rôle de la voie de signalisation Notch dans la réponse effectrice et mémoire des LT CD8<sup>+</sup> suite à une infection avec *Lm* et l'immunisation avec des CD. Ces travaux seront soumis prochainement. L'article sera intitulé *Context dependent role for the Notch signalling pathway during CD8<sup>+</sup> T cell response*.

De façon concise, les hypothèses de ma thèse sont les suivantes :

1. L'immunisation avec les CD40-B, qui expriment le CMH I, le CMH II et les molécules de costimulation et sécrètent des cytokines, devrait activer les LT CD8<sup>+</sup> *in vivo* aussi efficacement que l'immunisation avec les CD.
2. Parmi les signaux donnés au moment de l'activation, la voie de signalisation de Notch jouerait un rôle unique dans le développement et la fonctionnalité des LT effecteurs

mais aussi des LT mémoires en régulant la transcription de différents gènes responsables des fonctions effectrices (*perforine*, *gzmb*, *ifn $\gamma$* ) et de facteurs de transcription (*Tbx21* et *Eomes*).

Les objectifs de ma thèse sont de :

1. Comparer la capacité des CD40-B et des CD à activer les LT CD8<sup>+</sup> *in vivo*.
2. Élucider le rôle de la voie de signalisation Notch dans la réponse des LT CD8<sup>+</sup>.

## Résultats

### **Article I. CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naïve CD8<sup>+</sup> T cells to generate effector but not memory T cells**

**Mélissa Mathieu<sup>\*†</sup>, Natacha Cotta-Grand<sup>\*†</sup>, Jean-François Daudelin<sup>\*</sup>, Salix Boulet<sup>\*†</sup>, Réjean Lapointe<sup>‡§</sup> and Nathalie Labrecque<sup>\*†§1</sup>**

Cet article est publié dans le journal PLoS ONE, vol 7, e30139, doi: 10.1371 (2012)

Cet article m'a permis de rencontrer le premier objectif de ma thèse soit de comparer la capacité des cellules B activées via le CD40 et des cellules dendritiques à activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> *in vivo*. Voici les contributions détaillées de chacun des auteurs. D'abord, j'ai conçu chacune des expériences décrites dans cet article. Bien sûr, j'ai eu de judicieux conseils de N. Labrecque, R. Lapointe et N. Cotta-Grand (contribution conceptuelle de 80-85 %). J'ai aussi réalisé la majorité des expériences dans cet article (contribution technique de 95 %). Durant les journées surchargées, N. Cotta-Grand, J.-F. Daudelin et S. Boulet m'ont aidé afin d'optimiser le temps et de minimiser les risques d'erreurs. Cependant, c'est principalement moi qui ai planifié, dirigé et analysé ces expériences. J'ai aussi écrit le premier jet de cet article. Même s'il a largement été modifié par N. Labrecque, mes idées y sont présentes (contribution de 35-40 % à l'écriture). Finalement, c'est moi qui ai assemblé et soumis le papier. Tous les auteurs de ce papier ont contribué à la réflexion et à l'intégration des résultats de ce papier.

**CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naïve CD8<sup>+</sup> T cells to generate effector but not memory T cells**

**Mélissa Mathieu<sup>\*†</sup>, Natacha Cotta-Grand<sup>\*\*†</sup>, Jean-François Daudelin<sup>\*</sup>, Salix Boulet<sup>\*\*†</sup>, Réjean Lapointe<sup>‡§</sup> and Nathalie Labrecque<sup>\*†§1</sup>**

<sup>1</sup>Corresponding author: Nathalie Labrecque

## ABSTRACT

*Background:* The identification of the signals that should be provided by antigen-presenting cells (APCs) to induce a CD8<sup>+</sup> T cell response *in vivo* is essential to improve vaccination strategies using antigen-loaded APCs. Although dendritic cells have been extensively studied, the ability of other APC types, such as B cells, to induce a CD8<sup>+</sup> T cell response have not been thoroughly evaluated.

*Methodology/Principal findings:* In this manuscript, we have characterized the ability of CD40-activated B cells, stimulated or not with Toll-like receptor (TLR) agonists (CpG or lipopolysaccharide) to induce the response of mouse naïve CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo*. Our results show that CD40-activated B cells can directly present antigen to naïve CD8<sup>+</sup> T cells to induce the generation of potent effectors able to secrete cytokines, kill target cells and control a *Listeria monocytogenes* infection. However, CD40-activated B cell immunization did not lead to the proper formation of CD8<sup>+</sup> memory T cells and further maturation of CD40-activated B cells with TLR agonists did not promote the development of CD8<sup>+</sup> memory T cells. Our results also suggest that inefficient generation of CD8<sup>+</sup> memory T cells with CD40-activated B cell immunization is a consequence of reduced Bcl-6 expression by effectors and enhanced contraction of the CD8<sup>+</sup> T cell response.

*Conclusions:* Understanding why CD40-activated B cell immunization is defective for the generation of memory T cells and gaining new insights about signals that should be provided by APCs are key steps before translating the use of CD40-B cell for therapeutic vaccination.

## INTRODUCTION

T cells recognize via their specific T cell receptor (TCR) a peptidic fragment of the antigen (Ag) in association with MHC molecules presented at the surface of Ag-presenting cells (APCs). Following Ag encounter, T cells undergo massive proliferation and differentiate into effector T (Te) cells. After elimination of the pathogen or tumor, most Te cells die by apoptosis while a few differentiate into memory T (Tm) cells providing long term protection against re-infection or tumor relapse. The success of vaccination is dependent on the generation and long-term maintenance of functional Ag-specific Tm cells. However, little is known about the signals that should be provided by APCs to promote Tm cell development.

Efficient priming of naïve CD8<sup>+</sup> T cells depends on the provision by APCs of three key signals to T cells. First, APCs should present, embedded in their major histocompatibility complex (MHC) class I molecules, a peptidic fragment of the Ag. Second, co-stimulation via CD80 and CD86 expressed by APCs is essential to induce naïve CD8<sup>+</sup> T cell response. Third, inflammatory signals, such as interleukin (IL)-12 or type I interferons (IFNs), are necessary to induce an optimal response of CD8<sup>+</sup> T cells [1]. Furthermore, several other molecules expressed by APCs have been shown to influence CD8<sup>+</sup> T cell response. Among those, cytokines, costimulatory molecules of the tumor necrosis factor (TNF) family, Notch ligands and adhesion molecules have been shown to play a role at different stages of the T cell response. However, the exact signals that should be provided by APCs to induce efficient generation of CD8<sup>+</sup> Tm cells are still unknown. This knowledge is crucial to improve vaccination strategy and to better define the type of APCs that should be used for therapeutic vaccination.

Several studies have shown that vaccination with Ag-pulsed dendritic cells (DCs) is very efficient to promote the development of functional and long-lived CD8<sup>+</sup> Tm cells [2,3]. Very interestingly, CD8<sup>+</sup> Tm cell generation is accelerated with DC vaccination when compared to immunization with live pathogens [2]. This is mostly due to the low level of inflammation that promotes the formation of memory precursor effector cells (MPECs) expressing high level of CD127 and low level of KLRG1 [2-4]. The excellent Ag presentation capability of DCs and their powerful ability to prime naïve T cells have put these cells at the

forefront of therapeutic vaccination strategies to treat cancer or infected patients. However, this approach has not been extremely successful yet. Furthermore, DCs are present in very low number in peripheral blood which limits their use [5]. Therefore, investigating the ability of other more abundant APC types, such as activated B cells, to induce a CD8<sup>+</sup> T cell response might help to design better vaccination strategy and to gain knowledge about the signals that APCs should provide for the development of CD8<sup>+</sup> Tm cells.

Little is known on the potential of other APCs, such as B cells, to induce the generation of Te and Tm cells. Previous studies have shown that immunization with naïve resting B cells induce T cell unresponsiveness in naïve CD4<sup>+</sup> [6-12] and CD8<sup>+</sup> T cells [11]. This tolerance induction probably results from poor expression of co-stimulatory molecules by naïve B cells. Although activation of B cells with LPS induced expression of CD80 and CD86, this was not sufficient to induce T cell priming [11,13] indicating that other signals should be provided to B cells. More recent studies have shown that human CD40-activated B (CD40-B) cells are very good at inducing Ag-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell response *in vitro* [14-17]. Indeed, these CD40-activated B cells express high levels of co-stimulatory ligands, major histocompatibility (MHC) class I and class II molecules [14,18,19], CD62L and have the ability to migrate to secondary lymphoid organs [19-21]. These characteristics suggest that these cells might be very efficient to induce the response of naïve CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo*. In addition, the possibility to expand these cells in large number from peripheral blood [20] renders them even more attractive to use in vaccination protocol.

In this manuscript, we have characterized the ability of CD40-B cells, stimulated or not with Toll-like receptor (TLR) agonists to induce the response of naïve CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo*. Our results show that CD40-B cells can directly present Ag to naïve CD8<sup>+</sup> T cells to induce the generation of potent effectors able to secrete cytokines, kill target cells and control a *Listeria monocytogenes* (Lm) infection. However, CD40-B cell immunization did not lead to the proper formation of CD8<sup>+</sup> Tm cells. Although maturation of CD40-B cells with TLR agonists increased the number of Ag-specific T cells generated it did not promote the development of CD8<sup>+</sup> Tm cells. Understanding why CD40-B cell immunization is defective

for the generation of T<sub>m</sub> cells and gaining new insights about signals that should be provided by APCs are key steps before translating the use of CD40-B cell for therapeutic vaccination.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Mice*

B6SJL, C57BL/6 and OT-1 [22] mice were bred at the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center facility. B<sub>m</sub>1 mice (B6.C-H2K<sup>b<sub>m</sub>1</sup>/ByJ) were purchased from the Jackson Laboratory. Mice were housed in a pathogen-free environment and treated in accordance to the Canadian Council on Animal Care guidelines. Our animal protocol (number: 2007-36) was approved by the Hospital Maisonneuve-Rosemont Council on Animal Care.

### *B cell and DC cultures*

For B cell culture, lymphocytes were isolated on a FICOLL gradient from male C57BL/6 or B6SJL spleen followed by a 4 days culture on irradiated fibroblasts stably transfected with the CD40L cDNA (3T3-CD40L) [23] to generate CD40-B cells. Bone-marrow derived DC were generated as previously described [3]. The day before harvesting, lipopolysaccharide (LPS) (1 µg/ml) or CpG-DNA (2mM) was added to cultures. The ovalbumin (OVA)<sub>257-264</sub> peptide (SIINFEKL) or an irrelevant peptide (SIYRYYGL) (Midwest biotech) was loaded overnight on DCs (2 µg/ml) and B cells (4 µg/ml) on the last day of culture.

### *Immunization and analysis of T cell response*

Two days after adoptive transfer of 10<sup>6</sup> OT-1 T cells (CD45.2<sup>+</sup>; from female mice) into female B6SJL mice (CD45.1<sup>+</sup>), recipients were immunized i.v. with 0.5-2 X 10<sup>6</sup> DCs or 2-6 X 10<sup>6</sup> CD40-B cells (from male mice to induce a CD4 T cell response against the male minor histocompatibility antigen HY [24]) as indicated in figure legends. The presence of T<sub>e</sub> (d4 post-immunization) and T<sub>m</sub> (d30/45 post-immunization) cells were evaluated in the same mouse by sequential removal of superficial lymph nodes as described previously [3]. The presence of T<sub>m</sub> cells in tertiary sites and effector functions were analyzed as previously described [3]. T<sub>e</sub> and T<sub>m</sub> cells were identified by flow cytometry as being CD8<sup>+</sup> and CD45.2<sup>+</sup>.

For immunization of Bm1 mice,  $5 \times 10^6$  CFSE-labelled OT-1 T cells were adoptively transferred in the morning and immunization were realized at least 5h later. Mice were immunized either with  $6 \times 10^6$  CD40-B cells or  $2 \times 10^6$  DC matured with LPS and loaded or not with OVA<sub>257-264</sub>. OVA-specific T cells were identified using K<sup>b</sup>-OVA tetramer staining.

#### *Abs, cytometry, and cell sorting*

Anti-CD86 (GL-1), -CD8 (53-6.7), -Ly6C (AL-21), CD122 (5H4) and -Bcl-2 (A19-3) were purchased from BD Biosciences. Anti-H2-K<sup>b</sup> (AF6-88.5), -CD40 (IC10), -CD45.2 (104), -CD44-APC-Cy7 (1M7), -CD8 (53-6.7), CD19 (6D5), -CD11c (N418), -NK1.1 (PK136), CD27 (LG.3A10), CD80 (16-10A1), CD43 (1B11) and -IL-2 (JES6-5H4) were purchased from Biolegend. Anti- I-A<sup>b</sup> (28-16-8S), -CD62L (MEL-14) and -CD11b (M1/70.15) were purchased from Caltag Laboratories. Anti-CD127 (A7R34), -Eomes-Alexa-647 (Dan11mag) and -granzyme B-PE (16G6) were purchased from eBioscience. Anti-Bcl-6-PE (7D1) and -T-bet-PE (4B10) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-IFN- $\gamma$ -FITC (XMG1.2) was purchased from Invitrogen. OVA peptide loading on K<sup>b</sup> MHC was measured by staining with the 25-D1.16 Ab [25] followed by staining with a rat anti-mouse IgG1-PE (A85-1) antibody purchased from BD Bioscience. The H2K<sup>b</sup>-OVA monomers were purchased from CANVAC tetramer core facility and tetramers were generated using extravidin-PE. Cell surface stainings and intracellular stainings for cytokine were performed as previously described [3,26]. Bcl-6 and Eomes intracellular stainings were performed with the FoxP3 kit from eBioscience while T-bet staining was done with the cytofix/cytoperm kit from BD Bioscience. For Bcl-2 staining, cells were stained for 30 minutes in 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) and washed twice without saponin before cell surface staining. In some experiments, CD40-B LPS cells were sorted before immunization. Cells were stained with anti-CD11b, anti-NK1.1 and anti-CD11c Abs. Negative cells (B cells) were sorted on a FACSVantage and injected into mice.

#### *In vivo killing assay*

At d4 post-immunization, equal numbers ( $10^7$ ) of B6.SJL splenocytes loaded or not with the OVA peptide and differentially stained with CFSE (250 nM or 25 nM respectively) were injected i.v. into immunized mice. 4h later, the percentage of *in vivo* killing was

determined as described previously [27]. The percentage of specific lysis was calculated as follows: ratio = (percentage CFSE low / percentage CFSE high), and percentage of specific lysis = [1-(ratio unprimed / ratio primed)] x 100.

#### *Listeria monocytogenes (Lm) challenge*

Lm was grown as previously described [28]. One lethal dose (10<sup>5</sup> bacteria) of Lm expressing OVA was injected i.v. Three days post-infection, spleen and liver were harvested, homogenized, diluted and plated onto brain heart infusion (BHI) plates containing streptomycin. After 24h of incubation at 37°C, CFU/g of organ was determined.

#### *Quantitative real-time PCR*

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen). RNA were reverse transcribed into cDNA using Superscript II with oligo(dT) primers (Invitrogen) as previously described [26]. Real-time PCR were performed in triplicates using SYBR Green (Invitrogen) on an Applied Biosystems 7500 Real Time PCR system. PCR was performed with mouse Blimp-1 primers: forward, 5'-ACA CAC AGG AGA GAA GCC ACA TGA-3' and reverse, 5'TCG AAG GTG GGT CTT GAG ATT GCT-3'. The primers for the internal control hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) were: forward, 5'-CTC CTC AGA CCG CTT TTT GC-3' and reverse, 5'-TAA CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC-3' [29]. The  $\Delta$ CT value for each sample was determined by calculating the difference between the CT value of the target and the CT value of the endogenous reference gene (HPRT). Then, the  $\Delta\Delta$ CT value for each sample was determined by subtracting the mean of  $\Delta$ CT value of the sample from the  $\Delta$ CT value of a reference sample composed of cDNA from brain, thymus, spleen, activated splenocytes (anti-CD3 and anti-CD28), EL4 cell line, D011.10 cell line and SAMBOK cell line. The relative level of target gene expression was calculated using  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

#### *Statistical analysis*

Statistical analyses for differences between groups were performed using one-way ANOVA followed by Games-Howell post-tests (3 experimental groups or more) or Student's

T-test (two experimental groups). Data are presented as mean +/- SEM. All tests were two-sided and  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### *CD40-B cell immunization efficiently generates effector CD8<sup>+</sup> T cells but not memory*

We tested if activation of B cells with CD40L and further maturation with different TLR agonists generated APCs able to induce an *in vivo* CD8<sup>+</sup> T cell response. Splenocytes were activated and expanded on fibroblasts expressing CD40L and then LPS or CpG DNA was added to stimulate TLR4 or TLR9 respectively (hereafter referred to as CD40-B LPS and CD40-B CpG). CD40 engagement on B cells resulted in up-regulation of the costimulatory molecules CD80 and CD86 but CD40-B LPS cells bore a greater activated state when compared to CD40-B and CD40-B CpG cells. (Figure 1 and Figure S1). The expression of CD62L and CD40 was similar in all conditions (Figure 1 and Figure S1). Furthermore, the expression of Kb and I-Ab MHC molecules was comparably up-regulated in the three groups of CD40-B cells (Figure 1 and Figure S1).

Next, we evaluated the ability of our different CD40-B cell cultures to prime CD8<sup>+</sup> T cell response *in vivo*. To do so, we adoptively transferred  $10^6$  naïve OVA-specific OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells followed by immunization with  $2 \times 10^6$  CD40-B, CD40-B CpG or CD40-B LPS cells pulsed with the OVA peptide. As shown in Figure S1, peptide loading was equivalent in the three groups of CD40-B cells. To provide T cell help, an endogenous anti-male response by CD4<sup>+</sup> T cells was generated by immunizing female recipients, transferred with female OT-1 T cells, with male APCs. The CD8<sup>+</sup> T cell response obtained after CD40-B cell immunization was always compared to the one obtained with LPS-activated DCs. Our results show that immunization with CD40-B cells allows for the generation of CD8<sup>+</sup> Te cells (Figure 2A and B). However, CpG or LPS activation of CD40-B cells increases the number of Te cells (Figure 2A and B), although 2-fold less than DC immunization. We were also able to induce the response of endogenous CD8<sup>+</sup> T cells (without the adoptive transfer of OT-1 T cells) to OVA using tetramer staining following CD40-B cell immunization (Figure S2).

Most strikingly, CD40-B cells matured or not with TLR ligands were almost always unable to induce CD8<sup>+</sup> Tm cell development while DC immunization led to efficient CD8<sup>+</sup> Tm cell generation (Figure 2A-D). Similar results were obtained in the spleen, peritoneum and bone marrow (not shown). The lack of Tm cell generation with CD40-B cell immunization is not a consequence of the reduced number of Te cells generated since Tm cells were also efficiently generated when we immunized with less DCs (Figure S3), which led to the production of less effectors. In few experiments, some CD8<sup>+</sup> Tm cells were generated following CD40-B cell immunization. However, the yield of Tm cell generation was always very low (Figure 2C). None of the mice immunized with CD40-B LPS or CD40-B CpG cells developed significant number of Tm cells (at least 5% of effectors; Figure 2D) while a very low proportion of mice immunized with CD40-B cells did. These results show that TLR stimulation of CD40-B cells enhanced their *in vivo* priming potential which leads to an increased number of Ag-specific effectors but this was not sufficient to promote CD8<sup>+</sup> Tm cell generation. Furthermore, we have challenged a cohort of mice where Tm cell generation was below the detection limit with Lm to confirm the lack of Tm generation. Thirty days post-immunization with CD40-B LPS cells, mice were not protected from Lm infection as shown by bacterial counts in the spleen and liver (Figure 2E and F). Notwithstanding, the few Tm cells that were generated in some experiments were functional as shown by their rapid recall response when challenged with Ag-pulsed DCs (Figure S4).

We have previously shown that the density of epitope presented by DCs critically affects the yield of CD8<sup>+</sup> Tm cell generation [30]. Therefore, we have carefully compared the level of Kb-OVA complexes at the surface of CD40-B cells and DCs. As shown, in Figure S1 and S5, CD40-B cells express a higher density of epitope than DCs. To definitively rule out that CD40-B cells were not presenting enough Ag, we have immunized mice with CD40-B cells loaded with more peptide and showed that this did not ameliorate the formation of CD8<sup>+</sup> Tm cells (Figure S5).

### *CD40-B cells directly present Ag to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in vivo*

At the end of the culture, we obtained an almost pure population of B cells (~95%) with few contaminating CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> and NK1.1<sup>+</sup> cells (less than 1-2% for each population). To rule out the possibility that contaminating cells contributed to the *in vivo* priming of OT-1 T cells, we sorted B cells from the CD40-B LPS cell culture before immunization. The sorted and unsorted CD40-B LPS cells were as efficient in generating CD8<sup>+</sup> Te cells at d4 post-immunization (Figure 3A). These results suggest a direct priming of CD8<sup>+</sup> T cells by CD40-B LPS cells, but we could not exclude that B cells were providing the OVA peptide to endogenous APCs for cross-presentation. To rule out this possibility, we used Bm1 mice which express a variant of the MHC class I molecule H2-K<sup>b</sup>. The H2-K<sup>b</sup><sup>Bm1</sup> molecule has 3 amino acid substitutions in residues involved in peptide binding and TCR interaction rendering this molecule unable to present the OVA peptide to OT-1 T cells [31,32]. Therefore, APCs from Bm1 mice are unable to cross-present the OVA peptide to the transferred OT-1 T cells allowing us to test if CD40-B cells can directly present the Ag and prime naïve CD8<sup>+</sup> T cells. Unfortunately, this mutation is sufficient to induce rejection of transferred OT-1 T cells within 2 to 3 days [33]. To bypass this problem, we transferred into C57BL/6 or Bm1 mice 5 X 10<sup>6</sup> CFSE labeled OT-1 T cells in the morning followed by LPS-stimulated CD40-B cell or DC immunization in the afternoon. CFSE dilution 2d post-immunization in the spleen demonstrates that the Ag is directly presented by the injected CD40-B cells (Figure 3B). All OT-1 T cells in the Bm1 mice have proliferated, suggesting that CD40-B cells can directly present Ag to naïve CD8<sup>+</sup> T cells.

### *CD40-B cell or DC vaccination generates similar effectors*

To understand why CD40-B cell immunization does not lead to memory generation, we have characterized Te cell phenotype. Te cells generated following CD40-B cell or DC immunization have a similar phenotype (Figure 4A and Figure S6). The level of expression of CD44, CD62L, CD27, CD122 and 1B11 were similar in the different groups indicating equivalent activation of CD8<sup>+</sup> effectors following CD40-B cell or DC immunization (Figure 4A). We observed a slightly lower expression of CD127 (IL-7 receptor  $\alpha$  chain) by effectors generated following immunization with CD40-B cells compared to DCs. Since high level of CD127 expression identifies the effectors that generate memory T cells, we have further

evaluated if there was a positive correlation between the level of expression of CD127 and the yield of memory T cells. As shown in Figure 4B, there is no correlation between CD127 expression and the percentage of Tm cells generated for both CD40-B cell and DC immunizations. The lack of correlation is not surprising since more than 75% of the effectors have maintained a high level of CD127 expression (Figure S7). Therefore, it is very unlikely that the deficiency of Tm cell generation with CD40-B cell vaccination is due to lower level of CD127. In our immunization conditions, we did not obtain any increase in KLRG1 expression, a marker used to identify short-lived effectors (SLECs) in inflammatory models (not shown) [4,34]. Due to low inflammation, most of our Te cells bear a MPEC phenotype [4]. Therefore, the cell surface phenotype of effectors generated after B cell immunization does not explain the poor generation of CD8<sup>+</sup> Tm cells.

To better characterize the potential of CD40-B cell vaccination, we evaluated effector functions of OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells at the peak of the response. Te cells generated after B cell or DC immunization produce similar amounts of IL-2 (Figure 5 and Figure S6). All types of immunization led to IFN- $\gamma$  production by effectors but CD40-B CpG cell vaccination induces higher production of IFN- $\gamma$  than immunization with CD40-B LPS cells (Figure 5 and Figure S6). However, granzyme B production is lower following CD40-B cell immunization (Figure 5 and Figure S6) but this is only statistically significant for CD40-B LPS cell immunization.

#### *CD40-B cell immunization generates cytotoxic effectors*

The lower level of granzyme B production by CD8<sup>+</sup> Te cells obtained after CD40-B cell vaccination led us to evaluate their ability to kill target cells *in vivo*. At d4 post-immunization, mice were injected with OVA loaded target cells and specific lysis was measured 4h later. Te cells generated with CD40-B cell vaccination have a reduced ability to kill target cells when compared to the one obtained with DC immunization (Figure 6 A and B). The reduced cytotoxic activity of Te cells generated after CD40-B cell immunization could

be a result of their lower frequency when compared to DC immunization (Figure 2). Thus, CD40-B cell immunization generates functional cytolytic effectors.

#### *Effectors are able to control a bacterial infection*

To further assess the functionality of Te cells following CD40-B cell vaccination, we have measured their ability to control a Lm infection. Four days post-immunization, mice were challenged with one lethal dose of virulent Lm expressing OVA (Lm-OVA). Immunization with both CD40-B LPS cells or DCs led to a 4 log decrease in the spleen bacterial burden at d3 post-infection (Figure 6C). Effectors generated with DC vaccination seem better than those obtained with CD40-B cells to control Lm spreading in the liver (Figure 6D). Again, we cannot rule out the possibility that this is caused by the lower number of Te cells produced with CD40-B cell immunization. Furthermore, both types of Te cells expanded to the same extent following infection with Lm-OVA indicating that CD40-B cells do not induce T cell tolerance (Figure S8).

#### *Enhanced contraction and reduced Bcl-6 expression by effectors following CD40-B cell immunization*

Our results clearly show that both DC and CD40-B cell immunizations generate fully functional CD8<sup>+</sup> effectors and that only Tm cell generation is impaired following CD40-B cell vaccination. To further address why effectors generated with CD40-B cell immunization did not differentiate into Tm cells, we have evaluated the extent of T cell contraction. As shown in Figure 7A, CD8<sup>+</sup> Te cells generated with CD40-B cell immunization have a higher rate of contraction than the one generated with DC immunization. Moreover, at day 10 post-immunization, CD8<sup>+</sup> Te cells obtained with CD40-B cells were already almost undetectable (Figure 7A). The enhanced contraction of effectors generated with CD40-B cell immunization is not due to a lower expression of Bcl-2 (Figure 7B).

The transcriptional network controlling CD8<sup>+</sup> Tm cell generation has been partially elucidated over the last years. During CD8<sup>+</sup> T cell response to infection, the effectors (short-lived effectors or SLECs) that will die by apoptosis expressed high level of the transcription factor T-bet while MPECs express lower amount of T-bet [4]. The level of

expression of the transcription factor Eomes inversely correlates with the level of T-bet suggesting that high level of Eomes are necessary to promote MPEC development and Tm cell formation [29,35,36]. Furthermore, Eomes expression is needed for CD8<sup>+</sup> Tm cell self-renewal [37]. Similarly to T-bet, the transcriptional repressor Blimp-1 controls the formation of SLECs and in its absence MPECs are preferentially generated [38,39]. The transcriptional repressor Bcl-6 is required for CD8<sup>+</sup> Tm cell generation but unlike T-bet, Eomes and Blimp-1, it does not contribute to effector formation [40,41]. Furthermore, Blimp-1 represses Bcl-6 expression allowing for the differentiation of SLECs. Therefore, the balance of expression of T-bet, Blimp-1, Eomes and Bcl-6 is crucial for efficient development of CD8<sup>+</sup> Tm cells. To elucidate why CD40-B cell immunization is not efficient to generate CD8<sup>+</sup> Tm cells, we evaluated the expression level of these key transcription factors in Te cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) at the peak of the response (d4 post-immunization). We could not detect any variation in T-bet and Blimp-1 expression in Te cells generated with CD40-B LPS or DC immunization (Figure 8). Moreover, effectors generated with CD40-B cell immunization express higher amount of Eomes (Figure 8), which should be beneficial for CD8<sup>+</sup> Tm cell generation and self-renewal. These results suggest that CD8<sup>+</sup> Te cells that are generated with CD40-B cell immunization are not more terminally differentiated than the ones obtained with DC immunization. However, we consistently observed a 25% reduction in the level of expression of Bcl-6 in effectors obtained after CD40-B cell immunization when compared to DC vaccination (Figure 8). This suggests that CD40-B cells are unable to promote high level of expression of Bcl-6, a key transcription factor involved in the generation of CD8<sup>+</sup> Tm cells, and that this may leads to inefficient differentiation of Te cells into memory cells.

## DISCUSSION

To better understand the signals given by different APCs, we have compared CD8<sup>+</sup> T cell responses generated after CD40-B cell or DC immunization. Our results clearly demonstrate that CD40-B cells can present Ag and activate naïve CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo*. It is not surprising that CD40-B cells can act as efficient APCs *in vivo* since CD40 stimulation leads to the up-regulation of MHC class I and II molecules, CD80 and CD86 co-stimulatory molecules allowing CD40-B cells to present Ag and provide efficient co-stimulation to naïve CD8<sup>+</sup> T cells. Previous reports have shown that B cells are tolerogenic APCs [6-12] but they

used small resting B cells lacking CD80 and CD86 expression, thus explaining why no priming occurs. In our study, we have also investigated if CD40-B cells directly present Ag to CD8<sup>+</sup> T cells or if they only provide Ag for cross-presentation by endogenous APCs. Using Bm1 mice as recipients for vaccination, we clearly show that CD40-B cells directly act as APCs and that cross-presentation by DCs is not necessary to induce a CD8<sup>+</sup> T cell response. Therefore, CD40-B cells are good APCs to prime naïve CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo* opening the potential for their use in vaccination.

When compared to DC, CD40-B cell vaccination generates 2 fold less effectors even after maturation with LPS or CpG. This small difference is not a clinical issue since it could be easily compensated by increasing the number of CD40-B cells used in immunization. In fact, we have observed a similar expansion of Ag-specific CD8<sup>+</sup> T cells when we used 3-4 times more CD40-B cells than DCs (Figure S3). Increasing the number of CD40-B cells in immunization is a relevant solution because it is very easy to generate them in large numbers from small amounts of human blood. Therefore, our results suggest that CD40-B cell immunization can be as good as DC immunization to generate Ag-specific CD8<sup>+</sup> T cells. Our results also show that further maturation of CD40-B cells with TLR agonists, CpG or LPS, increases the number of Ag-specific CD8<sup>+</sup> T cells generated. Therefore, in vaccination protocols, it would be advantageous to activate CD40-B cells with TLR agonists to increase effector generation.

Our results also show that CD40-B cell vaccination is able to induce the proper differentiation of naïve CD8<sup>+</sup> T cells into functional effectors. Only a minor difference was observed at the functional level, as effectors obtained with CD40-B LPS cell immunization produced less granzyme B than those obtained with DC vaccination. Although producing less granzyme B, these effectors were able to kill target cells *in vivo*. This indicates that CD40-B cell vaccination is able to provide all the necessary signals to generate cytolytic effectors. Furthermore, effectors generated with CD40-B cell immunization expressed similar levels of IFN- $\gamma$  and IL-2 when compared to Ag-specific CD8<sup>+</sup> T cells obtained with DC immunization. The production of IFN- $\gamma$  by effectors obtained with CD40-B cell vaccination is very

interesting since IFN- $\gamma$  production correlates positively with clinically effective anti-tumor response [42-52]. Moreover, Te cells generated with CD40-B cell vaccination are able to control a Lm infection. Thus, our results show that CD40-B cell immunization generates functional effectors able to produce IFN- $\gamma$ , to kill target cells and to control bacterial infection. Therefore, the ability of CD40-B cell vaccination to produce potent effectors renders this approach of interest to induce anti-tumor T cell responses in cancer patients.

It is intriguing that CD40-B cell vaccination does not generate T cell memory since most of the Te cells generated have a MPEC phenotype (CD127<sup>hi</sup>KLRG1<sup>lo</sup>). The deficient Tm cell generation is not due to the reduced number of effectors since decreasing the number of Te cells generated with DC immunization still lead to the formation of Tm cells (Figure S3). Therefore, the deficient Tm cell generation suggests that priming with CD40-B cells does not provide all the necessary signals to allow the differentiation of naïve CD8<sup>+</sup> T cells into long-lived memory T cells. Further investigations are needed to understand what is missing in CD40-B cells.

To better understand why CD40-B cell vaccination is not efficient in promoting CD8<sup>+</sup> Tm cell generation, we evaluated the expression of T-bet, Eomes, Blimp-1 and Bcl-6 which are key transcription factors known to influence memory generation and maintenance [4,29,35-39]. No differences were observed in the expression of T-bet and Blimp-1 in Te cells obtained from CD40-B cell and DC immunizations. Since the expression level of these transcription factors control the fate between SLECs and MPECs [29,35,36,38,39,53], our results suggest that Te cells generated with CD40-B cell immunization are not more terminally differentiated than the ones obtained with DC immunization and that defective expression of these transcription factors are not responsible for the poor memory generation that we observed with CD40-B cell vaccination. Although effectors generated following CD40-B cell immunization express higher levels of Eomes, they are not able to differentiate into Tm cells suggesting that high levels of Eomes are not sufficient to promote CD8<sup>+</sup> Tm cell development. However, Te cells generated with CD40-B cell immunization express lower amount of the transcriptional repressor Bcl-6, known to control CD8<sup>+</sup> Tm cell development [40,41], than

effectors generated with DC immunization. Therefore, it is possible that this small (25%) reduction in Bcl-6 expression is responsible for the poor development of CD8<sup>+</sup> Tm cells following CD40-B cell vaccination. Further studies should reveal whether reduced Bcl-6 expression is solely responsible for the lack of CD8<sup>+</sup> Tm cell generation or if improper induction of other transcription factors contributes to defective formation of CD8<sup>+</sup> Tm cells with CD40-B cell immunization.

In our hands, no protection was achieved when mice were challenged with Lm at d30 post-immunization. This is in contrast with the results of Vanden Bush et al [54] reporting successful protection from Lm infection 30d after CD40-B cell vaccination. However, in their manuscript, they only looked at protection and did not enumerate the number of CD8<sup>+</sup> Tm cells generated. It is possible that a very low number of CD8<sup>+</sup> Tm cells are generated with CD40-B cell vaccination rendering their detection difficult. However, it is very clear from our results that in some experiments, but not all, CD8<sup>+</sup> Tm cells are generated and are able to respond to a recall immunization with DCs. Therefore, it is possible that mice will be protected from a Lm challenge when few CD8<sup>+</sup> Tm cells are produced. The difference might also be explained by the protocol used to generate CD40-B cells. Indeed, Bishop's team used CD40-B cells that spent only one day in culture [54] while we used cells cultured for 4 days. We believe that our protocol is closer to what is currently developed for human B cell expansion [15,20]. Thus, it will be essential to determine if the culture regimen impacts the ability of CD40-B cells to activate the immune system.

Although CD8<sup>+</sup> Tm cell generation is not optimal with CD40-B cell vaccination, such an approach might be viable as a vaccination strategy if a boosting regimen is included. Indeed, our preliminary results suggest that it is possible to further re-expand the few Tm cells that were generated in some experiments.

Understanding why CD40-B cell immunization does not promote efficient CD8<sup>+</sup> Tm cell differentiation will help our understanding of the mechanisms regulating CD8<sup>+</sup> Tm cell generation and should allow for improvement of the APC potential of CD40-B cells.

Furthermore, the ability of CD40-B cell vaccination to generate cytolytic effectors producing IFN- $\gamma$  might be very beneficial for therapeutic vaccination.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to S. P. Schoenberger for his kind help with *Listeria monocytogenes* infection. We thank all the members of the laboratory for helpful discussion. We acknowledge Sylvie Lesage for critical reading of the manuscript. We thank Miguel Chagnon and Adam-Nicolas Pelletier for help with the statistical analysis. We acknowledge J. Yewdell for kindly providing the anti-K<sup>b</sup>-OVA Ab. We thank J. Dubeau and the animal care staff for mice husbandry. We acknowledge the help of Nathalie Henley and Martine Dupuis for cell sorting.

## REFERENCES

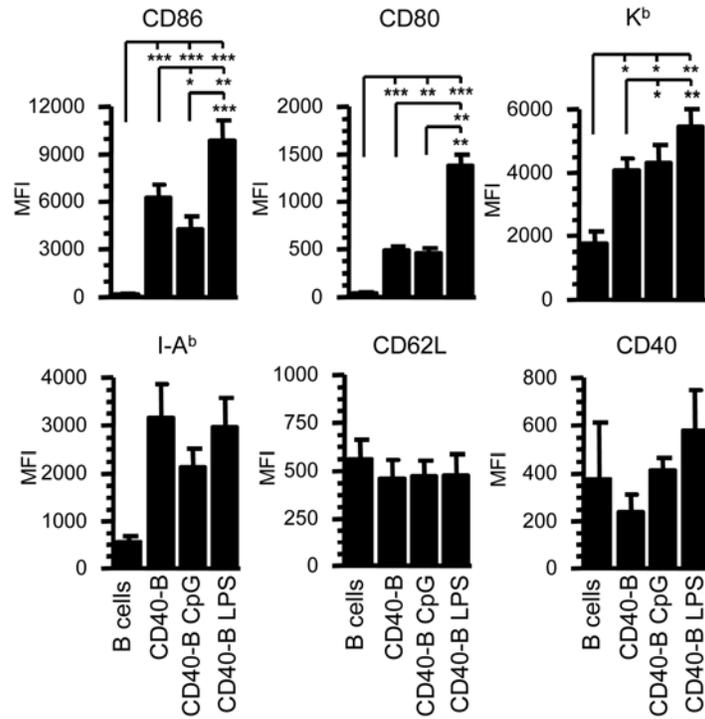
1. Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, et al. (2006) Signals required for programming effector and memory development by CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunol Rev* 211: 81-9
2. Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS, Harty JT (2005) Accelerated CD8<sup>+</sup> T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med* 11: 748-756.
3. Lacombe MH, Hardy MP, Rooney J, Labrecque N (2005) IL-7 receptor expression levels do not identify CD8<sup>+</sup> memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* 175: 4400-4407.
4. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, et al. (2007) Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27: 281-295.
5. Lopez JA, Bioley G, Turtle CJ, Pinzon-Charry A, Ho CS, et al. (2003) Single step enrichment of blood dendritic cells by positive immunoselection. *J Immunol Methods* 274: 47-61.
6. Eynon EE, Parker DC (1992) Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J Exp Med* 175: 131-138.
7. Lassila O, Vainio O, Matzinger P (1988) Can B cells turn on virgin T cells? *Nature* 334: 253-255.
8. Ronchese F, Hausmann B (1993) B lymphocytes *in vivo* fail to prime naive T cells but can stimulate antigen-experienced T lymphocytes. *J Exp Med* 177: 679-690.
9. Raimondi G, Zanoni I, Citterio S, Ricciardi-Castagnoli P, Granucci F (2006) Induction of peripheral T cell tolerance by antigen-presenting B cells. I. Relevance of antigen presentation persistence. *J Immunol* 176: 4012-4020.
10. Raimondi G, Zanoni I, Citterio S, Ricciardi-Castagnoli P, Granucci F (2006) Induction of peripheral T cell tolerance by antigen-presenting B cells. II. Chronic antigen presentation overrules antigen-presenting B cell activation. *J Immunol* 176: 4021-4028.
11. Fuchs EJ, Matzinger P (1992) B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 258: 1156-1159.

12. Gilbert KM, Weigle WO (1994) Tolerogenicity of resting and activated B cells. *J Exp Med* 179: 249-258.
13. Parekh VV, Prasad DV, Banerjee PP, Joshi BN, Kumar A, et al. (2003) B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8<sup>+</sup> T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol* 170: 5897-5911.
14. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P (2003) CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 63: 2836-2843.
15. Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, et al. (1997) CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* 100: 2757-2765.
16. von Bergwelt-Baildon MS, Vonderheide RH, Maecker B, Hirano N, Anderson KS, et al. (2002) Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood* 99: 3319-3325.
17. Coughlin CM, Vance BA, Grupp SA, Vonderheide RH (2004) RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood* 103: 2046-2054.
18. Shen S, Xu Z, Qian X, Ding Y, Yu L, et al. (2007) Autogeneic rna-electroporated CD40-ligand activated b-cells from hepatocellular carcinoma patients induce CD8<sup>+</sup> T-cell responses ex vivo. *Exp Oncol* 29: 137-143.
19. Ahmadi T, Flies A, Efebera Y, Sherr DH (2008) CD40 Ligand-activated, antigen-specific B cells are comparable to mature dendritic cells in presenting protein antigens and major histocompatibility complex class I- and class II-binding peptides. *Immunology* 124: 129-140.
20. Kondo E, Gryschock L, Klein-Gonzalez N, Rademacher S, Weihrauch MR, et al. (2009) CD40-activated B cells can be generated in high number and purity in cancer patients: analysis of immunogenicity and homing potential. *Clin Exp Immunol* 155: 249-256.
21. von Bergwelt-Baildon M, Shimabukuro-Vornhagen A, Popov A, Klein-Gonzalez N, Fiore F, et al. (2006) CD40-activated B cells express full lymph node homing triad and induce T-cell chemotaxis: potential as cellular adjuvants. *Blood* 107: 2786-2789.

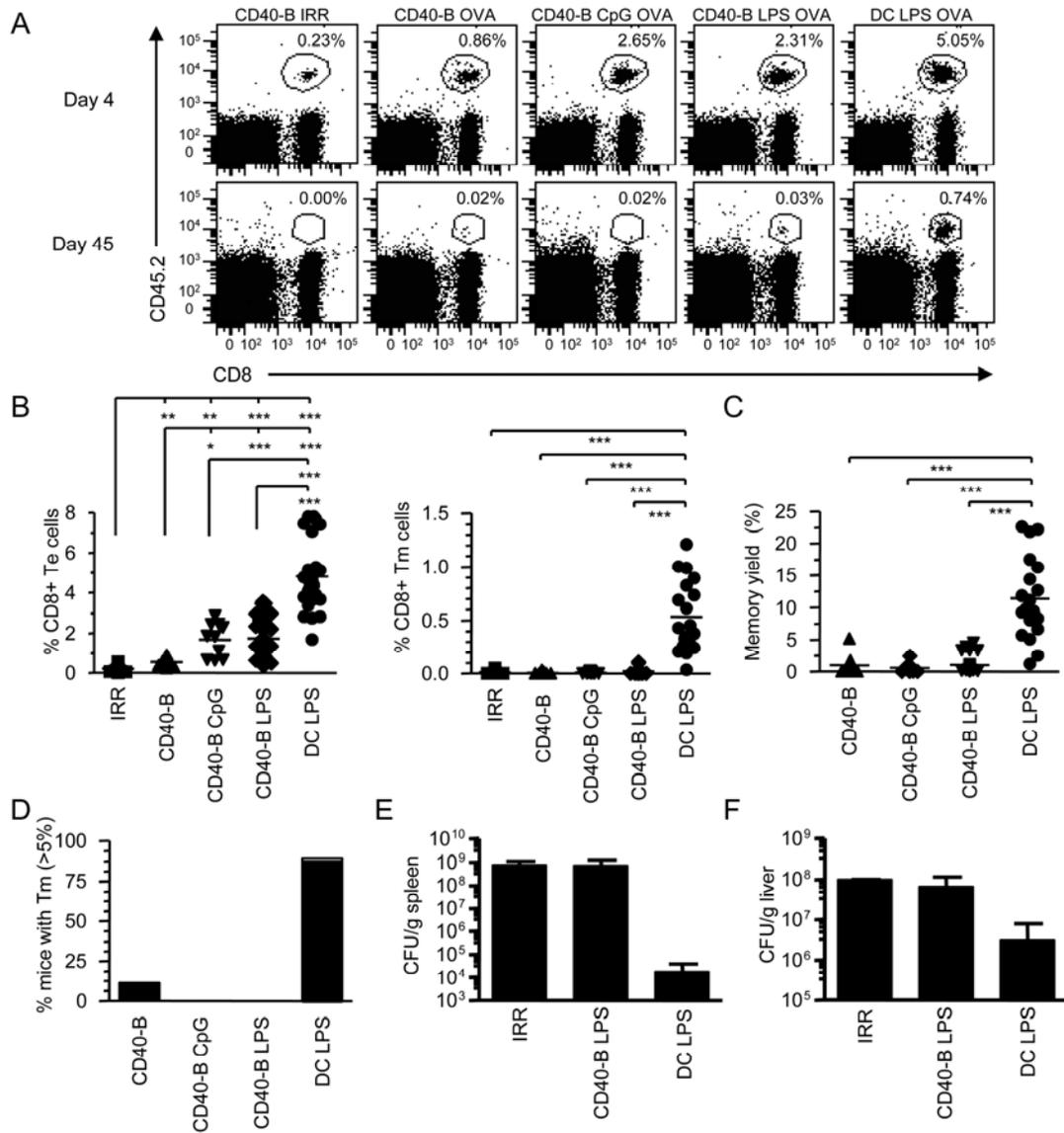
22. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, et al. (1994) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17-27.
23. Kershaw MH, Hsu C, Mondesire W, Parker LL, Wang G, et al. (2001) Immunization against endogenous retroviral tumor-associated antigens. *Cancer Res* 61: 7920-7924.
24. Livingstone AM, Kuhn M (1999) Dendritic cells need T cell help to prime cytotoxic T cell responses to strong antigens. *Eur J Immunol* 29: 2826-2834.
25. Porgador A, Yewdell JW, Deng Y, Bennink JR, Germain RN (1997) Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 6: 715-726.
26. Ostiguy V, Allard EL, Marquis M, Leignadier J, Labrecque N (2007) IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *J Leukoc Biol* 82: 645-656.
27. Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Brooks AG (2002) Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J Immunol* 168: 834-838.
28. Bahjat KS, Liu W, Lemmens EE, Schoenberger SP, Portnoy DA, et al. (2006) Cytosolic entry controls CD8<sup>+</sup>-T-cell potency during bacterial infection. *Infect Immun* 74: 6387-6397.
29. Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, et al. (2005) Effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6: 1236-1244.
30. Leignadier J, Labrecque N Epitope density influences CD8 memory T cell differentiation. *PLoS One* 5: e13740.
31. Schulze DH, Pease LR, Geier SS, Reyes AA, Sarmiento LA, et al. (1983) Comparison of the cloned H-2Kbm1 variant gene with the H-2Kb gene shows a cluster of seven nucleotide differences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 2007-2011.
32. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, et al. (1987) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518.
33. Loyer V, Fontaine P, Pion S, Hetu F, Roy DC, et al. (1999) The *in vivo* fate of APCs displaying minor H antigen and/or MHC differences is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J Immunol* 163: 6462-6467.

34. Hand TW, Morre M, Kaech SM (2007) Expression of IL-7 receptor alpha is necessary but not sufficient for the formation of memory CD8 T cells during viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11730-11735.
35. Intlekofer AM, Takemoto N, Kao C, Banerjee A, Schambach F, et al. (2007) Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 204: 2015-2021.
36. Takemoto N, Intlekofer AM, Northrup JT, Wherry EJ, Reiner SL (2006) Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J Immunol* 177: 7515-7519.
37. Banerjee A, Gordon SM, Intlekofer AM, Paley MA, Mooney EC, et al. (2010) Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8<sup>+</sup> T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol* 185: 4988-4992.
38. Kallies A, Xin A, Belz GT, Nutt SL (2009) Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* 31: 283-295.
39. Rutishauser RL, Martins GA, Kalachikov S, Chandele A, Parish IA, et al. (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.
40. Ichii H, Sakamoto A, Hatano M, Okada S, Toyama H, et al. (2002) Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 3: 558-563.
41. Ichii H, Sakamoto A, Kuroda Y, Tokuhisa T (2004) Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 173: 883-891.
42. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 95-109.
43. Blankenstein T, Qin Z (2003) The role of IFN-gamma in tumor transplantation immunity and inhibition of chemical carcinogenesis. *Curr Opin Immunol* 15: 148-154.
44. Qin Z, Blankenstein T (2000) CD4<sup>+</sup> T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 12: 677-686.
45. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137-148.

46. Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, et al. (2003) A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8<sup>+</sup> T cells. *Cancer Res* 63: 4095-4100.
47. Barth RJ, Jr., Mule JJ, Spiess PJ, Rosenberg SA (1991) Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 173: 647-658.
48. Prevost-Blondel A, Neuenhahn M, Rawiel M, Pircher H (2000) Differential requirement of perforin and IFN-gamma in CD8 T cell-mediated immune responses against B16.F10 melanoma cells expressing a viral antigen. *Eur J Immunol* 30: 2507-2515.
49. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, et al. (2001) IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-1111.
50. Tuttle TM, McCrady CW, Inge TH, Salour M, Bear HD (1993) gamma-Interferon plays a key role in T-cell-induced tumor regression. *Cancer Res* 53: 833-839.
51. Seki N, Brooks AD, Carter CR, Back TC, Parsonneault EM, et al. (2002) Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas ligand-mediated lysis *in vitro*, but cause tumor regression *in vivo* in the absence of perforin. *J Immunol* 168: 3484-3492.
52. Meunier MC, Delisle JS, Bergeron J, Rineau V, Baron C, et al. (2005) T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat Med* 11: 1222-1229.
53. Joshi NS, Kaech SM (2008) Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *J Immunol* 180: 1309-1315.
54. Vanden Bush TJ, Buchta CM, Claudio J, Bishop GA (2009) Cutting Edge: Importance of IL-6 and cooperation between innate and adaptive immune receptors in cellular vaccination with B lymphocytes. *J Immunol* 183: 4833-4837.



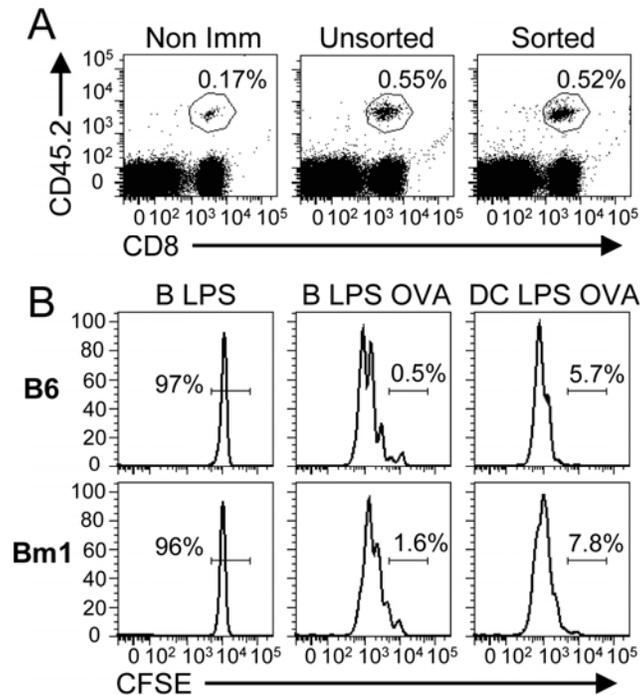
**Figure 1. CD40-B cells have an activated phenotype.** After 3d of culture on murine 3T3-CD40L fibroblasts, CD40-B cells were matured or not with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or CpG (2mM) for 24h (CD40-B LPS and CD40-B CpG). Freshly isolated splenocytes were used as a naïve B cell control. The histogram bars show the mean of fluorescence intensity (MFI)  $\pm$  standard deviation of the mean (SEM) for the expression of CD86, CD80, CD62L, CD40, K<sup>b</sup> and I-A<sup>b</sup> gated on the CD19<sup>+</sup> population. The results are pooled from at least three independent experiments except for CD40 expression on B cells (n=2). \* p<0.05, \*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001.



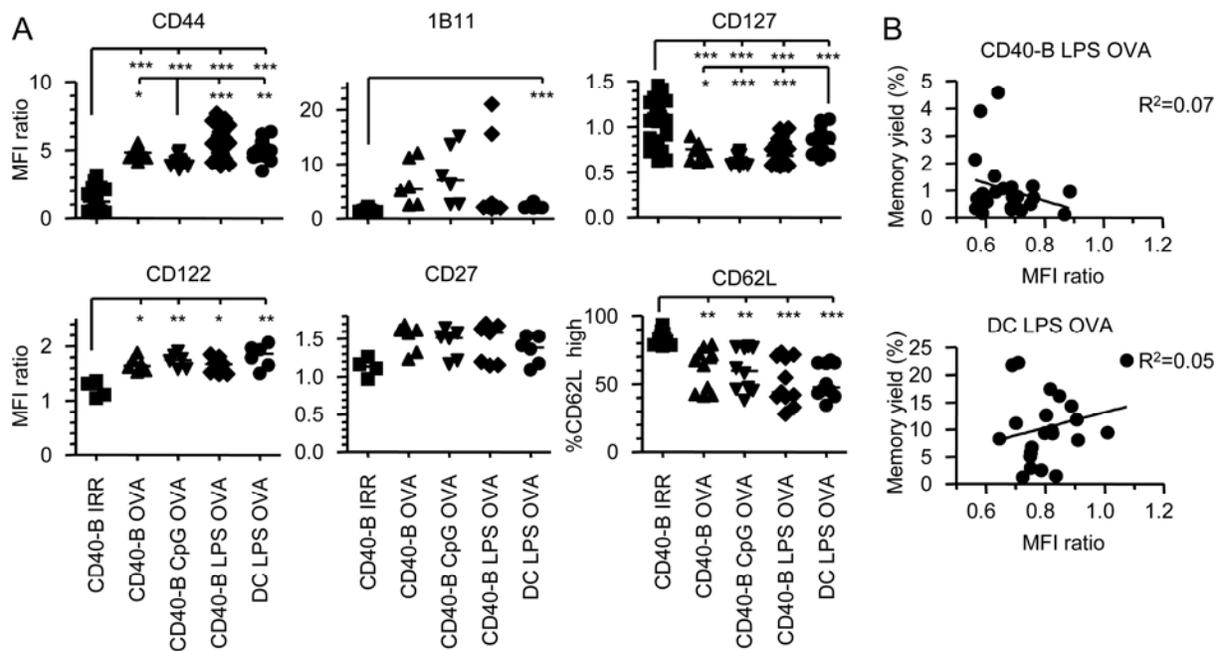
**Figure 2. Immunization with CD40-B cells induces an *in vivo* CD8<sup>+</sup> T cell response.**

A. CD40-B cell vaccination generates CD8<sup>+</sup> Te cells but not Tm cells. 10<sup>6</sup> female OT-1 T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) were adoptively transferred into congenic B6SJL female mice (CD45.1<sup>+</sup>) followed by immunization two days later with 2 X 10<sup>6</sup> CD40-B cells, matured or not with LPS (1 μg/mL) or CpG (2mM) and loaded with 4 μg/mL OVA or with an irrelevant peptide (IRR). As a reference recipients were immunized with 2 X 10<sup>6</sup> DCs matured with LPS and loaded with OVA peptide. OVA-specific T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) were analyzed in the same mouse

by surgical removal of superficial lymph nodes at d4 (effector) and d30-45 (memory) post-immunization. Te and Tm cells were identified as CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup> by flow cytometry. The percentage of Te and Tm cells generated are indicated on each dot plot. B. Percentage of CD8<sup>+</sup> Te (left panel) and Tm (right panel) cells recovered at d4 (Te) and d>30 (Tm) in one lymph node is shown. C. Yield of CD8<sup>+</sup> Tm cell generation. The yield of Tm cell formation was calculated as the percentage of Te cells that develop into Tm cells. D. The percentage of mice that generates more than 5% of CD8<sup>+</sup> Tm cells is shown for the different immunization conditions. E and F. Lm challenges. 30d post immunization, mice were challenged with a lethal dose of Lm-OVA (10<sup>5</sup> CFU). 3d post challenged, CFU were determined in the spleen (E) and liver (F) for each mouse. A-D are from at least four independent experiments with at least two mice per group while E and F are from one independent experiment with three mice per group. \* p<0.05, \*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001.

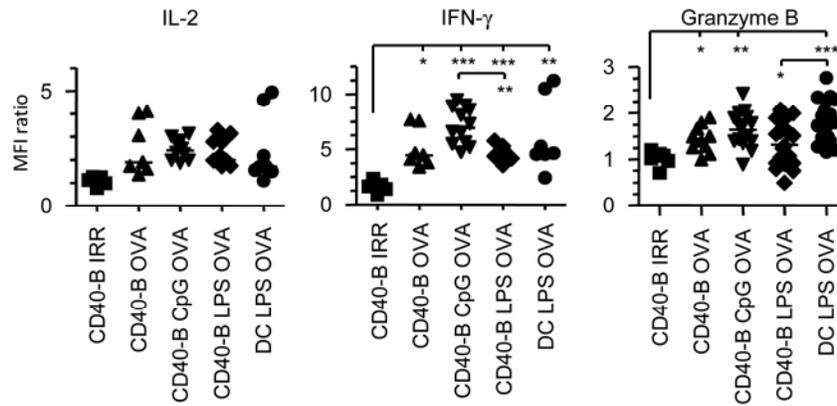


**Figure 3. CD40-B cells directly present Ag to naïve CD8<sup>+</sup> T cells.** A. Highly purified sorted CD40-B cells can induce a CD8<sup>+</sup> T cell response. Mice were immunized as in Figure 2 with sorted or unsorted CD40-B cells matured with LPS and loaded with OVA. Percentage of effectors (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) generated is shown at d4 post-immunization. B. Direct priming of OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells by CD40-B cells. 5 X 10<sup>6</sup> CFSE-labelled OT-1 T cells were adoptively transferred into either C57BL/6 or Bm1 recipients followed by immunization on the same day with 6 X 10<sup>6</sup> LPS-treated CD40-B cells loaded with OVA (B LPS OVA) or an irrelevant peptide (B LPS) or 2 X 10<sup>6</sup> LPS-matured DCs loaded with OVA peptide (DC OVA). The proliferation of OVA-specific T cells was analyzed 48h later. The histograms show CFSE-profile gated on OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells using K<sup>b</sup>-OVA tetramer staining. The percentage of undivided cells is indicated on each histogram. 3 independent experiments with 2 mice per group

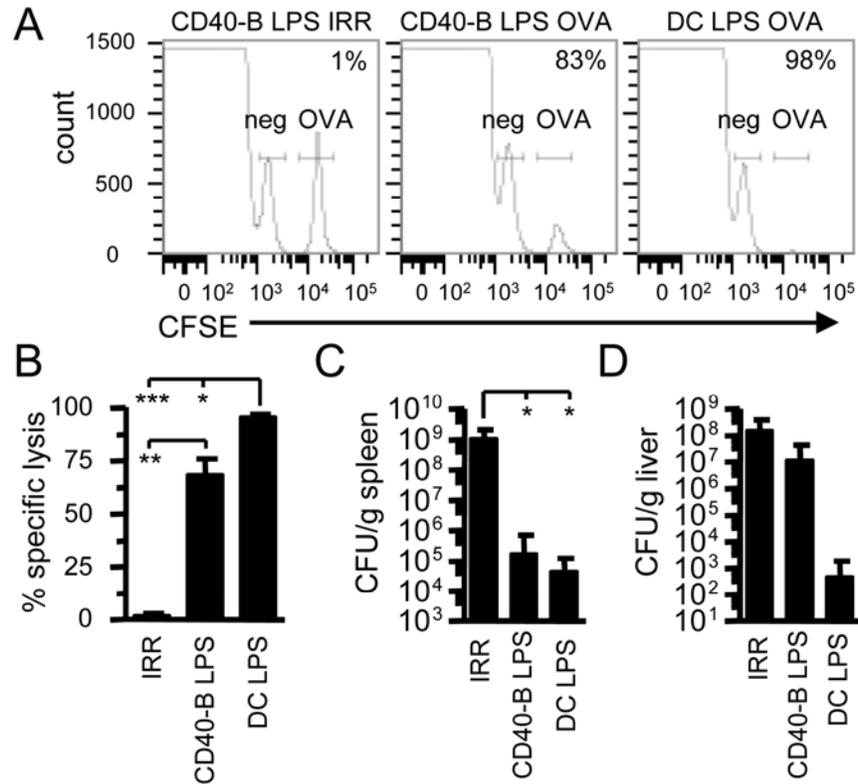


**Figure 4. Phenotype of the CD8<sup>+</sup> Te cells generated after CD40-B cell immunization.**

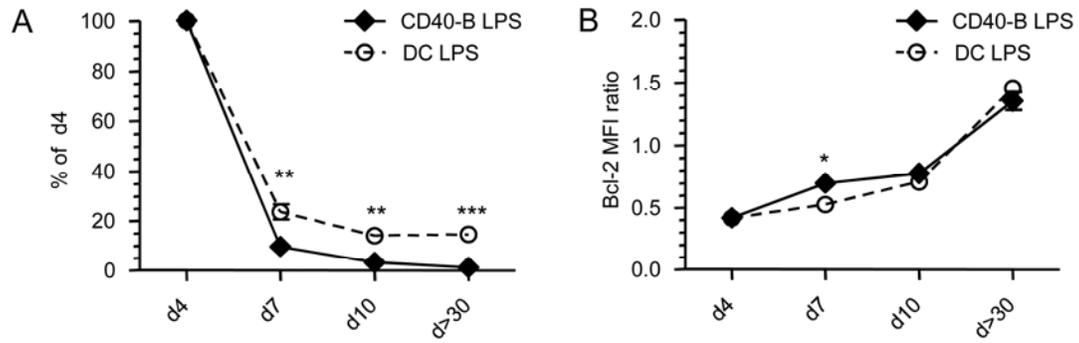
A. Phenotype of effectors at d4 post-immunization with CD40-B cells treated or not with TLR ligands. Immunizations were realized as described in Figure 2 with CD40-B cells ( $2 \times 10^6$ ) treated or not with CpG or LPS and with DCs ( $2 \times 10^6$ ) matured with LPS. The bar chart shows the MFI of expression for CD44, 1B11, CD127, CD122, CD27 by CD8<sup>+</sup> Te cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) normalized to the MFI of endogenous CD8<sup>+</sup> T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>). For CD62L, the percentage of CD8<sup>+</sup> Te cells expressing high level of CD62L is shown. B. No correlation between CD127 expression level and memory generation. The results are from 2 independent experiments for CD27 and CD122 and from at least 3 independent experiments for the other cell surface molecules. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .



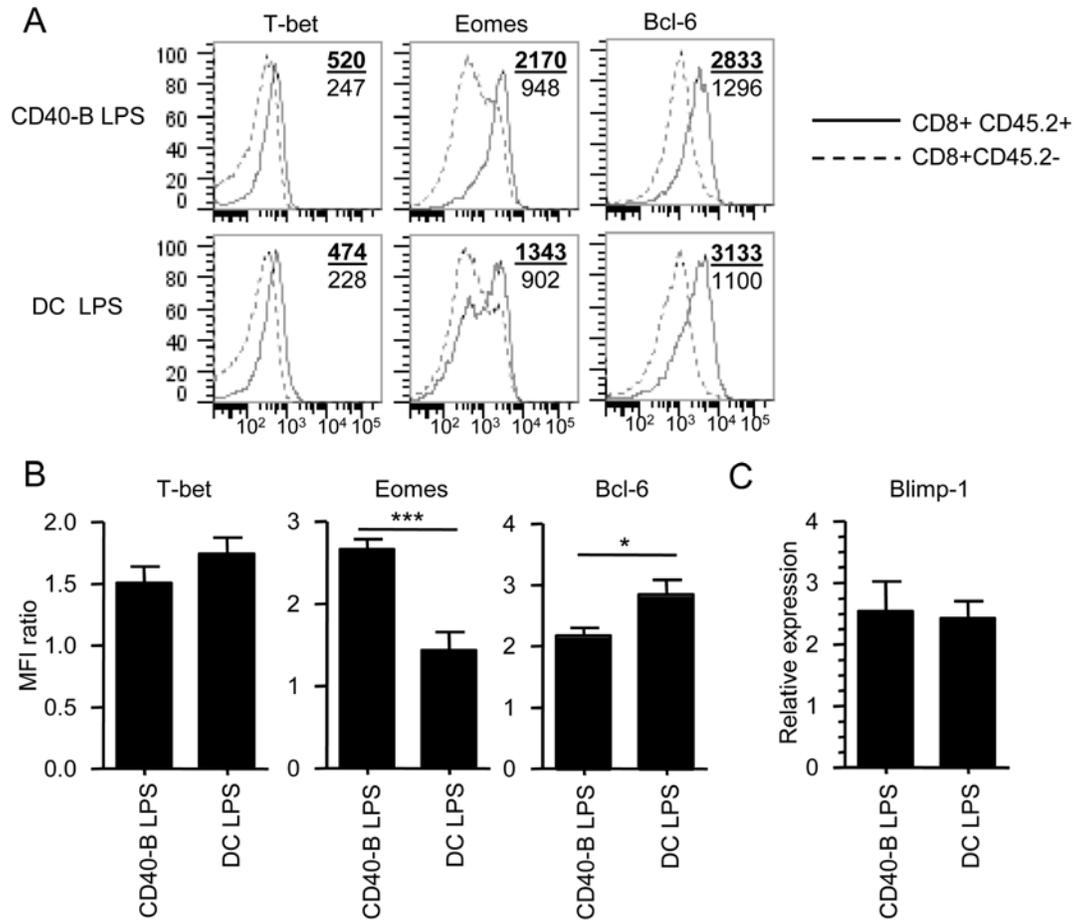
**Figure 5. Cytokine and granzyme B production by OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te cells.** Immunizations were realized as described in Figure 2 with CD40-B cells ( $2 \times 10^6$ - $6 \times 10^6$ ) treated or not with CpG or LPS and with DCs ( $0.5 \times 10^5$ - $2 \times 10^6$ ) matured with LPS. The MFI ratio was determined as in Figure 4A for IL-2, IFN- $\gamma$  and granzyme B production by CD8<sup>+</sup> Te cells at d4 post-immunization. Results are pooled from at least three independent experiments with a minimum of 2 mice per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 6. CD40-B cell vaccination generates functional effector.** A. *In vivo* killing. Mice were immunized as in Figure 2. Four days post-immunization, CFSE-labeled splenocytes pulsed or not with OVA were injected as target cells. After 4h, the percentage of CFSE<sup>hi</sup> (OVA-pulsed; gate labeled OVA on the histogram) and CFSE<sup>lo</sup> (unpulsed; gate labeled neg on the histogram) cells were analyzed in the spleen. Percentage of specific lysis is indicated on the histogram and was calculated using the indicated gate and as described in Material and Methods. B. Percentage of specific killing by OVA CD8<sup>+</sup> Te cells. Mean +/- SEM of specific lysis are shown for the different immunization conditions. 2 mice per conditions, 3 independent experiments. C and D. Lm challenge. Four days post-immunization, mice were challenged with a lethal dose of Lm-OVA (10<sup>5</sup> CFU). 3d post-infection (peak of bacterial load), mice were killed and CFU were determined in the spleen (C) and the liver (D). Mean +/- standard (SD) are shown. 2-4 mice per conditions, 3 independent experiments. \* p<0.05, \*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001.

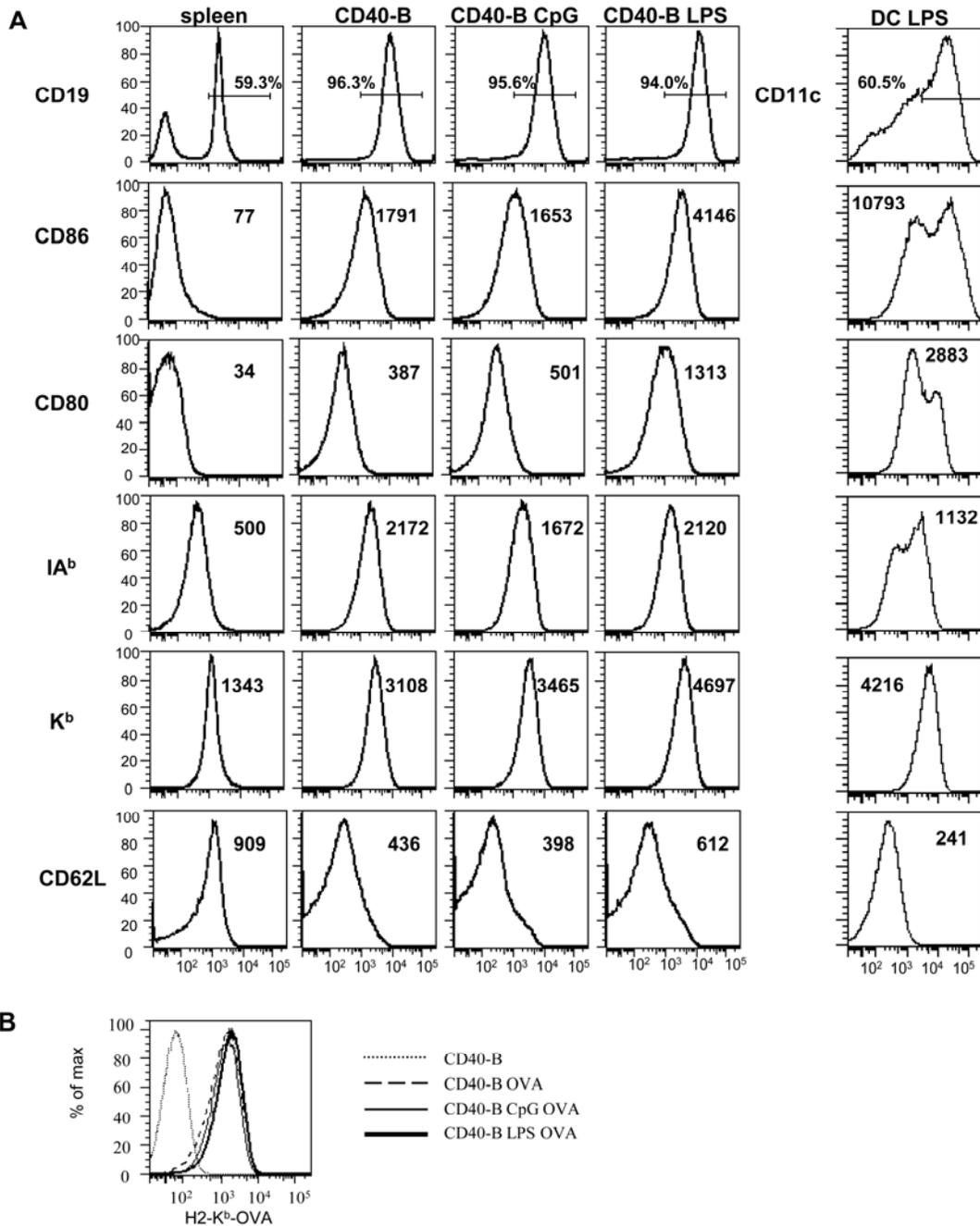


**Figure 7. Effectors generated with CD40-B cell immunization contract more rapidly than the one obtained with DC immunization.** A. Contraction of the OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cell response. Mice were immunized as described in Figure 2. Lymph nodes were surgically removed at 4, 7, 10 and >30 days post-immunization. Cells were stained to determine the percentage of Te cells generated. The graph shows the percentage of remaining Te cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) over time relative to the peak of the response (d4). B. Effectors generated with CD40-B cell and DC immunization express similar amount of Bcl-2 during the course of the CD8<sup>+</sup> T cell response. The MFI of Bcl-2 for OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te cells was normalized to the MFI of endogenous CD8<sup>+</sup> T cells to obtain a MFI ratio. 3 independent experiments. \* p<0.05, \*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001.



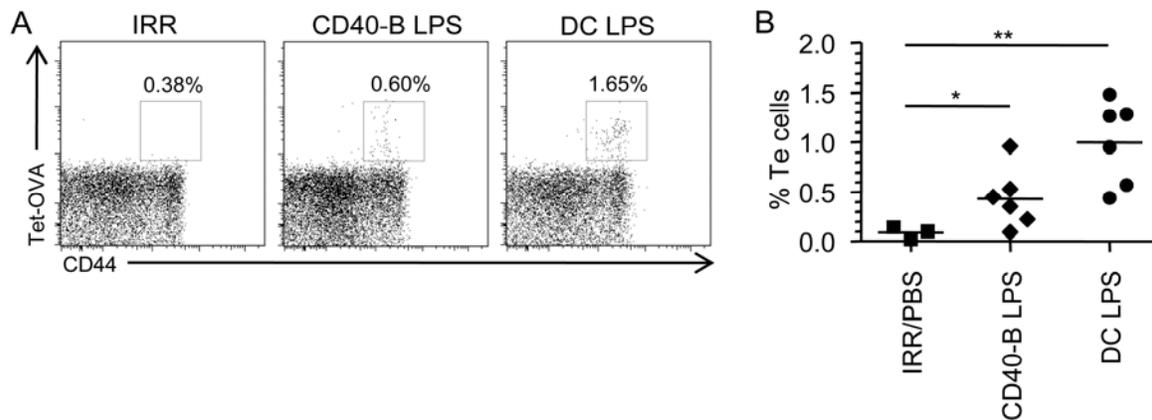
**Figure 8. CD40-B cell immunization generates effectors expressing similar level of T-bet and Blimp-1, higher level of Eomes and lower amount of Bcl-6.** A. Expression of T-bet, Eomes and Bcl-6 by CD8<sup>+</sup> Te cells generated following CD40-B cell and DC immunizations. Four days post-immunization with 2 X 10<sup>6</sup> CD40-B cells or DCs matured with LPS and loaded with the OVA peptide, Te cells were stained intracellularly with antibodies against T-bet, Eomes and Bcl-6 transcription factors. The representative overlay histogram shows expression of the transcription factor by endogenous T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>) and OVA-specific Te cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>). The MFI is shown on each overlay, the upper bold number indicates the MFI of OVA-specific effectors (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) while the lower number is for the endogenous population (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>). B. Quantification of the level of expression of T-bet, Eomes and Bcl-6. The histograms shows the MFI of expression for T-bet, Eomes and

Bcl-6 by OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) normalized to the MFI of endogenous CD8<sup>+</sup> T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>). The results are from at least 2 independent experiments. C. Similar expression of Blimp-1 by OVA-specific Te cells following CD40-B cell or DC immunization. At the peak of the response (d4), Te cells were sorted (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) from spleen to extract RNA. The relative expression of Blimp-1 was determined by quantitative RT-PCR. Expression relative to a reference sample is shown. Results are from 4 independent experiments. \* p<0.05 and \*\*\* p<0.001.

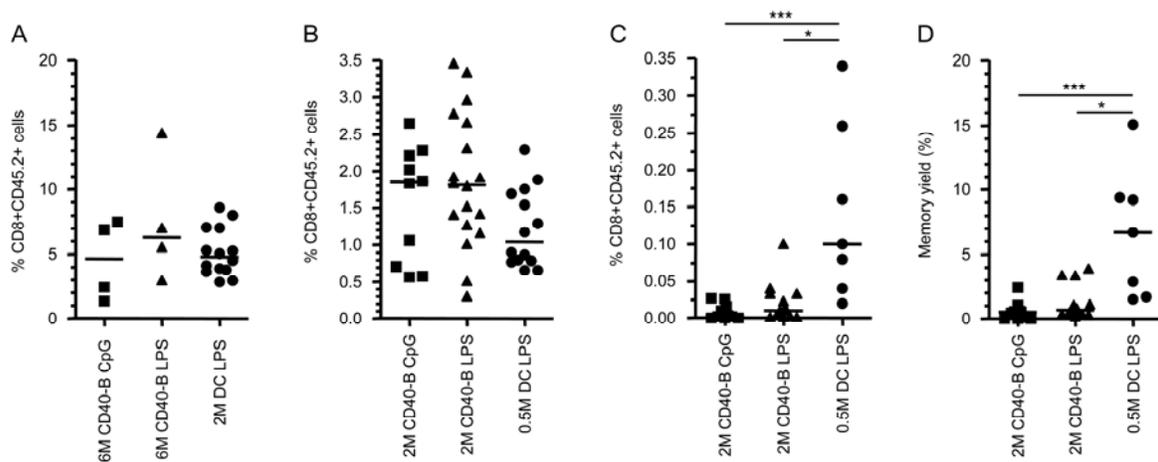


**Figure S1. Characterization of CD40-B cells.** A. Phenotype of CD40-B cells and DCs. B cells were grown from B6SJL splenocytes on irradiated murine NIH-3T3 fibroblasts transfected with the mouse CD40L cDNA. After 3 days of culture, B cells were matured with LPS (1 $\mu$ g/mL) or CpG-DNA (2mM) for 24h. Freshly isolated splenocytes were also stained as

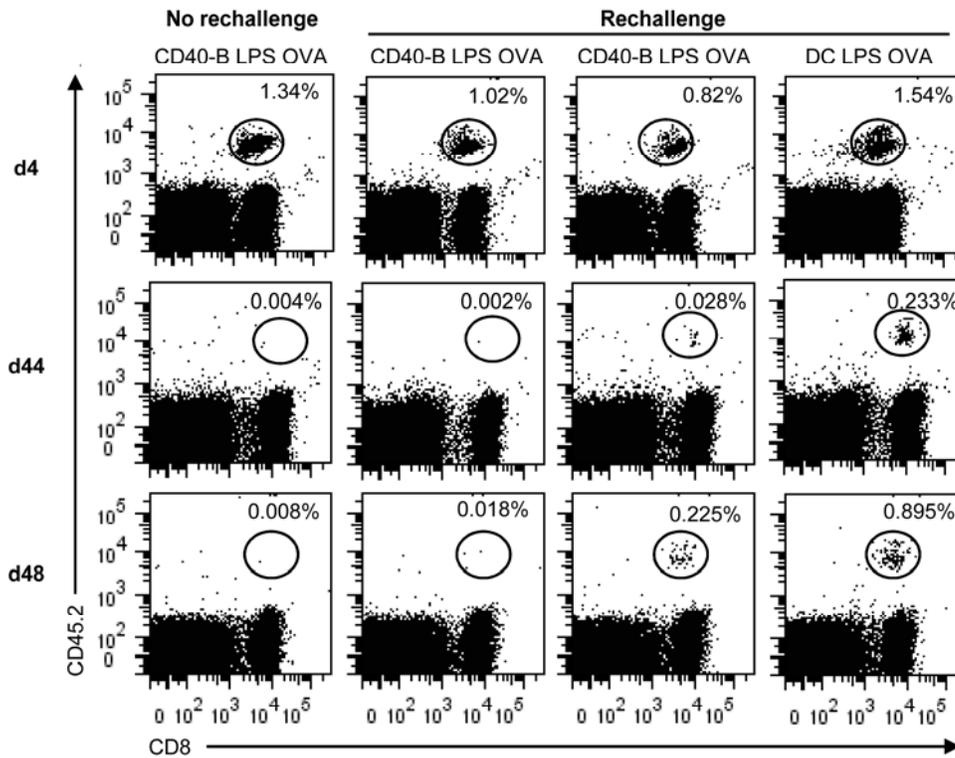
controls. Dendritic cells (DC) were obtained by culturing bone marrow cells during 7 days with GM-CSF and IL-4 and were matured with LPS (1µg/mL) on day 6. Percentage of CD19<sup>+</sup> cells, percentage of CD11c<sup>+</sup> cells or mean fluorescence intensity are indicated on each histogram. CD86, CD80, IA<sup>b</sup>, K<sup>b</sup>, and CD62L histograms were gated on CD19<sup>+</sup> cells for CD40-B cells and splenocytes or on CD11c<sup>+</sup> cells for DCs. B. Similar loading of the OVA peptide for each B cell culture conditions. SIINFEKL (OVA) peptide (4 µg/ml) was added on day 3 of culture. The K<sup>b</sup>-OVA complex was detected using a monoclonal antibody (25.D1.16) that specifically recognizes this peptide-MHC complex. The staining for K<sup>b</sup>-OVA is shown for each culture conditions



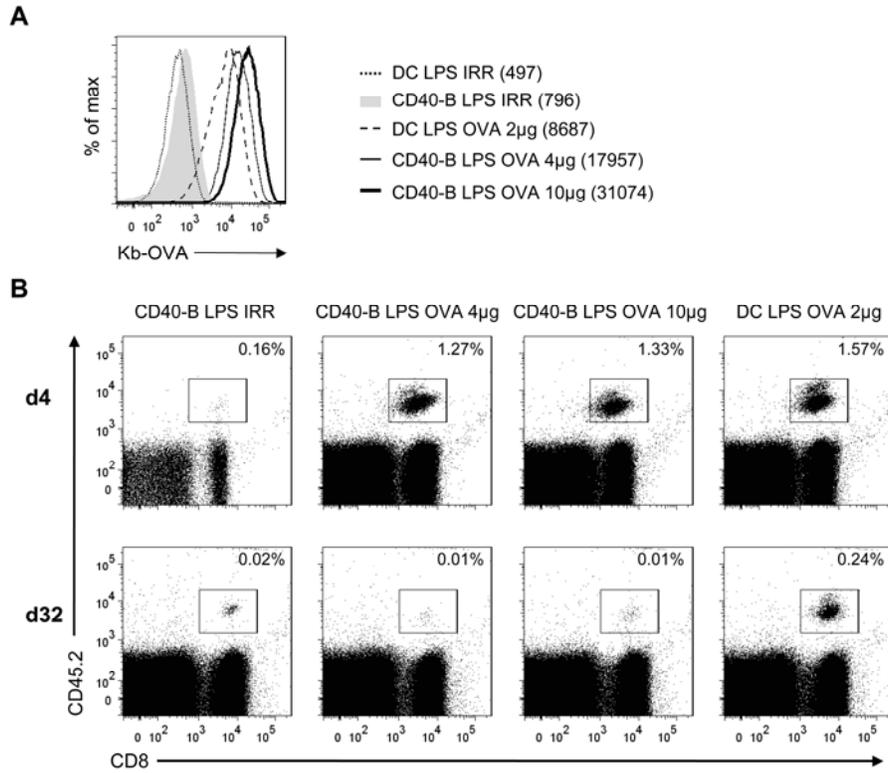
**Figure S2. Immunization with CD40-B lymphocytes induces an endogenous response.** C57BL/6 mice were immunized with  $2 \times 10^6$  CD40-B cells or DCs matured with LPS ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and loaded with SIINFEKL (OVA) peptide. Responses were measured in the blood 7 days post-immunization with  $\text{K}^b$ -OVA tetramer staining. A. Representative dot plot are shown. Cells were previously gated on  $\text{CD8}^+\text{CD3}^+$  cells. B. Percentage of response for each immunized mouse is shown. 2 independent experiments. Statistical analysis was done using a t-test. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



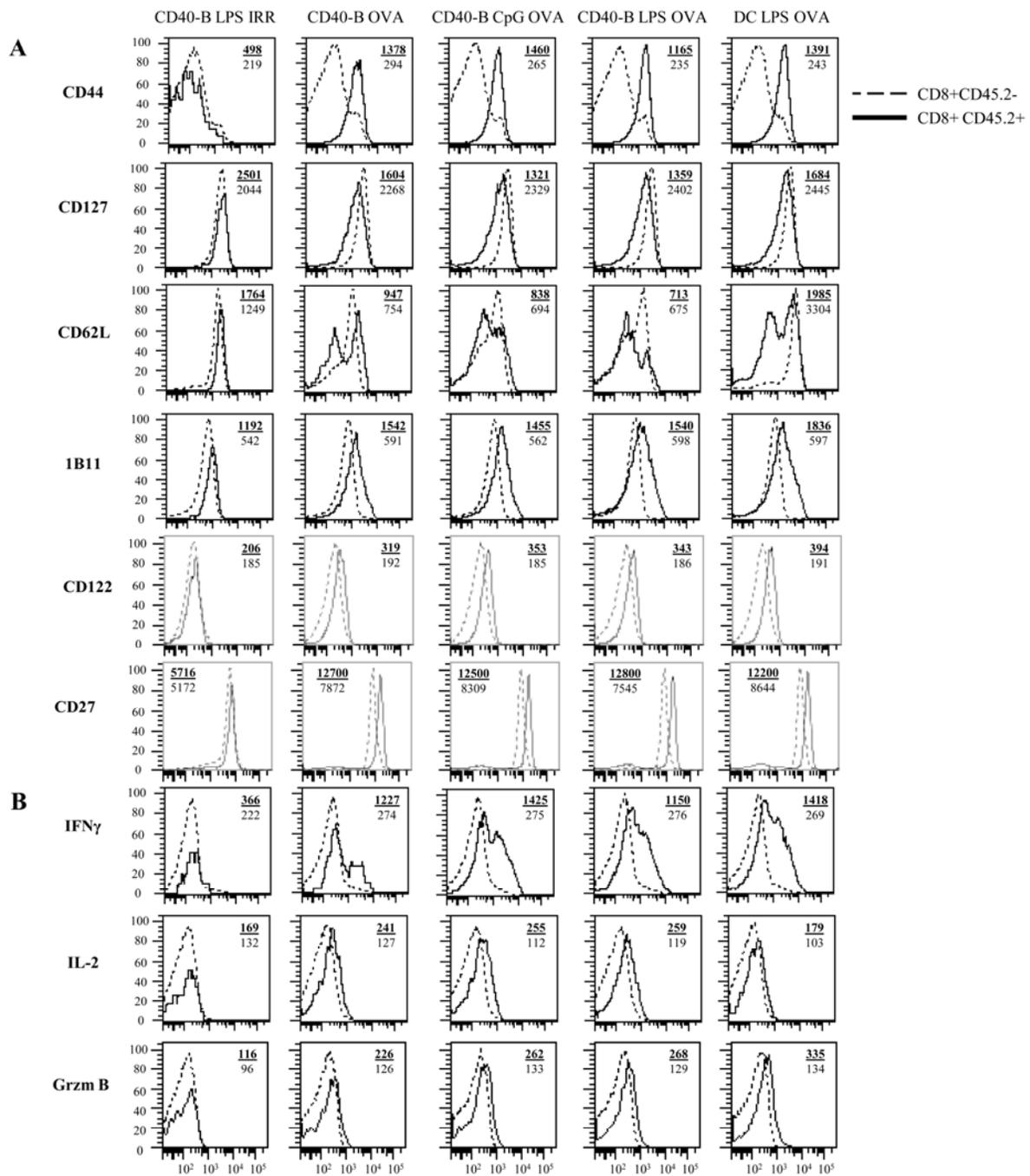
**Figure S3. Immunization with CD40-B cells can generate an effector response comparable to immunization with DCs.**  $10^6$  female OT-1 cells were adoptively transferred into B6SJL female mice followed by immunization with  $2 \times 10^6$  or  $6 \times 10^6$  CD40-B cells, matured with LPS ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or CpG-DNA (2mM) and loaded with  $4\mu\text{g}/\text{mL}$  of SIINFEKL (OVA) peptide. As a reference recipients were immunized with  $0.5 \times 10^6$  or  $2 \times 10^6$  DCs matured with LPS and loaded with OVA peptide. OVA-specific T cells ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^+$ ) effector response was analyzed in the same mouse by surgical removal of superficial lymph nodes at d4 and d30 or more. A. Percentage of Te cells ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^+$ ) generated with  $6 \times 10^6$  (6M) CD40-B LPS OVA, 6M CD40-B CpG OVA or  $2 \times 10^6$  (2M) DC LPS OVA immunization. B. Percentage of Te cells ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^+$ ) obtained with 2M CD40-B LPS OVA, 2M CD40-B CpG OVA or  $0.5 \times 10^6$  (0.5M) DC LPS OVA immunization. C. Percentage of Tm cells ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^+$ ) generated following immunization with 2M CD40-B CpG OVA, 2M CD40-B LPS OVA or 0.5M DC LPS OVA. D. Memory yield (% of Tm cells generated from Te cells) is shown for the different immunization conditions (as in B). Each dot represents one mouse. Medians are shown and Kruskal-Wallis statistical analysis was performed. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .



**Figure S4. Recall response of CD8<sup>+</sup> memory T cells after a challenge with Ag-pulsed DCs.** 10<sup>6</sup> female OT-1 T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) were adoptively transferred into congenic B6SJL female mice (CD45.1<sup>+</sup>) followed by immunization two days later with 2 X 10<sup>6</sup> CD40-B cells, matured or not with LPS (1µg/mL) or CpG (2mM) and loaded with 4ug/mL of OVA peptide or with an irrelevant peptide (IRR). As a reference recipients were immunized with 2 X 10<sup>6</sup> DCs matured with LPS and loaded with OVA peptide. The presence of OVA-specific T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) were analyzed in the same mouse by surgical removal of superficial lymph nodes at d4 (effector; top row) and d44 (memory; middle row) of the primary response. At d45 post-immunisation, mice were challenged or not with 1.25 X 10<sup>6</sup> DCs matured with LPS and pulsed with the OVA peptide. Three days (d48) post-challenge, mice were sacrificed and OVA specific CD8<sup>+</sup> memory T cell (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) expansion was evaluated in the lymph nodes (bottom row).

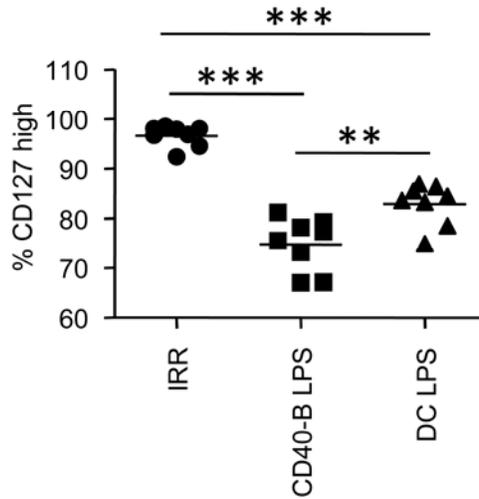


**Figure S5. Defective memory T cell generation with CD40-B cell vaccination is not due to lower epitope density.** A. CD40-B cells express a higher density of epitope than DCs. The level of K<sup>b</sup>-OVA MHC-peptide complex expressed by the different APCs was evaluated using a monoclonal antibody (25.D1.16) that specifically recognizes this peptide-MHC complex. The staining for K<sup>b</sup>-OVA is shown for each APC type used for immunization. The mean fluorescence intensity of K<sup>b</sup>-OVA expression is indicated for each APC type next to the legend. B. Increasing epitope density on CD40-B cells does not improve the generation of CD8<sup>+</sup> memory T cells. 10<sup>6</sup> female OT-1 T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) were adoptively transferred into congenic B6.SJL female mice (CD45.1<sup>+</sup>) followed by immunization two days later with 2 X 10<sup>6</sup> CD40-B cells, matured with LPS (1  $\mu$ g/mL) and loaded with different concentrations of OVA peptide (4 or 10  $\mu$ g/ml) or with an irrelevant peptide (IRR). As a reference recipients were immunized with 2 X 10<sup>6</sup> DCs matured with LPS and loaded with 2  $\mu$ g/ml of OVA peptide. The dot plots show the effector (d4) and memory responses (d32) for each vaccination conditions. The percentage of effector and memory (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) T cells generated are indicated on each dot plot.

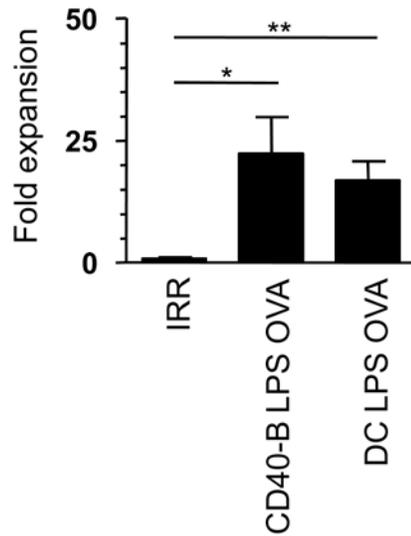


**Figure S6. Phenotype and function of effector CD8<sup>+</sup> T cells generated after CD40-B cell immunization.** A. Phenotype of OVA-specific CD8<sup>+</sup> effector T cells. 10<sup>6</sup> female OT-1 cells were adoptively transferred into B6SJL female mice followed by immunization with 2 X 10<sup>6</sup> CD40-B cells, matured or not with LPS (1 $\mu$ g/mL) or CpG-DNA (2mM) and loaded with 4

$\mu\text{g/mL}$  SIINFEKL (OVA) or an irrelevant peptide (IRR). As a reference recipients were immunized with  $2 \times 10^6$  DCs matured with LPS and loaded with OVA peptide. 4 days post-immunization, lymph nodes were removed by surgery and the phenotype of effectors was analysed by flow cytometry. The overlays show expression of the different cell surface markers by OVA-specific T cells ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^+$ ) compared to endogenous T cells ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^-$ ). The mean fluorescence intensity (MFI) is indicated on each histogram, the upper bold number indicates the MFI of OVA-specific effectors ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^+$ ) while the lower number is for the endogenous population ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^-$ ). B. Acquisition of effector functions by OVA-specific  $\text{CD8}^+$  T cells following CD40-B cell vaccination. OVA-specific effector  $\text{CD8}^+$  T cells were generated as in A. 4 days post-immunization, cells were restimulated for 4h with PMA/ionomycin in the presence of brefeldin A to evaluate IFN- $\gamma$ , IL-2 and granzyme B production. The overlays show production of the different effector molecules by OVA-specific T cells ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^+$ ) compared to endogenous T cells ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^-$ ). The MFI is indicated on each histogram, the upper bold number indicates the MFI of OVA-specific effectors ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^+$ ) while the lower number is for the endogenous population ( $\text{CD8}^+\text{CD45.2}^-$ )



**Figure S7. The majority of effectors generated with CD40-B cell immunization express high level of CD127.**  $10^6$  female OT-1 cells were adoptively transferred into B6SJL female mice followed by immunization with  $2 \times 10^6$  CD40-B cells or DCs matured with LPS (1 $\mu$ g/mL) and loaded with SIINFEKL (OVA). OVA-specific T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) effectors response was analyzed in superficial lymph nodes at d4 post-immunization. Percentage of effectors highly expressing CD127 are shown. 3 independent experiments, 2-3 mouse per experiments.



**Figure S8. Similar CD8<sup>+</sup> effector T cell expansion following *Listeria monocytogenes* challenge.** 10<sup>6</sup> female OT-1 T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) were adoptively transferred into congenic B6SJL female mice (CD45.1<sup>+</sup>) followed by immunization two days later with 2 X 10<sup>6</sup> CD40-B cells, matured or not with LPS (1 µg/mL) and loaded with 4 µg/mL OVA or with an irrelevant peptide (IRR). As a reference recipients were immunized with 5 X 10<sup>5</sup> DCs matured with LPS and loaded with OVA peptide. Four days post-immunization, mice were challenged with a lethal dose of Lm-OVA (10<sup>5</sup> CFU). On the day of challenge and 3d post-infection (peak of bacterial load) blood was harvested, stained and analyzed by flow cytometry. Percentage of CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup> effectors before and after challenge were determined to calculate fold expansion. Mean +/- SEM are shown. 2-4 mice per conditions, 3 independent experiments. \* p<0.05 and \*\* p<0.01.

## **Article II. Notch signalling regulates PD-1 expression during CD8<sup>+</sup> T cell activation**

**Mélissa Mathieu<sup>\*†1</sup>, Natacha Cotta-Grand<sup>\*†1</sup>, Jean-François Daudelin<sup>\*</sup>, Paméla Thébault<sup>\*†</sup>, and Nathalie Labrecque<sup>\*†§</sup>**

Cet article est publié dans le journal Immunology and Cell Biology, vol 91, p.82-8 (2013)

Grâce à ce second papier, nous avons débuté l'étude du rôle de la voie de signalisation Notch lors de l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Cet article est issu de ma collaboration avec N. Cotta-Grand sur le projet visant à élucider le rôle de la voie de signalisation de Notch dans la réponse immunitaire des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Voici les contributions détaillées de chacun des auteurs. D'abord, dans un travail d'équipe avec N. Cotta-Grand et N. Labrecque, j'ai participé à la conception de chacune des expériences décrites dans cet article (contribution conceptuelle de 75-80 %). J'ai aussi réalisé 42.5 % des expériences décrites dans cet article. Comme nous sommes co-auteur, Cotta-Grand N a aussi réalisé environ 42.5 % des expériences présentées et Daudelin JF 10 %. Thébault P a reproduit quelques expériences comptant pour 5 %. Par l'élaboration de figures, j'ai contribué à l'écriture de ce papier (contribution de 10 % à l'écriture). Finalement, c'est moi qui ai assemblé et soumis le papier. Tous les auteurs de ce papier ont contribué à la réflexion et à l'intégration des résultats de ce papier.

## **Notch signalling regulates PD-1 expression during CD8<sup>+</sup> T cell activation**

**Mélissa Mathieu<sup>\*†1</sup>, Natacha Cotta-Grand<sup>\*†1</sup>, Jean-François Daudelin<sup>\*</sup>, Paméla Thébault<sup>\*†</sup>, and Nathalie Labrecque<sup>\*†§</sup>**

<sup>\*</sup>Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, <sup>†</sup>Department of Microbiology and Immunology and <sup>§</sup>Department of Medicine, University of Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada

Address correspondence : Nathalie Labrecque

<sup>1</sup> both authors contributed equally to this work

## **SUMMARY**

PD-1 is an inhibitory receptor involved in T cell activation, tolerance and exhaustion. Little is known on how the expression of PD-1 is controlled during T cell activation. Recent studies demonstrated that NFATc1 and IRF9 regulate *Pdcd1* (PD-1) transcription and that T-bet acts as a transcriptional repressor. In this study, we have investigated the role of the Notch signaling pathway in PD-1 regulation. Using specific inhibitors of the Notch signaling pathway, we showed decreased PD-1 expression and inhibition of *Pdcd1* transcription by activated CD8<sup>+</sup> T cells. Chromatin immunoprecipitation further showed occupancy of the *Pdcd1* promoter with RBPJκ and Notch1 intracellular domain at RBPJκ binding sites. Our results identify the Notch signaling pathway as an important regulator of PD-1 expression by activated CD8<sup>+</sup> T cells.

**Keywords:** CD8<sup>+</sup> T cells, PD-1, Notch signaling, T cell activation

## INTRODUCTION

The PD-1, programmed cell death 1, surface receptor belongs to the CD28 family and is expressed on activated T cells, natural killer T cells, B cells and myeloid cells<sup>1</sup>. PD-1 interacts with two B7 family ligands, PD-L1 and PD-L2. PD-L1 is widely expressed on APCs and hematopoietic cells whereas PD-L2 is only expressed on macrophages and dendritic cells (DCs)<sup>2</sup>. The interaction between PD-1 and one of its ligand simultaneously with TCR or BCR engagement activates an inhibitory pathway which leads to abrogation of cellular response<sup>2, 3</sup>. PD-1:PD-ligands interaction can lead to CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection such as LCMV, HIV and HCV<sup>4-8</sup>. Indeed high level of PD-1 expression by Ag-specific T cells correlates with high viral load and blocking PD-1:PD-L1 interaction restores CD8<sup>+</sup> T cell proliferation and effector functions. Furthermore, PD-1 plays a major role in T cell tolerance and prevention of autoimmunity<sup>3, 9-11</sup>. Therefore, a better understanding of the molecular events controlling PD-1 expression levels is essential to control T cell response. Very little is known on the transcriptional regulation of PD-1 expression. During T cell activation, the TCR-induced transcription factor NFATc1 binds to the *Pdcd1* (PD-1) promoter and contributes to *Pdcd1* transcription<sup>12</sup>. Furthermore, IFN- $\gamma$  synergizes with the TCR signal to promote and sustain *Pdcd1* transcription, via direct binding of IRF9 to the *Pdcd1* promoter<sup>13</sup>. However, during chronic infection, the high level of PD-1 expression on exhausted CD8<sup>+</sup> T cells is due to reduced expression of T-bet, identifying T-bet as a transcriptional repressor of *Pdcd1*<sup>14</sup>.

Notch signaling is a key pathway controlling cell fate choice in a large numbers of cell types including immune cells. In mammals, four Notch receptors (Notch 1-4) and five ligands (Jagged-1, Jagged-2, Delta-like-1, Delta-like-3 and Delta-like-4) have been identified<sup>15</sup>. After interaction with Notch ligands, the Notch receptor is processed by two sequential enzymatic cleavages which first involve ADAM metalloprotease and then gamma-secretase to produce the Notch intracellular domain (NICD)<sup>16, 17</sup>. NICD translocates into the nucleus where it interacts with the RBPJ $\kappa$ /CSL transcription factor to activate the transcription of classical effectors (Deltex, Hes1 and Hes5) of this pathway and of other tissue-specific target genes<sup>18, 19</sup>. Recently, Notch has been implicated in the control of Eomes, perforin and granzyme B

expression by CD8<sup>+</sup> T cells<sup>20,21</sup>. Therefore, the role of the Notch signaling pathway in CD8<sup>+</sup> T cell response has led us to evaluate its contribution to PD-1 expression. In this study, we demonstrate that Notch signaling directly controls *Pdcd1* transcription in activated CD8<sup>+</sup> T cells.

## RESULTS

### Regulation of PD-1 expression by the Notch signaling pathway

To investigate the role of Notch signaling in CD8<sup>+</sup> T cell activation, we used artificial APCs (aAPCs) to activate OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells in vitro. These aAPCs express Jagged-1, Jagged-2, Delta-like-1 and Delta-like-4 (Figure 1a) while Notch1 and Notch2 expression levels increased in OT-1 T cells with activation (Figure 1b and c). Since T cells express Notch receptors and APCs express Notch ligands, we evaluated if Notch signaling was induced following CD8<sup>+</sup> T cell activation with aAPCs. Stimulation of OT-1 T cells with aAPCs induces *Hes1* transcription (Figure 1d), a classical Notch target gene. Furthermore, we observed a dose-dependent inhibition of transcription of the Notch target genes *Hes1* and *Dtx1* following the addition of the gamma-secretase inhibitor DAPT which inhibits the production of NICD (Figure 1d and e).

This system offers a unique way to evaluate the impact of Notch inhibition on CD8<sup>+</sup> T cell activation. Interestingly, inhibition of Notch signaling with DAPT during OT-1 T cell priming with aAPCs only slightly decreases CD44 expression (Figure 2a) while it significantly reduces the up-regulation of the inhibitory receptor PD-1 on OT-1 T cells (Figure 2b and e). The effect of Notch inhibition on PD-1 expression is not due to lower activation of OT-1 T cells since we also observed decreased PD-1 expression in condition (20 μM DAPT) where T cell activation is not affected (Figure 2c).

To confirm the effect of Notch signaling inhibition on PD-1 expression, we performed similar experiments using polyclonal T cells. Unfractionated splenocytes from C57BL/6 mice, containing APCs expressing Notch ligands, were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of DAPT. As shown in Figure 2d, we also observed a dose-dependent inhibition of PD-1 expression by CD8<sup>+</sup> T cells following anti-CD3/CD28

stimulation. These results suggest that Notch signaling controls PD-1 expression during CD8<sup>+</sup> T cell activation.

### **Notch signaling regulates *Pdcd1* transcription by activated OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells**

The impact of DAPT treatment on PD-1 up-regulation by activated CD8<sup>+</sup> T cells suggests that the Notch signaling pathway may control *Pdcd1* transcription. To prove that Notch signaling influences PD-1 transcription, OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells activated with aAPCs for 24h in the presence of DAPT were sorted followed by RNA extraction and RT-qPCR. As shown in Figure 2f, the addition of DAPT led to reduced transcription of the *Pdcd1* gene. This effect was also shown to occur even with low doses of DAPT (10 and 20 μM) that do not interfere with CD44 expression (Figure 2c). These results show that Notch signaling regulates PD-1 expression at the transcriptional level in activated OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells.

### **Specific inhibition of Notch-induced transcriptional activation impaired PD-1 expression by activated CD8<sup>+</sup> T cells**

Although the gamma-secretase inhibitor DAPT is usually considered as a specific inhibitor of the Notch signaling pathway, it also inhibits the cleavage of other gamma-secretase substrates<sup>22, 23</sup>. In our model, we have observed a small impact of DAPT on CD44 expression by CD8<sup>+</sup> T cells<sup>23</sup>. To further prove that Notch signaling controls PD-1 expression by activated CD8<sup>+</sup> T cells, we used a highly specific inhibitor of Notch1 (SAHM1) that was recently developed<sup>24</sup>. SAHM1 is synthetic, cell-permeable, stabilized α-helical peptide of MAML1 that inhibits the binding of full-length MAML1 to the NICD-RBPJκ complex and thus prevents Notch1-induced transcriptional activation<sup>24</sup>. As shown in Figure 3a and b, the use of the Notch transcriptional inhibitors SAHM1 at 45 μM leads to a significant inhibition of PD-1 cell surface expression at 24h post-stimulation. This inhibition is slighter than the one obtained with DAPT, which might be due to reduced cell permeability of SAHM1, a small peptide, compared to the small DAPT compound or to the sole inhibition of Notch1 with SAHM1. As with DAPT, inhibition of the Notch signaling pathway with SAHM1 did not affect the expression of other molecules that are upregulated (CD44 and CD69) or downregulated (CD127) following T cell activation (Figure 3c). The expression of CD25,

CD62L, Notch1 and Notch2 were not affected by DAPT or SAHM1 treatment (data not shown). These results implicate the Notch signaling pathway in the regulation of PD-1 expression following CD8<sup>+</sup> T cell activation.

### **Notch inhibition with DAPT minimally affects CD8<sup>+</sup> T cell proliferation**

Our results showed a specific effect of the Notch signaling pathway in the regulation of PD-1 expression by activated CD8<sup>+</sup> T cells while not affecting the regulation of other activation markers. This suggests that the reduced PD-1 expression observed following Notch inhibition is probably not due to a lower level of CD8<sup>+</sup> T cell activation. To further rule out this possibility, we evaluated the impact of Notch inhibition with DAPT on T cell proliferation, a later event of T cell activation. As shown in Figure 4, the addition of DAPT to the OT-1 T cell-aAPC co-culture only minimally reduced Ag-induced CD8<sup>+</sup> T cell proliferation. A statistically significant difference was only observed with the highest concentration of DAPT and only for cells that have reached the third division (Figure 4b). These results further suggest that the Notch signaling pathway directly controls PD-1 expression since it has only a minimal effect on T cell activation.

### **Notch regulates PD-1 expression throughout activation**

To further confirm that the decreased PD-1 expression on activated CD8<sup>+</sup> T cells following Notch inhibition with DAPT was not due to an effect on T cell activation, we have measured PD-1 expression over cellular division. If the effect of DAPT on PD-1 expression was due to reduced T cell activation, we should observe normal expression of PD-1 in cells that have gone through several rounds of division. However, Notch inhibition leads to a reduction of PD-1 expression independently of the number of cell divisions reached by CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 5). In contrast, in absence of Notch inhibition, PD-1 up-regulation increased with the number of T cell division (Figure 5a). These results clearly demonstrate that Notch inhibition influences PD-1 expression and that this effect does not occur due to reduced T cell activation.

### **Direct regulation of PD-1 expression by the Notch signaling pathway**

To investigate whether Notch signaling directly regulates PD-1 transcription through binding to the PD-1 promoter, we scanned the PD-1 promoter for the presence of putative RBPJK

binding sites. We could identify three putative RBPJ $\kappa$  binding sites within the 3kb of genomic mouse DNA upstream of PD-1 exon 1 and one site in intron 1 (Figure 6a). These sites were conserved in the rat PD-1 promoter suggesting that they have a physiological role. To prove that Notch signaling directly influences PD-1 transcription via formation of a NICD-RBPJ $\kappa$  complex at the PD-1 promoter, we have performed ChIP assays to evaluate if RBPJ $\kappa$  and NICD were bound to the three putative sites. As a first step, we have defined that PD-1 is actively transcribed between 6 and 24h of activation (Figure S1). As shown in Figure 6b and c, RBPJ $\kappa$  and NICD directly bind to the putative RBPJ $\kappa$  binding sites 1 and 3 of the *Pdcd1* gene in activated T cells. These results suggest a direct regulation of *Pdcd1* transcription by the Notch signaling pathway in activated CD8<sup>+</sup> T cells.

## DISCUSSION

Our results identify a role for the Notch signaling pathway in the control of *Pdcd1* transcription during CD8<sup>+</sup> T cell activation. The inhibition of the Notch signaling pathway with either the gamma-secretase inhibitor DAPT or with the Notch transcription inhibitor SAHM1 lead to reduced cell surface expression of PD-1 on CD8<sup>+</sup> T cells following antigenic stimulation. The inhibition of PD-1 expression with the highly specific inhibitor SAHM1 shows that the Notch signaling pathway directly controls PD-1 expression. The reduced inhibition of PD-1 expression that is observed with SAHM1 compared to DAPT can be explained as follows. It is possible, that the effective concentration of the SAHM1 peptide within the cells is lower than the one obtained with DAPT, due to its bigger size. Another possibility might reside in the specificity of SAHM1 that was designed to inhibit the interaction of human Notch1 intracellular domain with the co-activator MAML1<sup>24</sup>. Thus, it is possible that SAHM1 only efficiently inhibits Notch1 while DAPT will inhibit both Notch1 and Notch2, which are both expressed by activated CD8<sup>+</sup> T cells. We can also not exclude that some of the effect of DAPT are not Notch-dependent and occurs via the inhibition of the cleavage of others molecules that are substrates of gamma-sécrétase<sup>22,23</sup>.

Our results also rule out an indirect effect of Notch inhibition on PD-1 expression. Indeed, the inhibition of Notch signaling with DAPT did not affect the expression of other cell surface molecules such as CD44, CD69 and CD127 indicating that DAPT did not inhibit T cell activation. Furthermore, Notch inhibition with DAPT decreased PD-1 expression on activated CD8<sup>+</sup> T cells independently of the number of division reached by the CD8<sup>+</sup> T cells. These results further confirmed that the effect of DAPT on PD-1 expression is specific and not a consequence of reduced cellular activation. Combined with our observation of a direct binding of NICD to the *Pdcd1* promoter, our results are in favor of a direct role of the Notch signaling pathway in *Pdcd1* transcription.

PD-1 is an inhibitory receptor that abrogates cellular response when engaging its ligand. As such, a reduction of PD-1 expression could have led to an enhancement of T cell proliferation. However, we observed a small reduction in T cell proliferation following DAPT treatment. This is probably due to other effect of the DAPT treatment on T cells since the Notch

signaling pathway was shown by others to influence T cell proliferation, differentiation and survival<sup>15, 25, 26</sup>.

The lack of RBPJ $\kappa$  binding to the *Pdcd1* promoter in resting naïve T cells suggests that T cell activation is required to open the chromatin at the *Pdcd1* locus to give RBPJ $\kappa$  access to its consensus sites. Such an activation induced binding of RBPJ $\kappa$  to the GATA-3 promoter has also been reported<sup>27</sup>. Furthermore, the *Pdcd1* promoter is methylated in naïve resting T cells which may impact the accessibility of RBPJ $\kappa$  to its binding sites<sup>28</sup>.

Oestreich et al. demonstrated that the transcription factor NFATc1 regulates PD-1 expression during T cell activation<sup>12</sup>. The NFAT binding site is located near the RBPJ $\kappa$  site on the *Pdcd1* promoter. Therefore, it is possible that during CD8<sup>+</sup> T cell activation, both NICD and NFAT are required to induce PD-1 transcription. This may occur via TCR-induced translocation of NFAT to the nucleus following Ag encounter and via the production of NICD following interaction of Notch receptors expressed by CD8<sup>+</sup> T cells and Notch ligands expressed by APCs. A similar interaction between NFAT and Notch signaling was reported to control keratinocyte growth and differentiation<sup>29</sup>. Further studies should reveal if a similar integration exists following Ag presentation to CD8<sup>+</sup> T cells.

The lack of enrichment of NICD at the *Pdcd1* promoter at 24h post-activation suggested an early role for Notch-induced *Pdcd1* transcription following T cell activation. However, our experiments clearly show that Notch inhibition also impacts PD-1 expression at later stage of CD8<sup>+</sup> T cell activation. Indeed, PD-1 expression is also decreased after 48h of T cell activation and this is also observed in highly activated T cells that have made several rounds of division. Thus, we do not think that Notch is only relevant for the early transcription of *Pdcd1* following T cell activation. The non-significant recruitment of the Notch1 intracellular domain at 24h can be possibly explained by: i) a permanent modification of chromatin structure following Notch1 binding to the promoter; ii) the fact that we used an antibody that only recognized Notch1 for the immunoprecipitation and that activated T cells express both Notch1 and 2; or iii) that the PD-1 protein is very stable. If Notch was responsible for early

transcription of PD-1 and that NFATc was playing a role for the prolonged expression of PD-1, we should have not seen a decreased of PD-1 expression over 48h. However, it is possible, that Notch is recruited first and then imposes a chromatin state were NFATc binds for prolonged period on the *Pdcd1* promoter.

Understanding how PD-1 expression is controlled during T cell activation is of great interest since PD-1 has an important role in regulating immune response as well as tolerance<sup>2, 3, 9-11</sup>. Several studies have demonstrated a role for PD-1 in CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic infection<sup>4-8</sup>. We demonstrated that Notch signaling, which is induced during T cell activation, can control PD-1 expression. We showed that blocking Notch signaling (with DAPT and SAHM1) leads to the inhibition of PD-1 expression probably by preventing the formation of a NICD/RBPJ $\kappa$  complex on the *Pdcd1* promoter. We can postulate that during chronic infection, continued Ag presentation by APCs expressing Notch ligands can lead to a sustained activation of the Notch signaling pathway, which can induce PD-1 expression on T cells maintaining them into an exhausted state. If this is the case, inhibiting the Notch signaling pathway during chronic infection should allow to restore T cell function and to cure the infection.

## **METHODS**

### **Mice**

Mice were bred under specific-pathogen-free condition in accordance with the Animal Care Committee. OT-1 mice, on a RAG-deficient background, expressed a TCR specific for the OVA<sub>257-264</sub> peptide in the context of Kb30.

### **T cell activation and proliferation assays**

The fibroblast cell line MEC.B7.SigOVA (aAPC) transfected with B7-1 and a minigene encoding the OVA<sub>257-264</sub> peptide was a gift from Dr Schoenberger<sup>31</sup>. Irradiated (3000 rad) aAPCs were seeded at 500,000 cells per well in 6-well plates and cultured overnight. Wells were washed to remove non-adherent cells and debris.  $3 \times 10^6$  OT-1 cells were added and cultured for 24h or 48h (as indicated in the Figure legends) with different doses of the gamma-secretase inhibitor DAPT (Sigma) or the Notch transcription factor inhibitor SAHM1 (Millipore) or DMSO. To measure proliferation, OT-1 T cells were labeled with CFSE (0.5  $\mu$ M) before co-cultured for 48h on aAPCs.

Total splenocytes from 8- to 12-wk-old C57BL/6 mice were stimulated with coated anti-mouse CD3 $\epsilon$  (1 $\mu$ g/ml) and soluble anti-mouse CD28 (5 $\mu$ g/ml) Abs for 72h. After activation, cells were stained as previously described<sup>32</sup> with anti-CD8 (BD Bioscience), anti-CD69 (Cedarlane), anti-CD127 (eBioscience), anti-CD44 (Biolegend), anti-Notch1 (Biolegend), anti-Notch2 (Biolegend) and anti-PD-1 (Biolegend) Abs.

### **RT-PCR and quantitative real-time PCR**

RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen) and reverse transcribed into cDNA using Superscript II with oligo(dT) primers (Invitrogen) followed by conventional or quantitative PCR as previously described<sup>32,33</sup>. Primer sequences are shown in Table S1.

### **ChIP**

ChIP assays were performed according to the manufacturer's instructions (Millipore) starting with  $10^6$  OT-1 naive T cells or OT-1 T cells primed on aAPCs for 6 and 24h. Abs used were

goat anti-RBPJ $\kappa$  clone D20 (Santa Cruz Biotechnology) and rabbit polyclonal to activated Notch1 (Abcam). The kidney-specific Tamm-Horsfall gene promoter (Thp), which does not have any consensus RBPJ $\kappa$  binding site, was used as internal control. Primers are described in Table S1. Fold enrichment was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method, where  $\Delta\Delta C_T$  is calculated as follows: (ChIP  $C_T$  – input  $C_T$  of the target region) – (ChIP  $C_T$  – input  $C_T$  of the reference region).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

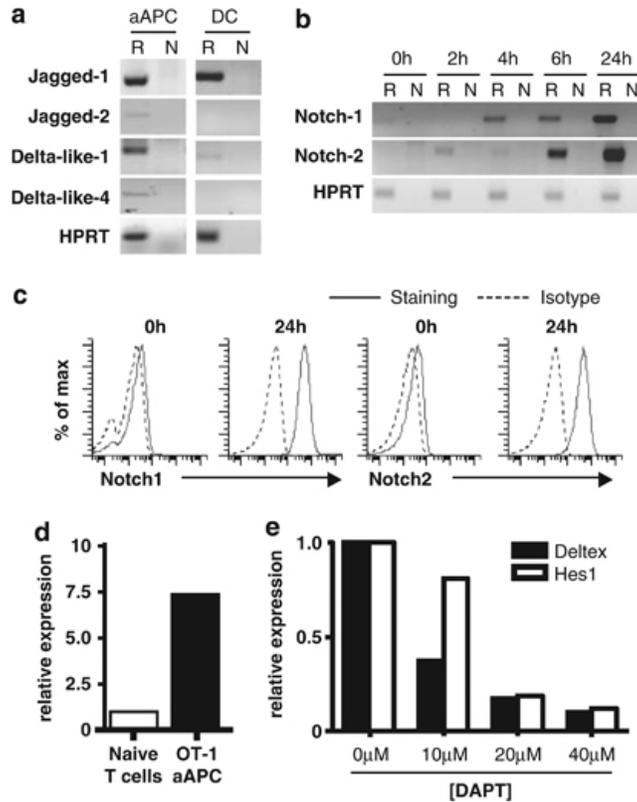
We thank members of the laboratory for helpful discussions; S. Lesage for critical reading of the manuscript; N. Henley and M. Dupuis for cell sorting; J. Dubeau and the animal care staff for mice husbandry. We thank S. Schoenberger for providing the aAPC cell line. We are grateful to É. Milot, L. Mavoungo, S. Bottardi and J. Ross for guidance with the ChIP experiments. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research. M.M. was supported by a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and currently holds a studentship from the Fonds de recherche du Québec-Santé. P.T. holds a fellowship from the Juvenile Diabetes Research Foundation

## REFERENCES

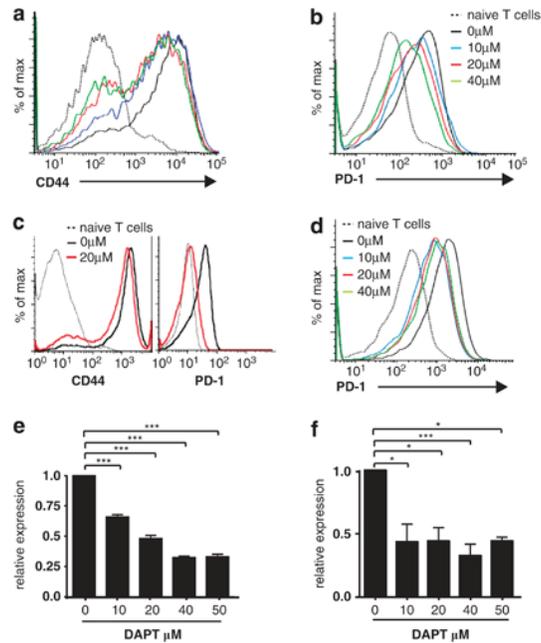
1. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11: 3887-95.
2. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192: 1027-34.
3. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2: 261-8.
4. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439: 682-7.
5. Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 2007; 109: 4671-8.
6. Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, Kaminski M et al. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 2008; 134: 1927-37, 37 e1-2.
7. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 2006; 203: 2281-92.
8. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006; 12: 1198-202.
9. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11: 141-51.
10. Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, Smith RN, Yagita H, Akiba H et al. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 2003; 198: 63-9.

11. Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol* 2009; 10: 1185-92.
12. Oestreich KJ, Yoon H, Ahmed R, Boss JM. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J Immunol* 2008; 181: 4832-9.
13. Terawaki S, Chikuma S, Shibayama S, Hayashi T, Yoshida T, Okazaki T et al. IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *J Immunol*; 186: 2772-9.
14. Kao C, Oestreich KJ, Paley MA, Crawford A, Angelosanto JM, Ali MA et al. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol*; 12: 663-71.
15. Radtke F, Fasnacht N, MacDonald HR. Notch signaling in the immune system. *Immunity* 2010; 32: 14-27.
16. Struhl G, Adachi A. Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* 1998; 93: 649-60.
17. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999; 398: 518-22.
18. Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 1999; 18: 2196-207.
19. Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, Kawaichi M, Fukamizu A, Kishi N et al. Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 45031-40.
20. Cho OH, Shin HM, Miele L, Golde TE, Fauq A, Minter LM et al. Notch regulates cytolytic effector function in CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2009; 182: 3380-9.
21. Maekawa Y, Minato Y, Ishifune C, Kurihara T, Kitamura A, Kojima H et al. Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* 2008; 9: 1140-7.
22. Lleo A. Activity of gamma-secretase on substrates other than APP. *Curr Top Med Chem* 2008; 8: 9-16.

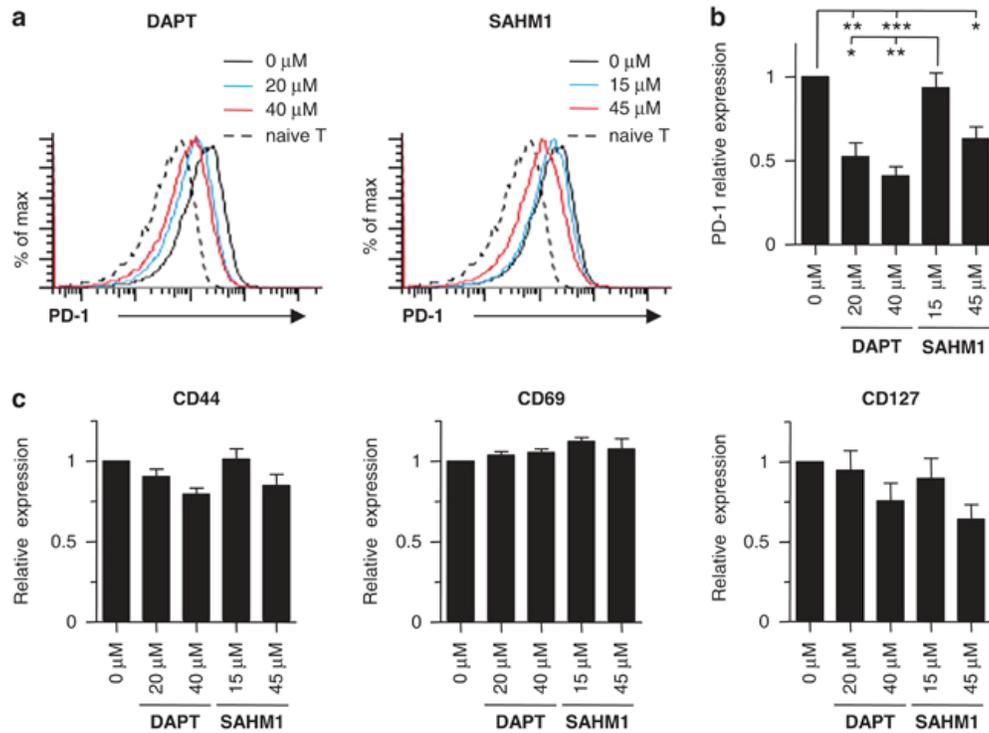
23. Pelletier L, Guillaumot P, Freche B, Luquain C, Christiansen D, Brugiere S et al. Gamma-secretase-dependent proteolysis of CD44 promotes neoplastic transformation of rat fibroblastic cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 3681-7.
24. Moellering RE, Cornejo M, Davis TN, Del Bianco C, Aster JC, Blacklow SC et al. Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature* 2009; 462: 182-8.
25. Palaga T, Miele L, Golde TE, Osborne BA. TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-gamma production in peripheral T cells. *J. Immunol.* 2003; 171: 3019-24.
26. Helbig C, Gentek R, Backer RA, de Souza Y, Derks IA, Eldering E et al. Notch controls the magnitude of T helper cell responses by promoting cellular longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; 109: 9041-6.
27. Fang TC, Yashiro-Ohtani Y, Del Bianco C, Knoblock DM, Blacklow SC, Pear WS. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 2007; 27: 100-10.
28. Youngblood B, Oestreich KJ, Ha SJ, Duraiswamy J, Akondy RS, West EE et al. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity* 2011; 35: 400-12.
29. Mammucari C, Tommasi di Vignano A, Sharov AA, Neilson J, Havrda MC, Roop DR et al. Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev Cell* 2005; 8: 665-76.
30. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 1994; 76: 17-27.
31. van Stipdonk MJ, Lemmens EE, Schoenberger SP. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2001; 2: 423-9.
32. Allard EL, Hardy MP, Leignadier J, Marquis M, Rooney J, Lehoux D et al. Overexpression of IL-21 promotes massive CD8<sup>+</sup> memory T cell accumulation. *Eur J Immunol* 2007; 37: 3069-77.
33. Leignadier J, Labrecque N. Epitope density influences CD8 memory T cell differentiation. *PLoS One* 2010; 5: e13740



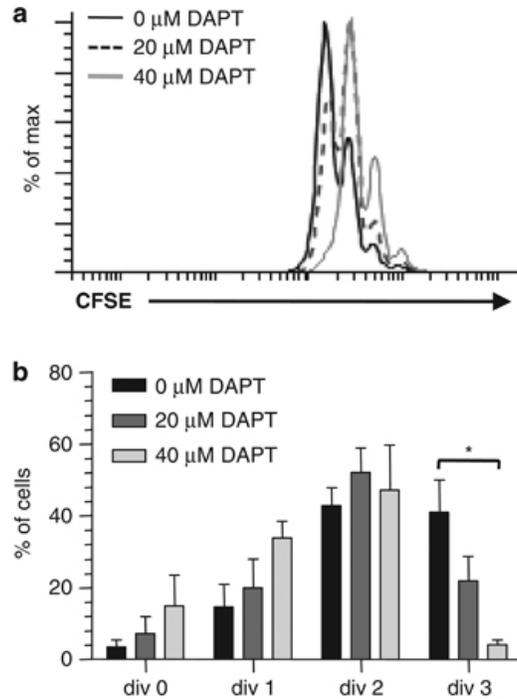
**Figure 1 Notch signaling in OT-1 T cells. (a-b) Notch ligands (a) and receptors (b) expression by APCs and OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells.** RNA was extracted from LPS matured DCs, aAPCs, naive and sorted OT-1 T cells that were stimulated with aAPCs for 2, 4, 6 or 24 hours. Notch ligands and receptors expression were studied by RT-PCR. HPRT was used as an internal control. R: reverse transcription and N: no reverse transcription. (c) Notch1 and Notch2 expression is induced following activation of OT-1 T cells. Unstimulated (0h) or OT-1 T cells stimulated for 24h with aAPCs were stained with anti-Notch1 and anti-Notch2 antibodies. (d) Induction of *Hes1* expression following aAPC activation of OT-1 T cells. RNA was extracted from sorted OT-1 T cells primed on aAPCs for 24h and RT-qPCR was realized to study *Hes1* expression. Target gene expression is normalized to HPRT. (e) Inhibition of the induction of *Hes1* and *Deltex* by DAPT in OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells. Different concentrations of DAPT were added during the priming of OT-1 T cells with aAPCs. After 24h of stimulation, OT-1 T cells were sorted before RNA extraction and reverse-transcription. *Dtx1* and *Hes1* mRNA expression was assessed by qPCR. Target gene expression is normalized to HPRT. The results are from 3 to 4 independent experiments.



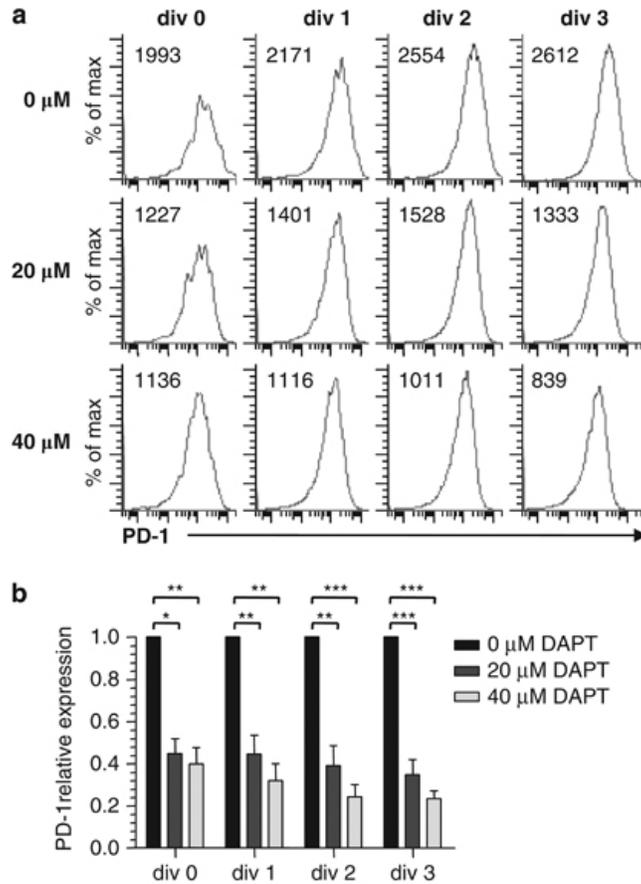
**Figure 2 Notch1 signaling controls PD-1 up-regulation in activated OT-1 T cells. (a) CD8<sup>+</sup> T cell activation is minimally influenced by Notch signaling.** OT-1 T cells were co-cultured with aAPCs for 24h in the presence of DAPT (0 to 50  $\mu$ M) followed by detection of CD44 up-regulation. (b) Inhibition of Notch signaling leads to defective expression of PD-1 following CD8<sup>+</sup> T cell activation. OT-1 T cells were stimulated as in a and stained with anti-PD-1 Ab. (c) DAPT inhibits PD-1 expression even when CD8<sup>+</sup> T cell activation is not affected. OT-1 T cells were primed on aAPCs for 24h with or without 20  $\mu$ M of DAPT followed by staining with anti-CD44 and anti-PD-1 Abs. (d) Inhibition of PD-1 expression in polyclonal CD8<sup>+</sup> T cells by DAPT. Total splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 Abs for 72h. The overlay shows PD-1 expression on CD8<sup>+</sup> T cells stimulated in the presence of different DAPT concentrations. (e) Quantification of PD-1 expression. OT-1 T cells were stimulated as in a. The graph illustrates the relative expression of PD-1 in DAPT treated OT-1 T cells compared to untreated cells. (f) *Pdccl1* transcription is regulated by Notch signaling. OT-1 T cells were primed on aAPCs for 24h with different concentrations of DAPT. CD8<sup>+</sup> T cells were sorted before RNA extraction followed by RT-qPCR analysis of PD-1 expression. *Pdccl1* expression was normalized to *Hprt*. *Pdccl1* relative expression to untreated activated T cells is shown. The data are from at least three independent experiments. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance between groups was tested using Anova; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



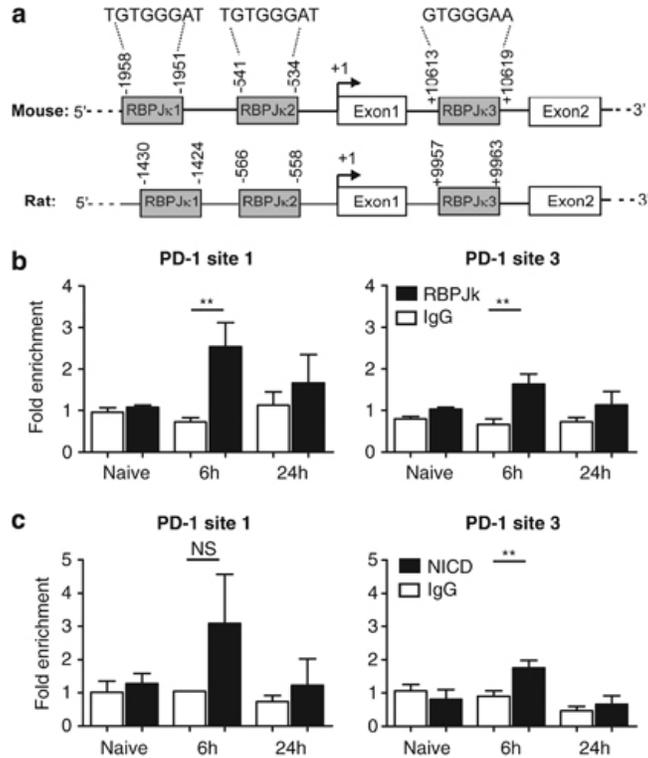
**Figure 3 Specific inhibition of the Notch transcriptional complex affects PD-1 up-regulation following CD8<sup>+</sup> T cell activation.** (a) The Notch transcription factor inhibitor SAHM1 inhibits PD-1 expression following CD8<sup>+</sup> T cell activation. OT-1 T cells were stimulated as in Figure 2a in the presence of different concentrations of DAPT or SAHM1 for 24h and then stained with anti-PD-1 Ab. The overlays show PD-1 expression following DAPT (left) or SAHM1 (right) treatment. Naïve cells were included as a negative control. (b) Quantification of PD-1 expression. OT-1 T cells were stimulated as in a. The graph illustrates the relative expression of PD-1 in DAPT or SAHM1 treated OT-1 T cells compared to untreated cells. (c) SAHM1 or DAPT does not affect the expression of CD44, CD69 and CD127 by activated CD8<sup>+</sup> T cells. OT-1 T cells were stimulated as in a. The graph illustrates the relative expression in DAPT or SAHM1 treated OT-1 T cells compared to untreated cells. The data are from four independent experiments. Data are represented as mean +/- SEM. Statistical significance between groups was tested using Anova; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 4 Notch inhibition with DAPT minimally affects CD8<sup>+</sup> T cell proliferation.** (a) Effect of DAPT on T cell proliferation. CFSE-labeled OT-1 T cells were co-cultured for 48h with aAPCs. The overlay shows CFSE fluorescence intensity of OT-1 T cells stimulated with aAPCs in the presence or absence of DAPT. (b) Notch inhibition influences the number of division reached by CD8<sup>+</sup> T cells following antigenic stimulation. The percentage of cells that have attained a certain division (div) is indicated. The data are from three independent experiments. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance between groups was tested using Anova; \*  $p < 0.05$ .



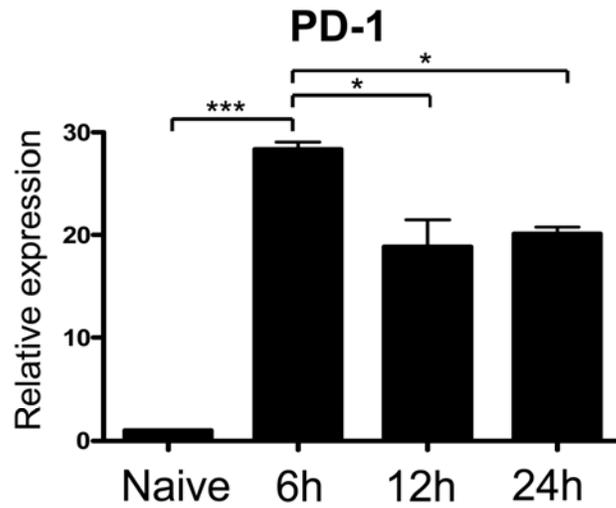
**Figure 5 DAPT inhibition of PD-1 expression is sustained through division.** (a) Reduced PD-1 expression by CD8<sup>+</sup> T cells following Notch inhibition occurs independently of the number of division achieved by T cells. OT-1 T cells were stimulated as in Figure 4 and stained with anti-PD-1 Ab. The histogram shows PD-1 expression by activated CD8<sup>+</sup> T cells in function of the number of divisions. The MFI of PD-1 expression is indicated on each histograms. (b) Quantification of PD-1 expression in function of the number of divisions. The graph illustrates the relative expression of PD-1 in DAPT treated OT-1 T cells compared to untreated cells. The data are from three independent experiments. Data are represented as mean +/- SEM. Statistical significance between groups was tested using Anova; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 6 Notch signaling directly regulates PD-1 transcription.** (a) Analysis of the PD-1 gene identifies three conserved RBPJ $\kappa$ -binding sites. Numbers indicate distances in base pairs from exon 1. (b-c) ChIP of RBPJ $\kappa$  (b) and NICD (c) at putative RBPJ $\kappa$  binding sites of the PD-1 promoter. OT-1 T cells were activated on aAPCs for 6 or 24h. ChIP was performed using anti-RBPJ $\kappa$  or anti-NICD Ab followed by qPCR analysis. The kidney-specific Tamm-Horsfall gene promoter, which does not have any RBPJ $\kappa$  binding site, was used as internal control. Fold enrichment was calculated as described in Methods. The data are from at least 2 independent experiments. \*\* $p < 0.02$ .

**TABLE S1. PCR primers**

<b>Gene</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Application</b>
Jagged-1	GGATGATGGGAACCCTGTCAAG	TGTTTATTTGTCCAGTTCGGGTG	RT-PCR
Jagged-2	CGCACCTGCACACATAACACCAAT	GTCGGGCACAGTTGTTGTCCAAAT	RT-PCR
Delta-like-1	GTCACAGAGCTCTGCAGGAG	TGTGGGCAGTGCCTGCTTCC	RT-PCR
Delta-like-4	GCACCAACTCCTTCGTCGTC	TCACAAAACAGACCTCCCCA	RT-PCR
Notch1	TGTTAATGAGTGCATCTCCAA	CATTCGTAGCCATCAATCTTGTCC	RT-PCR
Notch2	TGGAGGTAAATGAATGCCAGAGC	TGTAGCGATTGATGCCGTC	RT-PCR
HPRT	GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC	CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA	RT-PCR
PD-1	CGGTTTCAAGGCATGGTCATTGGT	TTCAGAGTGTCGTCCTTGCTTCA	RT-qPCR
Deltex-1	TGAGGATGTGGTTCGGAGGT	CCCTCATAGCCAGATGCTGTG	RT-qPCR
Hes-1	ATAGCTCCCGGCATTCCAAG	GCGCGGTATTTCCCAACA	RT-qPCR
HPRT	CTCCTCAGACCGCTTTTTGC	TAACCTGGTTCATCATCGCTAATC	RT-qPCR
PD-1 site 1	CGGGTCCTAGGAAATGTTCA	ATGCCCTGAGCTATGCCTTA	ChIP
PD-1 site 3	AAGAGCCCTGCTTGTTGGAGGTTA	ACCCATTCCAGGGCAGAATATCGT	ChIP
THP	GGTGGATGGTGTGGTCACAAC	GGTCTTGACACACCAGCTTT	ChIP



**FIGURE S1. Kinetic of PD-1 transcription.** OT-1 T cells were activated with aAPCs for 6, 12 and 24h before by cell sorting and RT-qPCR analysis. Relative expression to naïve OT-1 T cells is shown. The data are from at least 2 independent experiments. \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

## **Article III: Context dependent role for the Notch signalling pathway during CD8<sup>+</sup> T cell responses**

**Mélissa Mathieu<sup>\*\*1</sup>, Frédéric Duval<sup>\*\*1</sup> et Nathalie Labrecque<sup>\*\*§</sup>**

Cet article est en préparation pour soumission

Ce troisième papier répond au second objectif de ma thèse soit d'élucider le rôle de la voie de signalisation Notch dans la réponse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> *in vivo*. Pendant plusieurs années, j'ai dû réaliser plusieurs croisements de souris afin d'obtenir celles nécessaires aux expérimentations. De plus, je suis allée en Californie dans le laboratoire du Dr. Schoenberger afin d'apprendre les infections avec *Listeria*. À mon retour, j'ai mis en place les procédures afin de travailler avec ce nouvel agent pathogène et j'ai réalisé diverses expériences préliminaires afin de démontrer que ce modèle était bien fonctionnel. Je suis co-premier auteur avec F. Duval qui est l'étudiant au doctorat qui poursuivra le projet dans le but de découvrir les mécanismes précis expliquant les phénotypes que nous observons. J'ai réalisé les premières expériences *in vivo* et par la suite, F. Duval s'est joint à moi. À deux, nous avons pu augmenter la taille des expériences afin d'obtenir des résultats rapidement. Nous avons chacun une contribution technique de 50 %. Tous les auteurs ont contribué à la conception et à l'interprétation des expériences mais c'est principalement moi qui ai effectué les analyses, les compilations et les statistiques (contribution conceptuelle 85-90 %). C'est aussi moi qui ai écrit le papier, avec les judicieux conseils de N. Labrecque (contribution 75 % à l'écriture). Finalement, j'aurai la tâche d'effectuer les modifications et la soumission du papier.

## **Context dependent role for the Notch signalling pathway during CD8<sup>+</sup> T cell responses**

**Mélissa Mathieu<sup>\*\*1</sup>, Frédéric Duval<sup>\*\*1</sup> et Nathalie Labrecque<sup>\*†§</sup>**

\*Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, †Department of Microbiology and Immunology and §Department of Medicine, University of Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada

Address correspondence : Nathalie Labrecque

<sup>1</sup> both authors contributed equally to this work

## ABSTRACT

Following an infection, naive CD8<sup>+</sup> T cells expand and differentiate into two main populations of effectors: short-lived effector cells (SLECs) and memory precursor effector cells (MPECs). The mechanisms governing this cell fate decision await better understanding. This study demonstrates that the Notch signalling pathway controls the MPEC/SLEC differentiation choice following both *Listeria* infection and dendritic cell immunisation of mice. Although fewer SLECs were generated, Notch-deficiency did not alter the rate of memory CD8<sup>+</sup> T cell generation. However, the Notch signalling pathway was required for optimal IFN- $\gamma$  production by effector and memory CD8<sup>+</sup> T cells only after dendritic cell immunisation, suggesting a context dependent role for the Notch signalling pathway. Our results reveal critical roles for the Notch signalling pathway during effector CD8<sup>+</sup> T cell differentiation.

## INTRODUCTION

Following antigen (Ag) encounter, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes become activated, proliferate and differentiate into effector T (Te) cells able to kill target cells and secrete cytokines. Following pathogen clearance, about only 5-10% of Te cells will survive and further differentiate into long-lived memory T (Tm) lymphocytes. The generation of Tm cells is essential for protection against re-infection.

The differentiation of naïve CD8<sup>+</sup> T cells into effectors and memory T cells requires the proper integration of several signals provided by the Ag-presenting cell (APC) and the environment in which the immune response occurs. At the peak of the CD8<sup>+</sup> T cell response, different subsets of effectors can be identified using CD127 and KLRG1 expression (1, 2). The short-lived effector cells (SLECs; CD127<sup>lo</sup>KLRG-1<sup>hi</sup>) are destined to die during the contraction phase of the CD8<sup>+</sup> T cell response while the memory precursor effector cells (MPECs; CD127<sup>hi</sup>KLRG-1<sup>lo</sup>) 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 favours 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-2R $\alpha$  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 naïve CD8<sup>+</sup> T cells into Te and Tm cells.

The Notch signalling 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 immunoglobulin k J region). This displaces the co-repressors associated with RBPJ and allows assembly of a transcriptional activator complex (NICD, MAML1-3 and MED-8 mediator transcription activation complex) which induces transcription of target genes (7). *HES* family members are common targets of Notch signalling in many tissues while 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 signalling 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 signalling pathway also regulates T cell responses. Indeed, T cells express Notch receptors while APCs can express the ligands (12). In CD4<sup>+</sup> T cells, Notch signalling was shown to regulate the differentiation and response of various T helper cell subsets (12). It was initially reported that the induction of different Notch ligands by danger signal on DCs controls the Th1 and Th2 differentiation choice (13). It was then shown that the Notch signalling pathway was important for the differentiation of several Th cell subsets (12). Indeed, the Notch signalling pathway was shown to directly regulate the transcription of *Tbx21* (encoding for T-bet) and to increase IFN- $\gamma$  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 signalling pathway was also shown to regulate Th9, Th17 and Treg differentiation (18-20). A mechanism by which the Notch signalling pathway could orchestrate the various Th differentiation program was recently identified by the group of Pear (21). It appears that this pathway does not dictate the Th differentiation choice but rather potentiates the cytokine signal received by CD4<sup>+</sup> T cells during differentiation. Thus, by itself, the Notch signalling pathway cannot initiate the differentiation of CD4<sup>+</sup> 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 signalling pathway during CD8<sup>+</sup> T cell responses and most experiments have been performed *in vitro*. Notch signalling was shown to directly regulate, via binding of the NICD to their promoter, the transcription of many effector molecules such as perforin, granzyme B and IFN- $\gamma$  in mouse CD8<sup>+</sup> T cells (22-24). Similarly, the Notch signalling pathway controls the production of IFN- $\gamma$  by human CD8<sup>+</sup> T cells (25). Furthermore, the transcription factor Eomes was also shown to be a transcriptional target of the Notch signalling pathway in *in vitro* activated CD8<sup>+</sup> T cells (23). *In vivo*, Notch2 expression by CD8<sup>+</sup> T cells was reported to be essential for the efficient killing of target cells (24), for the control of *T. cruzi* infection (24) and for potent antitumor activity (26). Moreover, inhibition of the Notch signalling pathway using either genetic deletion of *Rbpj* or expression of a dominant negative form of MAML was shown to protect mice from GVHD (27, 28). The protective effect of Notch inhibition was not a consequence of decreased alloreactive CD8<sup>+</sup> T cell expansion but was likely the result of defective INF- $\gamma$  production (27, 28). However, in this system, Eomes expression was increased while T-bet expression was preserved (27, 28). Very interestingly, inhibition of the Notch signalling pathway during GVHD did not alter the ability of CD8<sup>+</sup> T cells to lyse tumour cells (28) suggesting that not all the effector functions of CD8<sup>+</sup> T cells are regulated by Notch.

Over the last years, the Notch signalling pathway has been shown to have the capacity to regulate different aspects of CD8<sup>+</sup> T cell response following Ag encounter. However, the *in vivo* role of the Notch signalling pathway during infection and vaccination has never been properly assessed. In this manuscript, we have addressed the requirement for Notch signalling

during *in vivo* CD8<sup>+</sup> 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 if the role of the Notch signalling pathway is influenced by the inflammatory context in which the immune response occurs. In this study, we report that Notch signalling influences the formation of SLECs following *Listeria* infection and DC vaccination while it is dispensable for memory T cell differentiation. However, the Notch signalling pathway was only required for maximal IFN- $\gamma$  production after DC vaccination, revealing a context-dependent role for this pathway during *in vivo* CD8<sup>+</sup> T cell response.

## MATERIAL AND METHODS

### *Mice*

Notch1<sup>fl/fl</sup> (B6.129X1-Notch1<sup>tm2Rko</sup>/GridJ) (29), Notch2<sup>fl/fl</sup> (B6.129S-Notch2<sup>tm3Grid</sup>/J) (30) and E8I-cre (C57BL/6-Tg(Cd8a-cre)1Itan/J) (24) mice were purchased from the Jackson Laboratory. Notch1<sup>fl/fl</sup> were backcrossed to the C57BL/6 background and bred to Notch2<sup>fl/fl</sup> and E8I-Cre to obtain E8-Cre<sup>+/-</sup>Notch1<sup>fl/fl</sup>Notch2<sup>fl/fl</sup> mice (Notch1/2 deficient mice,  $\Delta/\Delta$ ) and their Notch1<sup>fl/fl</sup>Notch2<sup>fl/fl</sup> littermates (Notch1/2 sufficient mice, fl/fl). Mice were housed at the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center Facility, in a pathogen-free environment and treated in accordance to the Canadian Council on Animal Care guidelines.

### *Listeria monocytogenes* infection, dendritic cell immunisation and analysis of T cell response

*Listeria monocytogenes* expressing ovalbumin (Lm-OVA) was grown as previously described (31). A sub-lethal dose of  $2 \times 10^3$  CFUs was injected i.v. for analysis of primary T cell response while a lethal dose of  $2 \times 10^5$  CFUs was used for challenge experiments. Bone-marrow derived DCs (DCs) were generated as previously described (32), matured with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), loaded overnight with the OVA<sub>257-264</sub> peptide (SIINFEKL, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Midwest biotech).  $1.25 \times 10^6$  DCs were injected i.v. for vaccination. The primary endogenous CD8<sup>+</sup> T cell response was analysed in the spleen with either K<sup>b</sup>-OVA tetramer staining or with intracellular cytokine staining following a short *in vitro* stimulation with the OVA peptide.

### *Antibodies and flow cytometry*

Anti-CD44 (IM7), anti-CD8 (53-6.7), anti-Notch1 (HMN1-12) and anti-Notch2 (HMN1-35) antibodies (Abs) were from Biolegend; anti-IFN- $\gamma$  (XMG1.2) Ab was from LifeTechnology; anti-CD127 (A7R34), anti-KLRG1 (2F1), anti-T-bet (4B10) and anti-Eomes (Dan11mag) Abs were from eBioscience. Cell surface staining, intracellular staining, tetramer staining, OVA peptide loading on Kb MHC were performed as previously described (32-34).

### *Statistical analysis*

Statistical analyses for differences between Notch1/2 sufficient and Notch1/2 deleted mice were done using Student's T-test. All tests were two-sided and  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### *Notch signalling controls SLEC differentiation*

To elucidate the role of the Notch signalling pathway during *in vivo* CD8<sup>+</sup> T cell response, Notch1 and Notch2 expression was specifically abrogated in mature CD8<sup>+</sup> T cells using *Notch1<sup>fl/fl</sup>Notch2<sup>fl/fl</sup>-E8I-Cre<sup>+/-</sup>* mice (referred as Notch1/2 deficient mice or  $\Delta/\Delta$  through the manuscript). These mice express the Cre recombinase under the CD8 $\alpha$  enhancer allowing for Notch1 and Notch2 deletion only in the mature CD8<sup>+</sup> T cells (24, 35). It was shown by us and others that CD8<sup>+</sup> T cells up-regulate Notch1 and Notch2 expression following TCR stimulation (22, 24, 36, 37). However *Notch3* and *Notch4* mRNA were not increased ((24, 38) and data not shown) thus the deletion of *Notch1* and *Notch2* genes should completely abrogate Notch signalling in CD8<sup>+</sup> T cells. The efficient and specific deletion of the *Notch1* and *Notch2* genes in mature CD8<sup>+</sup> T cells was assessed by flow cytometry. Indeed no Notch1 and Notch2 cell surface expression could be detected on CD8<sup>+</sup> T cells from Notch deficient mice following TCR stimulation (Fig. S1). Moreover, mice with deletion of the Notch1 and Notch2 genes in CD8<sup>+</sup> T cells did not show any difference in peripheral CD8<sup>+</sup> T cell populations (naïve, effector and memory) nor in the expression of various cell surface markers (TCR,

CD3, CD44, CD62L, CD127, CD25, CD5 and TCRV $\beta$  usage) in the steady-state when compared to their wild-type littermates (data not shown).

To delineate the role of the Notch signalling pathway in CD8<sup>+</sup> T cell response, Notch1/2 sufficient and deficient mice were infected with a sub-lethal dose of *Listeria monocytogenes* expressing ovalbumin (Lm-OVA) allowing us to follow the response of OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells in an inflammatory environment. The effector response was assessed in the spleen 7 days post-infection using K<sup>b</sup>-OVA tetramer staining. As shown in Fig. 1A and B, Notch-deficiency in CD8<sup>+</sup> T cells promoted a better expansion of OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells compared to their wild-type counterpart. The phenotypic characterization of the effectors generated revealed a crucial role for Notch signalling for their proper differentiation into SLECs (Fig. 1C and D). OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells lacking expression of Notch1/2 show a two-fold reduction in the proportion of SLECs. Although, less SLECs were generated by Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  CD8<sup>+</sup> T cells, this did not lead to their conversion into MPECs (Fig. 1C and D). However, an increase in early effector cells (EECs; KLRG1<sup>low</sup> and CD127<sup>low</sup>), the precursors of both SLECs and MPECs (39), is also observed in Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  mice (Fig. 1C and D) suggesting that Notch-deficiency is important for the EEC to SLEC transition but not for the differentiation of EECs into MPECs. To confirm the role of the Notch signalling pathway during CD8<sup>+</sup> T cell responses, we immunized mice with LPS-matured DCs pulsed with the OVA peptide. In this system, the CD8<sup>+</sup> T cell response is primed in a low inflammation setting and as a result less SLECs are generated, while memory T cell differentiation is accelerated (1, 32, 40, 41). Although CD8<sup>+</sup> T cell expansion was similar in absence or presence of Notch signalling (Fig. 2A and B), SLEC generation was almost abrogated following DC vaccination in Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  mice (Fig. 2C and D). Therefore, the Notch signalling pathway plays a very important role during CD8<sup>+</sup> T cell differentiation irrespective of the inflammation level. The level of expression of the transcription factors T-bet controls the SLEC/MPEC differentiation choice (1). Increased level of T-bet promotes the generation of SLECs (1). Furthermore, no SLECs are generated in absence of T-bet (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. Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  CD8<sup>+</sup> effectors express similar level of T-bet than Notch<sup>fl/fl</sup> effectors (Fig. S2A and B). This suggests that Notch

influences the expression of other transcription factors or molecules controlling SLEC differentiation.

*Notch controls optimal IFN- $\gamma$  production following DC vaccination but not following Listeria infection*

Our results clearly indicate that the Notch signalling pathway affects effector differentiation. We then tested whether the functionality of CD8<sup>+</sup> Te cells was also impaired in absence of Notch1/2. Following *Listeria* infection, we found a similar frequency of CD8<sup>+</sup> Te cells producing IFN- $\gamma$  in Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  and Notch<sup>fl/fl</sup> mice following a short *in vitro* stimulation with the OVA peptide (Fig. 3A and C). Furthermore, the amount of IFN- $\gamma$  produced by cells was also comparable between Notch1/2 deficient and sufficient effectors (Fig 3 A and C). However, a different picture emerged following DC vaccination, very few Notch deficient CD8<sup>+</sup> Te cells produced IFN- $\gamma$  and the amount produced by each cell was also severely decreased (Fig 3 B and D). In both models, IL-2 secretion was similar between Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  and Notch<sup>fl/fl</sup> effectors (Fig. S3). These results suggest a differential role for the Notch signalling pathway in the regulation of IFN- $\gamma$  production by CD8<sup>+</sup> effectors depending on the context of the CD8<sup>+</sup> T cell response.

The two transcription factors T-bet and Eomes have been shown to be important to regulate IFN- $\gamma$  expression in CD8<sup>+</sup> T cells (42, 43). Indeed, in absence of both transcription factors, effector CD8<sup>+</sup> T cells lose their ability to produce IFN- $\gamma$  while single-deficiency did not alter their ability to produce IFN- $\gamma$  (42, 43). Interestingly, *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 reduction of IFN- $\gamma$  production by Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  effectors generated following DC vaccination (Fig. S2A and B). Therefore, we evaluated whether Eomes expression was affected by Notch-deficiency. As shown in Fig. S2C and D, 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. S2C and D), suggesting that this reduction is not responsible for the defective production of IFN- $\gamma$  by Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  effectors following DC vaccination.

To evaluate if the reduction in IFN- $\gamma$  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 $^+$  T<sub>H</sub> cells to produce IFN- $\gamma$  (44, 45). 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. 3E). However, Notch $^{\Delta\Delta}$  CD8 $^+$  effectors generated with DC vaccination were inefficient at controlling bacterial growth (Fig. 3F) while their wild-type counterparts were very effective.

*Notch signalling is not required for the generation of CD8 $^+$  T<sub>H</sub> cells*

In the absence of Notch signalling, OVA-specific CD8 $^+$  T<sub>H</sub> cells successfully differentiate into MPECs. However, these MPECs express less Eomes (Fig. S2), which may affect their differentiation into long-lived CD8 $^+$  T<sub>H</sub> cells. We then evaluated whether these MPECs efficiently give rise to T<sub>H</sub> cells. At day 45 post-infection with Lm-OVA or post-vaccination with DCs, OVA-specific CD8 $^+$  T<sub>H</sub> cells were generated regardless of the expression of Notch1 and Notch 2 receptors (Fig. 4A and B). However, Notch1/2-deficiency leads to an increased yield (% T<sub>H</sub> cells/% of T<sub>H</sub> cells) of OVA-specific CD8 $^+$  T<sub>H</sub> cells following DC vaccination but not following *Listeria* infection (Fig. 4A and B). These results indicate that the Notch signalling pathway does not provide necessary signals for CD8 $^+$  T<sub>H</sub> cell generation and that in some circumstances it may be deleterious to CD8 $^+$  T<sub>H</sub> cell differentiation.

Although OVA-specific CD8 $^+$  T<sub>H</sub> cells were generated in Notch $^{\Delta\Delta}$  mice, it was important to evaluate if Notch-deficiency had altered their functionality. To address that, we evaluated their capacity to produce cytokines following a short *in vitro* re-stimulation with the OVA peptide. Similarly to what was observed during the effector phase of the response, no difference in IFN- $\gamma$  production was observed in Notch $^{\Delta\Delta}$  and Notch $^{fl/fl}$  OVA-specific CD8 $^+$  T<sub>H</sub> cells that were generated following Lm-OVA infection (Fig. 4C). However, a lower frequency of OVA-specific CD8 $^+$  T<sub>H</sub> cells produce IFN- $\gamma$  in Notch $^{\Delta\Delta}$  mice compared to wild-type mice following DC immunisation (Fig. 4D). Moreover, the amount of IFN- $\gamma$  produced on a per cell

basis is significantly lower in OVA-specific CD8<sup>+</sup> Tm cells lacking expression of the Notch1 and Notch2 receptors (Fig. 4D). Thus, in absence of Notch1/2, the ability to produce IFN- $\gamma$  is permanently impaired following DC vaccination.

## DISCUSSION

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

In this study, we are the first to report that the Notch signalling pathway is very important for the proper generation of SLECs during both the response of CD8<sup>+</sup> T cells to infection and vaccination. One mechanism by which Notch signalling could have impacted SLEC differentiation is via its ability to regulate T-bet expression. Indeed, T-bet has been reported to be a direct transcriptional target of Notch in CD4<sup>+</sup> T cells (14, 15). In CD8<sup>+</sup> T cells, inhibition of Notch signalling following *in vitro* stimulation of CD8<sup>+</sup> 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). However, we did not observe any difference in the expression level of T-bet between Notch-deficient and wild-type effectors. Our results are in agreement with other studies where no effect of the Notch signalling pathway on T-bet expression by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was observed during GVHD (27, 28). Therefore, the effect of the Notch signalling pathway during SLEC differentiation is not via the direct regulation of T-bet expression. This further suggests that Notch deficiency does not affect SLEC differentiation via a modulation of the response of the CD8<sup>+</sup> T cells to inflammation as it is well documented that the level of expression of T-bet in CD8<sup>+</sup> Te cells is controlled by inflammation level (e.g. IL-12) (1, 46). Therefore, the Notch signalling pathway probably regulates the expression of other transcription factors or molecules (Blimp-1, Id2 or CD25) known to play a role during SLEC differentiation or acts through other pathways yet to be discovered (3-6, 47, 48). Further studies are required to identify by which mechanism the Notch signalling pathway regulates the differentiation of SLECs.

Unlike what would have been expected from *in vitro* studies (22, 23, 36), ablation of Notch1 and Notch2 receptors expression did not decrease the *in vivo* proliferation of CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T cell expansion was enhanced in absence of Notch1/2 expression by CD8<sup>+</sup> 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 effects of the Notch signalling pathway during different *in vivo* CD8<sup>+</sup> T cell responses.

Our results also highlight that the Notch signalling pathway controls the ability of CD8<sup>+</sup> T cells to produce IFN- $\gamma$  in a context-dependent manner. It seems that when the CD8<sup>+</sup> T cell response is primed in a condition where inflammation is high, Notch signalling is dispensable for optimal production of IFN- $\gamma$  by CD8<sup>+</sup> T cells. Therefore, this suggests that priming of CD8<sup>+</sup> T cells during infection is able to induce efficient transcription of the *Ifng* gene in absence of the NICD while 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- $\gamma$  production in effector CD8<sup>+</sup> T cells, when both are absent CD8<sup>+</sup> T cells lose their ability to produce IFN- $\gamma$  (43). Although we have observed that Notch-deficient CD8<sup>+</sup> T cells express lower amount of Eomes, this decrease cannot explain the selective defect of IFN- $\gamma$  that we observed following DC vaccination since it occurs both following *Listeria* infection and DC vaccination. However, following DC vaccination, less T-bet is induced than following infection. Thus, it is possible that the decreased in Eomes expression that we observed in Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  effectors only has a consequence for the transcription of the *Ifng* gene in DC vaccination due to the lower total amount of the two transcription factors Eomes and T-bet. On the other hand, it was shown by others that the *Ifng* gene is a direct target gene of the Notch signalling 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, it is possible that the difference in the duration of antigenic presentation that occurs following DC vaccination versus *Listeria* infection affects the expression of key transcription factors controlling the transcription of the *Ifng* gene, rendering Notch signalling important to induce maximal production of IFN- $\gamma$  by CD8<sup>+</sup> T cells. Interestingly, the defective ability of Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  CD8<sup>+</sup> T cells to produce IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> T cells to produce this cytokine.

The reduction of IFN- $\gamma$  production by Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  Te cells generated following DC vaccination has a functional consequence since these effectors were not able to control a challenge with a lethal dose of Lm-OVA. It is intriguing that Notch-deficient effectors cannot control this bacterial infection since they produce normal levels of TNF- $\alpha$  (data not shown), a cytokine that has been shown to be important for *Listeria* elimination (45, 49). This indicates that either TNF- $\alpha$  production by our effectors is not sufficient to control *Listeria* growth or that Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  CD8<sup>+</sup> Te cells are impaired in other essential functions. For example, it is possible that they also have a defect in their migration as it has been reported for CD4<sup>+</sup> T cells responding in the absence of Notch signalling (50).

Our results also demonstrate that Notch signalling is dispensable for the generation of CD8<sup>+</sup> Tm cells. However, in the DC vaccination model, the yield of Ag-specific CD8<sup>+</sup> Tm cells was higher in the absence of the Notch1 and Notch2 receptors. One possible explanation could be that the reduced production of IFN- $\gamma$  by Notch <sup>$\Delta\Delta$</sup>  CD8<sup>+</sup> 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- $\gamma$  contributes to the contraction phase of the CD8<sup>+</sup> T cell response (51, 52).

In summary, the Notch signalling pathway influences various aspects of the CD8<sup>+</sup> T cell response. Interestingly, some of the effects of the Notch signalling pathway are dependent on

the context in which the CD8<sup>+</sup> T cell response occurs. Further identification of the Notch target genes during different types of CD8<sup>+</sup> T cell response should shed light on the mechanism by which the Notch signalling pathway influences the differentiation of Ag-specific CD8<sup>+</sup> T cells during different immune responses.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank all the members of the laboratory for helpful discussion. We thank all the animal care staff for mice husbandry. This work was funded by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-122105). Méliissa Mathieu was supported by a scholarship from the Fonds de la recherche du Québec-Santé and Frédéric Duval by a studentship from the University of Montreal.

## REFERENCES

1. Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Hagman, L. Gapin, and S. M. Kaech. 2007. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8(+) T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* 27:281-295.
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-2 $\alpha$  expression on virus-specific CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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, J. C. Aster, F. Sigaux, J. Soulier, A. T. Look, R. A. Young, A. Califano, and A. A. Ferrando. 2006. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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, Y. Li, M. S. Wolfe, C. Shachaf, D. Felsher, S. C. Blacklow, W. S. Pear, and J. C. Aster. 2006. c-Myc is an important direct target of

Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & Development* 20:2096-2109.

10. Geimer Le Lay, A. S., A. Oravec, J. Mastio, C. Jung, P. Marchal, C. Ebel, D. Dembele, B. Jost, S. Le Gras, C. Thibault, T. Borggreffe, P. Kastner, and S. Chan. 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 U S A* 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, L. Kostura, A. H. Fauq, K. Simpson, K. A. Such, L. Miele, T. E. Golde, S. D. Miller, and B. A. Osborne. 2005. Inhibitors of gamma-secretase 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, A. Gulino, U. Di Mario, and I. Screpanti. 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<sup>+</sup> 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, S. Chiba, S. Sone, and K. Yasutomo. 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<sup>+</sup> 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. Radojcic, G. T. Shan, I. T. Tran, A. Friedman, K. Kato, S. He, S. Cui, E. Hexner, D. M. Frank, S. G. Emerson, W. S. Pear, and I. Maillard. 2011.

Notch signaling is a critical regulator of allogeneic CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 190:5818-5828.

29. 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.

30. McCright, B., J. Lozier, and T. Gridley. 2006. Generation of new Notch2 mutant alleles. *Genesis* 44:29-33.

31. 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<sup>+</sup>-T-cell potency during bacterial infection. *Infect Immun* 74:6387-6397.

32. Lacombe, M. H., M. P. Hardy, J. Rooney, and N. Labrecque. 2005. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8<sup>+</sup> memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* 175:4400-4407.

33. 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.

34. Mathieu, M., N. Cotta-Grand, J. F. Daudelin, S. Boulet, R. Lapointe, and N. Labrecque. 2012. CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naive CD8<sup>+</sup> T cells to generate effector but not memory T cells. *PLoS One* 7:e30139.

35. Willinger, T., and R. A. Flavell. 2012. Canonical autophagy dependent on the class III phosphoinositide-3 kinase Vps34 is required for naive T-cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:8670-8675.

36. Mathieu, M., N. Cotta-Grand, J. F. Daudelin, P. Thebault, and N. Labrecque. 2013. Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8(+) T-cell activation. *Immunology & Cell Biology* 91:82-88.

37. Fiorini, E., E. Merck, A. Wilson, I. Ferrero, W. Jiang, U. Koch, F. Auderset, E. Laurenti, F. Tacchini-Cottier, M. Pierres, F. Radtke, S. A. Luther, and H. R. Macdonald. 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.

38. Tran, I. T., A. R. Sandy, A. J. Carulli, C. Ebens, J. Chung, G. T. Shan, V. Radojeic, A. Friedman, T. Gridley, A. Shelton, P. Reddy, L. C. Samuelson, M. Yan, C. W. Siebel, and I. Maillard. 2013. Blockade of individual Notch ligands and receptors controls graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 123:1590-1604.

39. Obar, J. J., E. R. Jellison, B. S. Sheridan, D. A. Blair, Q. M. Pham, J. M. Zickovich, and L. Lefrancois. 2011. Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J Immunol* 187:4967-4978.

40. Badovinac, V. P., K. A. Messingham, A. Jabbari, J. S. Haring, and J. T. Harty. 2005. Accelerated CD8<sup>+</sup> T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med* 11:748-756.

41. 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.

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

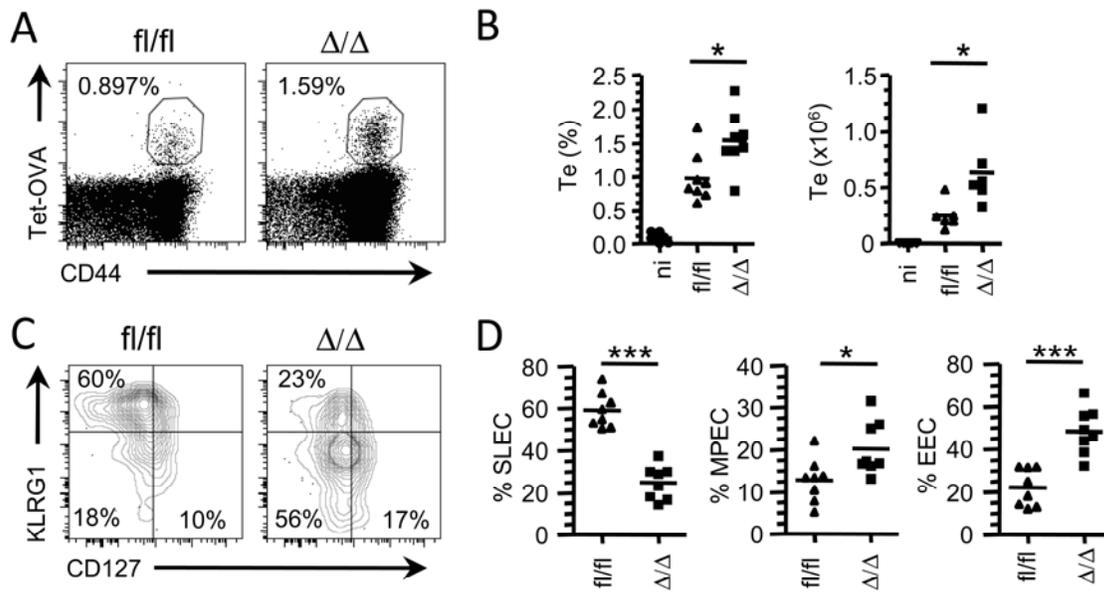
43. Intlekofer, A. M., A. Banerjee, N. Takemoto, S. M. Gordon, C. S. Dejong, H. Shin, C. A. Hunter, E. J. Wherry, T. Lindsten, and S. L. Reiner. 2008. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8<sup>+</sup> T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* 321:408-411.

44. Messingham, K. A., V. P. Badovinac, A. Jabbari, and J. T. Harty. 2007. A role for IFN-gamma from antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells in protective immunity to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 179:2457-2466.

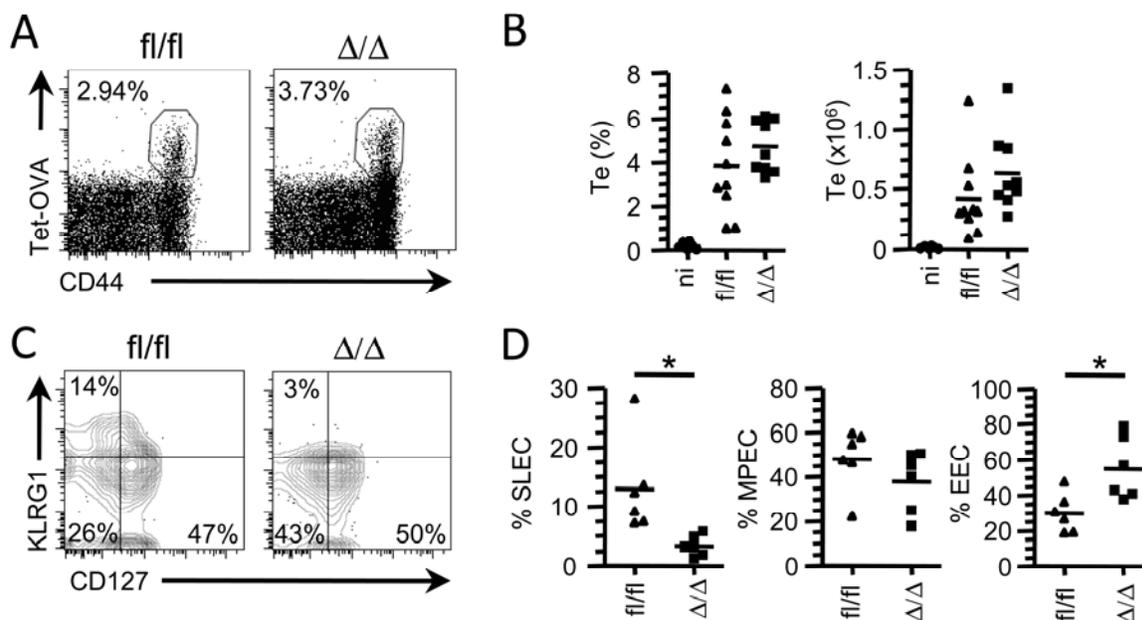
45. Pamer, E. G. 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* 4:812-823.

46. 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<sup>+</sup> T cell differentiation. *J Immunol* 177:7515-7519.

47. Obar, J. J., M. J. Molloy, E. R. Jellison, T. A. Stoklasek, W. Zhang, E. J. Usherwood, and L. Lefrancois. 2010. CD4<sup>+</sup> T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8<sup>+</sup> T cells in primary and secondary responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:193-198.
48. Yang, C. Y., J. A. Best, J. Knell, E. Yang, A. D. Sheridan, A. K. Jesionek, H. S. Li, R. R. Rivera, K. C. Lind, L. M. D'Cruz, S. S. Watowich, C. Murre, and A. W. Goldrath. 2011. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8<sup>+</sup> T cell subsets. *Nat Immunol* 12:1221-1229.
49. White, D. W., and J. T. Harty. 1998. Perforin-deficient CD8<sup>+</sup> T cells provide immunity to *Listeria monocytogenes* by a mechanism that is independent of CD95 and IFN-gamma but requires TNF-alpha. *J Immunol* 160:898-905.
50. Sandy, A. R., J. Stoolman, K. Malott, P. Pongtornpipat, B. M. Segal, and I. Maillard. 2013. Notch signaling regulates T cell accumulation and function in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 191:1606-1613.
51. Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2004. CD8<sup>+</sup> T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* 5:809-817.
52. Badovinac, V. P., A. R. Tvinnereim, and J. T. Harty. 2000. Regulation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 290:1354-1358.

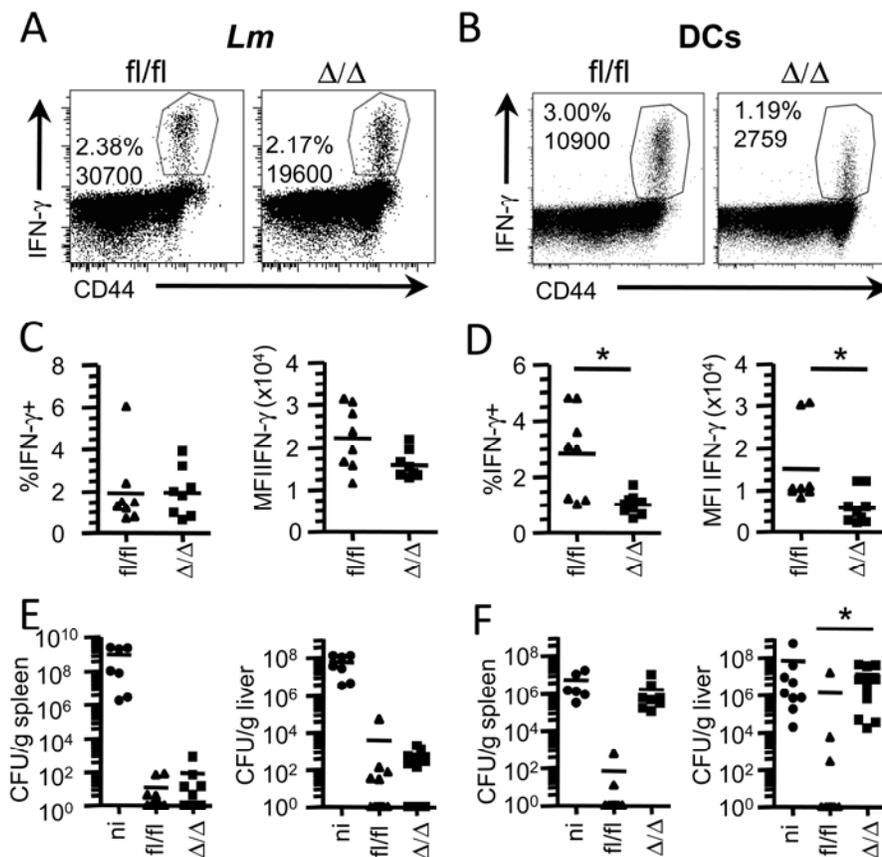


**FIGURE 1. Notch signalling influences CD8<sup>+</sup> T cell expansion and effector differentiation following infection with *Listeria*.** Notch sufficient (fl/fl) and deficient mice (Δ/Δ) were infected or not (not infected, ni) with Lm-OVA. Effector response was assessed in the spleen 7 days post-infection. **(A)** Representative FACS profiles showing frequencies of OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells (TetOVA<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>). **(B)** Percentage (left panel) and numbers (right panel) of OVA-specific Te cells are shown. **(C)** Representative FACS plots showing frequencies of SLECs (KLRG1<sup>hi</sup>and CD127<sup>lo</sup>), MPECs (KLRG1<sup>lo</sup>and CD127<sup>hi</sup>) and EECs (KLRG1<sup>lo</sup> and CD127<sup>lo</sup>) within OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells. **(D)** Percentage of SLECs (left panel), MPECs (middle panel) and EECs (right panel) are shown. Data are representative of 3 independent experiments with ≥ 2 mice per group. \* p ≤ 0.05 and \*\*\* p ≤ 0.001.

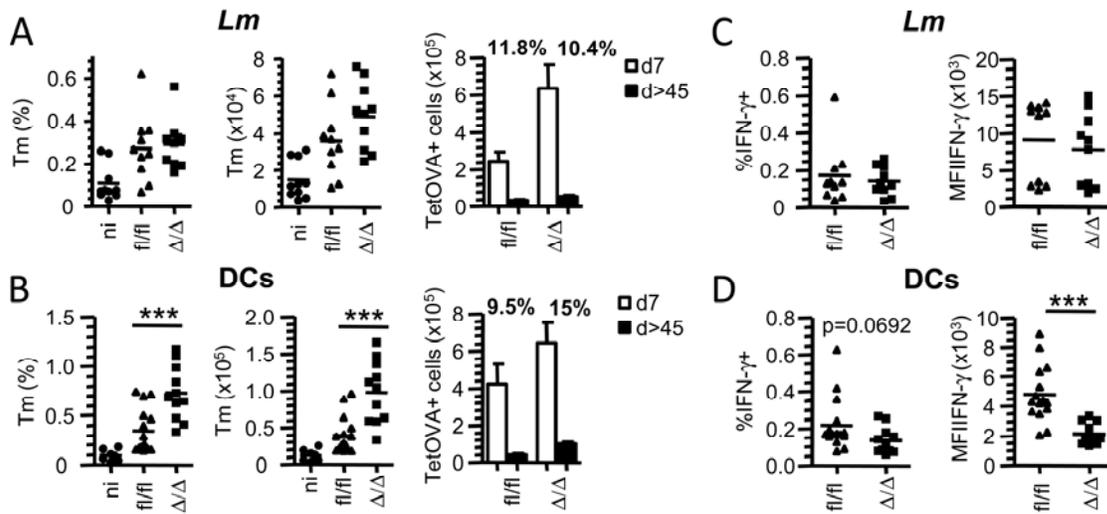


**FIGURE 2. Notch-deficiency impairs SLEC differentiation following DC vaccination.**

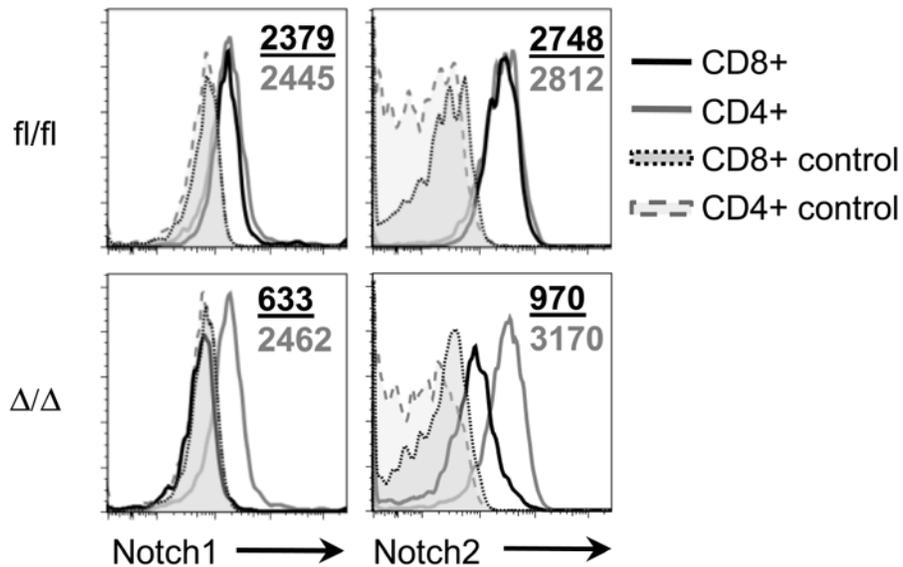
Notch sufficient (fl/fl) and deficient mice ( $\Delta/\Delta$ ) were immunised with DCs loaded or not (no immunisation, ni) with the SIINFELK peptide. Effector response was assessed in the spleen 7 days post-vaccination. (A) Representative FACS profiles showing frequencies of OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells (TetOVA<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>). (B) Percentage (left panel) and numbers (right panel) of OVA-specific CD8<sup>+</sup>Te cells are shown. (C) Representative FACS plots showing frequencies of SLECs (KLRG1<sup>hi</sup>and CD127<sup>lo</sup>), MPECs (KLRG1<sup>lo</sup>and CD127<sup>hi</sup>) and EECs (KLRG1<sup>lo</sup> and CD127<sup>lo</sup>) within OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells. (D) Percentage of SLECs (left panel), MPECs (middle panel) and EECs (right panel) are shown. Data are representative of 2 (C,D) or 3(A,B) independent experiments with  $\geq 2$  mice per group. \*  $p \leq 0.05$ .



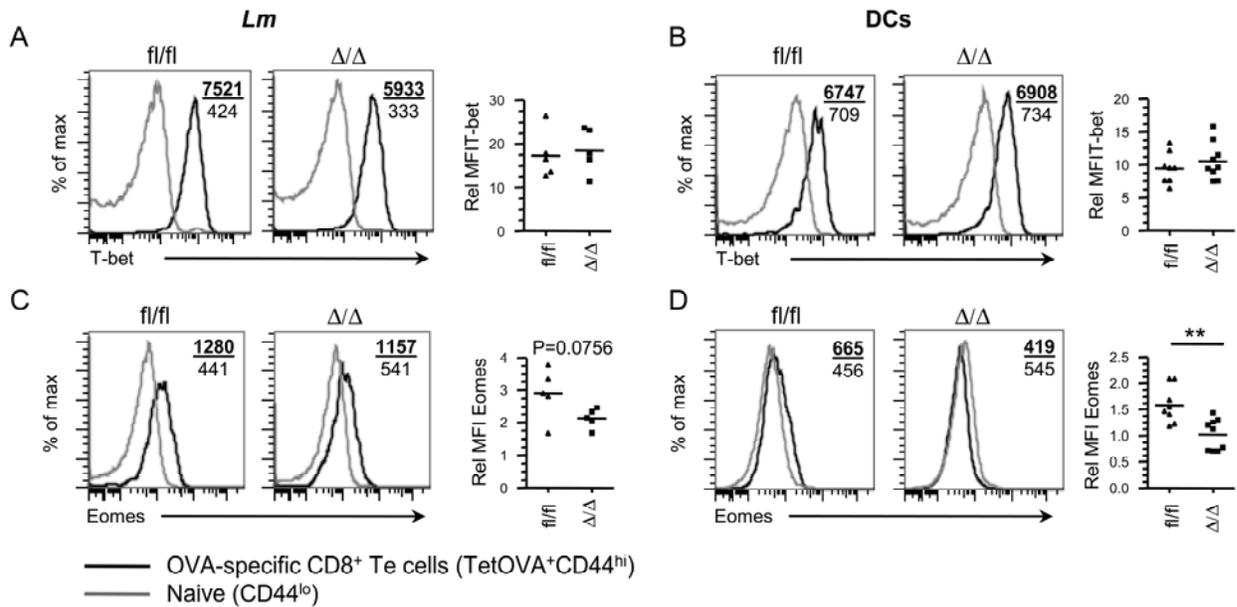
**FIGURE 3. Notch-deficient CD8<sup>+</sup> Te cells have impaired functionality only following DC vaccination.** Notch sufficient (fl/fl) and deficient mice ( $\Delta/\Delta$ ) were infected with Lm-OVA (A, C, E) or immunized with DCs (B, D, F). IFN- $\gamma$  production was assessed on day 7 post-infection or -vaccination following a short *in vitro* restimulation with the OVA peptide. (A, B) Representative dot plots showing the frequency of IFN- $\gamma$  producing CD8<sup>+</sup> Te cells. The percentage of CD8<sup>+</sup> Te cells producing IFN- $\gamma$  and their MFI is indicated on the dot plot. (C, D) Graphs represent the percentage (left panel) and MFI (right panel) of IFN- $\gamma$  producing effectors. (E, F) Bacterial burden in spleen and liver at day 3 post-challenge with a lethal dose of Lm-OVA of mice that were infected 7 days before with Lm-OVA (E) or vaccinated with DC-OVA (F). Data are representative of 3 independent experiments with  $\geq 2$  mice per group. \*  $p \leq 0.05$ .



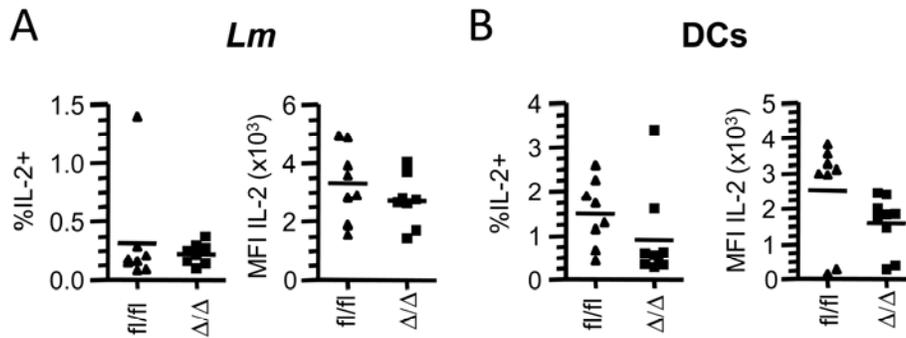
**FIGURE 4. Notch is dispensable for memory generation.** Notch sufficient (fl/fl) and deficient mice ( $\Delta/\Delta$ ) were infected with Lm-OVA (A, C) or immunized with DCs (B, D) as described in figures 1 and 2. The generation of OVA-specific CD8<sup>+</sup> Tm cells and their ability to produce IFN- $\gamma$  were analyzed at  $\geq 45$ -65 days post-infection or -immunisation. (A, B) Graphs represent the percentage (left panel) of OVA-specific CD8<sup>+</sup> Tm cells, the number of OVA-specific CD8<sup>+</sup> Tm cells (middle panel) and of the yield of Tm cells (right panel). (C, D) Graphs show the percentage (left panel) and the MFI (right panel) of IFN- $\gamma$ -producing OVA-specific CD8<sup>+</sup> Tm cells. Data are representative of 4 independent experiments with  $\geq 2$  mice per group. \*\*\*  $p \leq 0.001$ .



**FIGURE S1. Lack of Notch1 and Notch2 expression in CD8<sup>+</sup> T cells from Notch-deficient mice.** Whole splenocytes were stimulated for 48h with anti-CD3 (1ug/mL) and anti-CD28 (5ug/mL). Cells were then harvested and stained with antibodies specific for Notch1 and Notch2. Notch1 and Notch2 expression are depicted by the black line for CD8<sup>+</sup> T cells and the grey line for CD4<sup>+</sup> T cells. The isotype control (Notch1) or the FMO (Notch2) are depicted by the dotted line for CD8<sup>+</sup> T cells and the dashed filled line for CD4<sup>+</sup> T cells. The MFI of Notch1 and Notch2 expression is shown on each overlay histogram. The upper black number indicates the MFI for CD8<sup>+</sup> T cells and the lower grey number indicate the MFI for CD4<sup>+</sup> T cells.



**FIGURE S2. Notch-deficient CD8<sup>+</sup>Te cells express normal level of T-bet but decreased level of Eomes.** Notch sufficient (fl/fl) and deficient ( $\Delta/\Delta$ ) mice were infected with Lm-OVA (A, C) or immunised with DC (B, D) as in Figures 1 and 2. The expression of T-bet (A, B) and Eomes (C, D) was assessed 7 days post-infection or -immunisation. The representative overlay histogram shows expression of the transcription factors by OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te cells (TetOVA<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>) and naive CD8<sup>+</sup> T cells (CD44<sup>lo</sup>). The MFI are shown on each overlay, the upper bold number indicates the MFI of OVA-specific Te cells (TetOVA<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>) while the lower number is for the naive CD8<sup>+</sup> T cells (CD44<sup>lo</sup>). The graphs show compilation of MFI of T-bet or Eomes expression by OVA-specific Te cells (TetOVA<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>) normalised to the MFI of naive CD8<sup>+</sup> T cells (CD44<sup>lo</sup>) for each mouse. Data are representative of 2 (Lm infection) or 3 (DC immunisation) independent experiments with  $\geq 2$  mice per group. \*\*  $p \leq 0.01$ .



**FIGURE S3. Similar IL-2 production by OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te cells following *Listeria* infection and DC immunisation.** Notch sufficient (fl/fl) and deficient mice (Δ/Δ) were infected with Lm-OVA (A) or immunised with DCs (B). IL-2 production was assessed on day 7 following a short *in vitro* restimulation of splenocytes with the OVA peptide. Percentage and MFI of CD44<sup>hi</sup>IL-2<sup>+</sup> OVA-specific CD8<sup>+</sup> effectors are shown. Graphs represent the percentages (left panel) and MFI (right panel) of IL-2 producing Te cells. Data are representative of 3 independent experiments with ≥ 2 mice per group.

## Discussion

### 3.1 L'activation des LT CD8<sup>+</sup> par les CD40-B et les CD

#### 3.1.1 Introduction

La première hypothèse émise dans le cadre de ma thèse était que la présentation antigénique par différentes CPA pouvait influencer la réponse du LT CD8<sup>+</sup>. Afin de valider cette hypothèse, dans l'article 1, nous avons comparé la capacité des CD40-B et des CD à activer les LTn CD8<sup>+</sup> *in vivo*. D'abord, nous avons montré que l'activation des LB via le CD40, seul ou en combinaison avec du CpG-DNA ou du LPS, permet d'augmenter l'expression des molécules de classe I et II du CMH ainsi que des molécules de costimulation CD80 et CD86 permettant une présentation de l'Ag dans un contexte activateur (Article 1, figure 1). Par la suite, nous avons immunisé des souris avec différents types de CD40-B et nous avons constaté que l'ajout de signaux danger (LPS ou CpG DNA) augmente le nombre de LTe présents au pic de la réponse (Article 1, figure 2a,b). Toutefois, l'immunisation avec les CD40-B LPS et les CD40-B CpG génère systématiquement environ 2 fois moins de LTe que l'immunisation avec les CD. Étonnamment, contrairement à l'immunisation avec des CD, aucun ou pratiquement aucun LTm n'est détectable 45 jours suivant l'immunisation avec des CD40-B, des CD40-B CpG ou des CD40-B LPS (Article 1, figure 2a, b). Généralement, la quantité de LTm formés représente 5-10 % des LTe présents au pic de la réponse<sup>471</sup>. L'immunisation avec les CD permet un rendement moyen de LTm de 10 % (rendement de LTm = % Tm/% LTe x 100 %) alors que le rendement moyen suite à l'immunisation avec les CD40-B est invariablement en deçà des 5 % minimalement attendus et parfois nul (Article 1, figure 2c, d). De plus, 45 jours suite à l'immunisation des souris avec les CD40-B LPS, aucun contrôle bactérien n'a eu lieu suite à l'injection d'une dose létale de *Lm*-OVA, démontrant que l'absence ou le peu de LTm générés ne suffit pas pour assurer une protection à long terme (Article 1, figure 2e, f). Devant ces résultats, deux questions principales se posent :

- 1) Pourquoi l'expansion clonale des LTe est-elle diminuée suite à l'immunisation avec des CD40-B comparativement à l'immunisation avec des CD?

2) Pourquoi l'immunisation avec les CD40-B génère-t-elle si peu de LTm comparativement à l'immunisation avec les CD?

Afin de comprendre les mécanismes diminuant l'expansion clonale et inhibant la génération de LTm suite à l'immunisation avec les CD40-B, nous avons caractérisé les LTE quant à leur phénotype, leur fonctionnalité et leur expression de facteurs de transcription. Ces observations et leurs impacts sur la génération de LTE et de LTm seront discutés dans les prochaines sections. La diminution de l'expansion clonale et la faible génération de LTm seront discutées simultanément, car plusieurs molécules ont un effet sur ces deux phases de la réponse des LT CD8<sup>+</sup>. D'après nos résultats et les données disponibles dans la littérature, des hypothèses seront formulées et un modèle sera proposé afin d'expliquer la diminution de l'expansion clonale et la diminution drastique de la génération de LTm. Finalement, les perspectives quant à l'étude et l'utilisation des CD40-B en tant que CPA seront abordées.

Nous sommes les premiers à avoir quantifié *in vivo* la réponse effectrice et mémoire des LT CD8<sup>+</sup> induite par l'immunisation avec les CD40-B. En accord avec l'expansion des OT-1 que nous observons *in vivo*, plusieurs études *in vitro* démontrent que les CD40-B peuvent induire la prolifération de LTn CD8<sup>+</sup><sup>35,40,92,95,113,114,125</sup>. De plus, deux groupes ont démontré que l'immunisation avec les CD40-B peut induire la prolifération de LTn CD8<sup>+</sup> *in vivo*<sup>95,113</sup>. Finalement, à l'opposé de nos résultats, une étude démontre que l'immunisation avec des CD40-B chargés avec OVA<sub>257-264</sub> permet la génération de LTm capables de diminuer la charge bactérienne suite à une infection *Lm*-OVA<sup>121</sup>. Tel que mentionné dans la discussion de l'article 1, les CD40-B utilisés dans cette étude sont générés par la stimulation de LB avec un Ac anti-CD40 monomérique (clone 1C10). Il est probable que ces CD40-B diffèrent de ceux que nous utilisons, qui sont générés sur des fibroblastes (NIH 3T3) exprimant les CD40L<sup>130</sup>. Malgré une protection contre une dose létale de *Lm*-OVA, il est possible que le nombre de LTm générés soit très faible. Puisque le nombre de LTm n'a pas été quantifié par le groupe de Vanden Bush, il est difficile de se prononcer sur ce fait. De notre côté, nous avons réalisé une seule infection avec une dose létale de *Lm*-OVA 30 jours post-immunisation

(Article 1, figure 2e, f). Dans cette expérience, le pourcentage de LTm générés était extrêmement faible, voire inexistant (données non présentées). Or, suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS, certaines souris ne génèrent aucun LTm alors que d'autres en génèrent un faible pourcentage (Article 1, figure 2b, c et S4). Cependant, lorsque les LTm sont générés, même en faible quantité, ils sont capables de proliférer suite à une seconde exposition à l'Ag (Article 1, figure S4). Il est donc probable qu'une génération faible de LTm (un rendement en deçà de 5 %) confère une certaine protection contre une dose létale de *Lm*-OVA. Ainsi, il est possible que peu de LTm soient générés dans les expériences de Vanden Bush et qu'ils assurent une certaine protection contre une infection *Lm*-OVA.

### **3.1.2 La caractérisation des LTe**

À la recherche d'indices nous permettant d'identifier les causes de la diminution de l'expansion et de la génération inefficace de LTm suite à l'immunisation avec les différents types de CD40-B, nous avons caractérisé les LTe au pic de la réponse. Nous nous sommes intéressées à leur phénotype extracellulaire, leur fonctionnalité ainsi qu'à leur expression de facteurs de transcription. Puisque plusieurs expériences ont été réalisées seulement avec les CD40-B LPS et les CD LPS, je limiterai mes comparaisons aux immunisations avec ces deux types cellulaires.

#### **3.1.2.1 Le phénotype extracellulaire des LTe**

Suite à l'infection de souris avec différents pathogènes, les LTe acquièrent un phénotype caractérisé par une augmentation de l'expression de CD44, CD43 (forme glycosylée reconnue par le clone 1B11), CD27 et CD122 et une diminution de CD127 et CD62L<sup>289,305</sup>. Suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS ou les CD LPS, les LTe ont effectivement adopté ce phénotype activé (Article 1, figure 4a et S6). Il faut mentionner que, lors d'immunisation avec des CD, la diminution de l'expression de CD127 n'est pas aussi drastique que lors d'infection avec *Lm* ou LCMV<sup>255,256</sup> en raison d'une inflammation plus faible<sup>106,253,255</sup>. Cette expression accrue du CD127 est associée à une différenciation accélérée

en LTm<sup>255</sup>. Dans nos expériences, une différence observée entre l'immunisation avec les CD40-B LPS et les CD LPS se situe au niveau de l'expression du CD127. En effet, les LTe obtenus suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS expriment un niveau plus faible de CD127 comparativement à l'immunisation avec les CD LPS (Article 1, figure 4a et S6), mais tout de même 75 % des LTe expriment fortement le CD127 (Article 1, figure S7). L'immunisation avec les CD40-B LPS génère donc une proportion importante de LTe exprimant fortement le CD127, parmi lesquels devraient se retrouver les précurseurs des LTm. Cependant, la diminution de l'expression de CD127 n'est pas corrélée avec le rendement de LTm (Article 1, figure 4b). En accord avec cette absence de corrélation, notre laboratoire a déjà montré que lors d'immunisation avec des CD LPS, l'expression du CD127 ne permet pas d'identifier les précurseurs des LTm<sup>256</sup>. De plus, nous avons réalisé des transferts adoptifs avec 10<sup>6</sup> LT OT-1, un nombre élevé de précurseurs ce qui contribue aussi à maintenir une expression élevée du CD127<sup>289</sup>. Lors du transfert d'un nombre élevé de précurseurs, l'expression de CD127 n'est plus associée aux LTe qui survivent et se différencient en LTm<sup>289</sup>. Donc, la diminution de l'expression de CD127 chez les LTe suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS ne peut pas être associée à la faible génération de LTm.

Au pic de la réponse, nous avons aussi mesuré l'expression de KLRG1, mais nous n'avons pas détecté sa présence chez les LTe générés suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS ou les CD LPS (données non présentées). L'expression de KLRG1 est associée à la différenciation des SLEC destinés à mourir par apoptose<sup>254</sup>. Cependant, dans un modèle d'immunisation peu inflammatoire, l'augmentation de l'expression de KLRG1 est beaucoup moins importante que lorsque l'inflammation est présente<sup>106,254</sup>. De plus, dans notre modèle où nous transférons 10<sup>6</sup> LT OT-1 et immunisons avec des CD, notre laboratoire a démontré que nous n'observons pas d'augmentation de l'expression de KLRG1 puisque le nombre élevé de précurseurs ne permet pas la génération de SLEC exprimant KLRG1 en raison d'une compétition accrue pour l'IL-2 présente au moment du *priming*<sup>276</sup>. Cependant, lors d'infection LCMV, où l'inflammation est forte, un nombre élevé de précurseurs n'empêche pas l'augmentation de l'expression de KLRG1<sup>287</sup>. L'IL-2 est principalement sécrétée par les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> mais elle peut aussi être produite par les CD et les LB<sup>126,267,269-271</sup>. L'expression

de KLRG1 est aussi augmentée en fonction de l'inflammation, via l'IL-12 et les interférons de type I, perçue par le LT CD8<sup>253,254</sup>. Nous pouvons donc supposer que nos CD40-B LPS et nos CD sécrètent de faibles niveaux d'IL-2, d'IL-12 et d'interféron de type I, ne permettant pas une augmentation de l'expression de KLRG1 chez les LTe lorsque le nombre de précurseurs est élevé. Le phénotype des LTe ne nous a donc pas permis d'identifier un défaut majeur suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS comparativement à l'immunisation avec les CD LPS.

### 3.1.2.2 La fonctionnalité des LTe

Afin de caractériser la qualité de nos LTe, nous avons étudié leur fonctionnalité. Lors d'infection LCMV, au pic de la réponse, les MPEC sécrètent plus d'IL-2 que les SLEC, alors que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  est la même<sup>287</sup>. Lors d'immunisation avec des CD, en accord avec un phénotype MPEC des LTe au pic de la réponse, la sécrétion de l'IL-2 par les LTe est plus importante que lors d'infection<sup>255</sup>, ne permettant plus de discriminer les précurseurs des LTm. Quant à la production de granzyme B, la dégranulation et la cytotoxicité, elles sont similaires entre les SLEC et les MPEC<sup>254,287,359</sup>. Nous avons démontré que l'immunisation avec des CD40-B LPS génère des LTe capables de produire et sécréter de l'IL-2, de l'IFN- $\gamma$  et de la granzyme B (Article 1, figure 5 et S6), ayant une activité cytotoxique (Article 1, figure 6a,b) et contrôlant une infection *Lm*-OVA (Article 1, figure 6c,d). Les LTe générés suite à l'immunisation avec les CD40-B ont donc une fonctionnalité compatible avec un phénotype MPEC. Comparativement aux LTe générés suite à l'immunisation avec des CD, seule la production de granzyme B est diminuée chez les LTe obtenus suite à l'immunisation avec les CD40-B, ce qui pourrait contribuer à la diminution de leur activité cytotoxique (Article 1, figure 5 et 6a,b). Ces données nous permettent de conclure que les LTe générés suite à l'immunisation avec des CD40-B LPS sont fonctionnels, mais ne nous permettent pas d'identifier un défaut d'activation des LTn comparativement à l'immunisation avec des CD.

Le fait que les LTe générés *in vivo* sécrètent des cytokines et soient fonctionnels corrobore les études où des CD40-B ont été utilisés pour activer des LT CD8<sup>+</sup> *in vitro*. En effet, des LT CD8<sup>+</sup> activés *in vitro* par les CD40-B ont la capacité de sécréter de l'IFN- $\gamma$  et

présentent une activité cytotoxique<sup>40,92,124,125</sup>. Un groupe a démontré que l'immunisation avec des CD40-B chargés avec le peptide GP<sub>33</sub> permet de diminuer la croissance de tumeurs exprimant GP<sub>33</sub> (Lewis lung carcinoma) lorsque celles-ci sont inoculées 7 jours post-immunisation<sup>113</sup>. Comme le contrôle de ces cellules tumorales dépend de l'IFN- $\gamma$  sécrété par les LT CD8<sup>+472</sup>, cette observation suggère une production d'IFN- $\gamma$  par les LTe CD8<sup>+</sup> spécifiques de GP<sub>33</sub> activés suite à l'immunisation avec les CD40-B.

Puisque les CD40-B LPS sont une source potentielle de CPA pour l'immunothérapie du cancer, il serait aussi fort intéressant de comparer la capacité de nos CD40-B LPS et de nos CD LPS chargés avec le peptide OVA<sub>257-264</sub> à activer les LTn CD8<sup>+</sup> dans l'environnement immunosuppresseur induit par la présence de tumeurs. Par exemple, des tumeurs E.G7-OVA pourraient être inoculées chez des souris puis, une fois les tumeurs établies, les souris pourraient être vaccinées avec des CD40-B LPS ou des CD LPS chargées avec l'OVA. L'activation des LTn CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'OVA, qui induira leur production d'IFN- $\gamma$  et leur activité cytotoxique, devrait permettre de diminuer le nombre des cellules tumorales voire les éliminer complètement.

### 3.1.2.3 Les facteurs de transcription induits

Les différents signaux perçus par le LT CD8<sup>+</sup> au moment de l'activation vont influencer l'expression de différents facteurs de transcription dont l'expression relative dicte les choix de différenciation. Certains facteurs de transcription comme Eomes ou Bcl-6 sont associés à la différenciation des LTm et à leur survie<sup>368,373,380,381,383</sup> alors que d'autres facteurs de transcription comme T-bet et Blimp-1 sont associés à la différenciation terminale des effecteurs<sup>254,275-277,369,375</sup>. Au pic de la réponse, les LTe générés suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS et les CD LPS n'ont pas le même profil d'expression de ces facteurs de transcription. Les facteurs de transcription T-bet et Blimp-1 sont exprimés à des niveaux similaires, alors que l'immunisation avec des CD40-B LPS induit une expression plus forte d'Eomes mais plus faible de Bcl-6 (Article 1, figure 8). L'expression différentielle des facteurs de transcription suggère que différents signaux sont perçus au moment de l'activation.

L'expression d'Eomes n'est pas requise pour la formation de LTm CD8<sup>+</sup>, il contribue plutôt au maintien à long terme des LTm en augmentant leur sensibilité à l'IL-15<sup>368</sup>. Il n'est donc pas surprenant que son expression, plus forte chez les LTe générés avec les CD40-B LPS, ne soit pas suffisante pour permettre la survie des LTe lors de la contraction. Comme l'expression d'Eomes est aussi impliquée dans l'acquisition d'un phénotype T<sub>CM</sub><sup>368,373</sup>, il est probable que si des LTm étaient générés suite à l'immunisation avec des CD40-B, leur phénotype et leur survie à long terme soit influencé par l'expression plus forte d'Eomes. L'expression similaire de T-bet par les LTe générés suite à l'immunisation avec des CD40-B LPS ou des CD suggère que l'inflammation perçue via l'IL-12 est similaire, puisque T-bet est induit de façon dose-dépendante par l'IL-12<sup>254</sup>. Il est donc possible que l'immunisation avec les CD40-B LPS et les CD, produisant un niveau d'inflammation faible, induise seulement de faibles niveaux d'expression de T-bet. En accord avec cette hypothèse, la stimulation de LT CD8<sup>+</sup> P14 *in vitro* avec des CD chargées avec le peptide GP<sub>33</sub> n'induit pas l'expression de T-bet. De l'IL-12 doit être ajoutée à la culture afin d'augmenter l'expression de T-bet<sup>254</sup>. Les CD générées à partir de la moelle osseuse produisent pourtant de l'IL-12 (<sup>122</sup> et données non présentées), suggérant que la quantité produite n'est pas suffisante pour induire l'augmentation de l'expression de T-bet. Tel que discuté précédemment, cette faible inflammation se traduit aussi par l'absence d'augmentation de l'expression de KLRG1 dans un modèle d'immunisation avec un nombre de précurseur élevé.

Le facteur de transcription Bcl-6 qui contribue à l'expansion clonale, qui est augmenté chez les LTm et qui est nécessaire à leur différenciation<sup>380,381,383</sup>, pourrait influencer la génération de LTe et de LTm suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS. L'expression de Bcl-6 est induite par l'activation du RCT<sup>378,379</sup> alors son expression plus faible par les LTe générés suite à l'immunisation avec des CD40-B LPS pourrait être causée par un signal RCT plus faible. L'expression de Bcl-6 peut aussi être induite par l'IL-21 et l'IL-10 via STAT3<sup>380</sup>, un facteur de transcription. Donc, ce défaut d'induction de Bcl-6 pourrait aussi être la conséquence d'une production différente de cytokines par les CD40-B LPS et les CD, influençant les LT CD8<sup>+</sup> au moment de leur activation. Cette hypothèse est abordée plus en détail dans la section 3.1.3.3.

Nous avons mesuré l'expression de seulement quatre facteurs de transcription, mais d'autres facteurs de transcription pourraient contribuer au défaut de génération de LTm observé suite à l'immunisation avec les CD40-B. Un candidat particulièrement intéressant est le facteur de transcription Id3, dont la délétion affecte peu l'expansion clonale, mais augmente drastiquement la contraction permettant de générer très peu de LTm<sup>382</sup>. Le facteur de transcription Id3 pourrait donc contribuer à la contraction rapide des LTE générés suite à l'immunisation avec des CD40-B LPS (Article 1, figure 7a). Des hybridations sur puce d'ADN de LTE exprimant ou non Id3 ne montrent pas de variation dans l'expression de Bcl-2, mais plutôt dans l'expression de gènes impliqués dans la réplication et la réparation de l'ADN<sup>382</sup>. En accord avec ce défaut potentiel d'Id3, les LTE générés suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS présentent des niveaux équivalents ou supérieurs de Bcl-2 comparativement aux LTE générés suite à l'immunisation avec des CD (Article 1, figure 7b). Peu de facteurs de transcription causent une diminution aussi importante du nombre de LTm générés. L'expression du facteur de transcription Id2 pourrait aussi jouer un rôle dans la diminution de l'expansion clonale et la diminution des LTm générés lors de l'immunisation avec les CD40-B LPS. L'expression d'Id2 est nécessaire pour augmenter l'amplitude de la réponse des LT CD8<sup>+387</sup>. Cependant, Id2 affecte la survie des LTE, notamment via l'expression de Bcl-2, BimEL et Spi-6<sup>387</sup>. Malgré le maintien de l'expression de Bcl-2 chez les LTE générés suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS, il est probable qu'Id2 contribue à la diminution de l'expansion clonale et, conséquemment, des LTm, en influençant l'expression de BimEL et Spi-6. Il est possible que l'expression d'Id2 affecte la survie des LTE lors de l'expansion clonale alors que l'expression d'Id3 influence la génération des LTm. Il serait donc pertinent de mesurer l'expression des ARNm d'Id2 et d'Id3 chez nos LTE au pic de la réponse suite à une vaccination avec les CD40-B et les CD.

Afin de déterminer si l'absence de Bcl-6 est responsable du faible rendement de LTm, il serait possible de forcer l'expression de Bcl-6 chez des LT CD8<sup>+</sup>. Pour ce faire, les LT OT-1 pourraient être activés *in vitro* avec des CD40-B LPS OVA ou des CD LPS OVA et infectés avec un rétrovirus codant pour Bcl-6. Les OT-1 activés *in vitro* et exprimant Bcl-6 pourraient ensuite être transférés dans des souris receveuses et leur différenciation en LTm quantifiée 45

jours post-transfert. Des expériences similaires ont été réalisées avec un rétrovirus codant pour T-bet<sup>254</sup>. Une autre approche pourrait consister en l'immunisation avec les CD40-B LPS OVA ou les CD LPS OVA de souris transférées avec des LT OT-1 exprimant un transgène codant pour Bcl-6<sup>383</sup>. La surexpression de Bcl-6 devrait augmenter le pourcentage de LTe et de LTm obtenus suite à l'immunisation avec des CD40-B LPS. Des expériences similaires pourraient être effectuées pour confirmer le rôle d'un autre facteur de transcription comme Id3.

### **3.1.3 Les signaux perçus au moment de l'activation**

Pour une activation complète, le LT CD8<sup>+</sup> doit percevoir un minimum de 3 signaux : la reconnaissance de l'Ag, la costimulation et l'inflammation via les cytokines<sup>238-241</sup>. Il est possible que la diminution du pourcentage de LTe et la quasi absence de génération de LTm suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS soient causées par un défaut dans la transmission d'un des trois signaux importants pour l'activation des LT CD8<sup>+</sup>. Une différence dans la perception des signaux fournis au moment de l'activation du LT CD8<sup>+</sup> pourrait causer l'expression différente des facteurs de transcription observée. Nous avons donc posé l'hypothèse qu'un de ces signaux est fourni de façon sous optimale par les CD40-B LPS au moment de la présentation de l'Ag, affectant la réponse des LT CD8<sup>+</sup> et la formation de LTm. La qualité des trois signaux d'activation fournis par les CD40-B LPS et les CD LPS et l'impact sur la réponse des LT CD8<sup>+</sup> seront donc abordés dans les prochaines sections.

#### **3.1.3.1 La qualité du signal 1 : la présentation de l'antigène**

L'avidité du signal RCT influence la génération de LTm<sup>122,151,152</sup>. Notre laboratoire a démontré que l'immunisation avec des CD LPS, chargées avec deux fois moins de peptide que la condition contrôle, diminue la génération de LTm sans affecter le nombre de LTe formés<sup>122</sup>. Il a aussi été démontré qu'une diminution du signal transmis par le RCT, empêchant l'activation de NF-κB, bloque la formation de LTm<sup>152</sup>. L'avidité du signal RCT peut être modulée grâce à l'affinité et à la quantité du peptide présenté. Dans notre modèle d'immunisation, comme nous chargeons le peptide OVA<sub>257-264</sub> sur nos cellules, l'affinité du

peptide présenté par les CD40-B LPS et les CD LPS est la même. Nous avons donc voulu déterminer si la quantité d'Ag présente à la surface des CD40-B LPS était comparable à celle présentée par les CD. La quantité de peptides OVA<sub>257-264</sub> présentée à la surface des CD40-B LPS utilisés pour les immunisations est supérieure à celle présentée à la surface des CD LPS (Article 1, figure S5). De plus, le chargement des CD40-B LPS avec une quantité plus élevée d'OVA<sub>257-264</sub> (10µg) a augmenté la quantité de peptides présentée à leur surface sans affecter la génération de LTe et sans restaurer la génération de LTm CD8<sup>+</sup> (Article 1, figure S5). Ces données montrent qu'une augmentation de la quantité de peptides présentée par les CD40-B LPS, donc de l'avidité du signal RCT, n'est pas suffisante pour restaurer la génération de LTm CD8<sup>+</sup> suite à l'immunisation avec des CD40-B LPS. Pour s'assurer que les différentes voies en aval du RCT sont activées de façon similaire, il serait possible de stimuler des LT OT-1 *in vitro* avec des CD40-B LPS et des CD LPS et de mesurer la phosphorylation de Zap-70, d'Erk1/2 et d'IκB (*inhibitor of NF-κB*) de même que l'influx calcique induit.

### 3.1.3.2 La qualité du signal 2 : la costimulation

Le second signal important pour l'expansion maximale des LTe et la génération optimale des LTm lors de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> est la costimulation. La stimulation via le CD28 est primordiale pour l'activation des LT CD8<sup>+</sup>, car la reconnaissance de l'Ag seul n'induit pas la prolifération et la différenciation en LTe<sup>155,473</sup>. Dans plusieurs modèles infectieux (VSV, VV, influenza), l'inhibition du signal via CD28 diminue la génération de LTe et affecte leur cytotoxicité<sup>163-166,168,215</sup> mais n'empêche pas totalement la formation de LTm<sup>168,215</sup>. En absence de signal CD28, la costimulation peut être fournie par d'autres molécules, ce qui explique pourquoi l'absence de CD28 n'induit pas l'anergie lors d'infection *in vivo*<sup>166,206</sup>. En effet, la signalisation via certains récepteurs de la famille TNF contribue au signal de costimulation. Le signal via les récepteurs CD27, 4-1BB, OX40 et GITR a la capacité d'augmenter l'expansion clonale et l'amplitude de la réponse<sup>199,200,202,205,213,220,223,230,231</sup>. Le signal via les récepteurs 4-1BB, OX40 et CD30 peut aussi influencer directement la génération des LTm<sup>198,199,215,216,224,226</sup>. Le fait que l'immunisation avec les CD40-B permet la prolifération des LTn OT-1 et leur différenciation en LTe qui ont une activité cytotoxique (Article 1, figure 6a, b) suggère que l'expression des molécules de

costimulation CD80 et du CD86 sur les CD40-B LPS (Article 1, figure 1) est suffisante pour fournir un signal de costimulation adéquat via CD28. Cependant, l'expansion moins importante des LTe suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression des ligands de la famille TNF. Toutefois, une diminution de la costimulation affecte la génération de LTm, mais de façon moins drastique que l'immunisation avec les CD40-B. Il est donc peu probable qu'elle soit la cause de ce phénotype. De plus, une redondance existe dans la fonction des molécules de costimulation. Un défaut d'expression de plusieurs ligands par les CD40-B serait donc requis pour produire un effet aussi important sur la génération de LTm. Dans ce cas, l'expansion clonale serait probablement diminuée de façon plus radicale. Nous avons mesuré l'expression des ligands CD70, OX40L, 4-1BBL et CD30L à la surface des CD40-B LPS et des CD LPS. Tout comme les CD LPS, les CD40-B LPS expriment des niveaux élevés de ces molécules (Annexe 1), leur permettant fort probablement de donner un signal de costimulation adéquat. Un signal de costimulation défaillant ne semble pas être la cause de la diminution de la génération de LTm. Puisque les récepteurs de costimulation activent les mêmes molécules distales que le RCT<sup>146,155</sup>, suite à l'activation des LT OT-1 par les CD40-B LPS, un défaut dans l'activation de NF-κB, NFAT ou Fos et Jun pourrait être associé à un défaut du signal RCT et/ou de la costimulation.

### 3.1.3.3 La qualité du signal 3 : l'inflammation

Les cytokines inflammatoires jouent un rôle important dans l'expansion maximale des LTe et, conséquemment, dans la différenciation des LTm. Dans des modèles d'activation *in vitro* où les signaux 1 (Ag), 2 (costimulation) et 3 (inflammation) sont contrôlés, la présence de cytokines inflammatoires comme l'IL-12 ou des interférons de type 1 est requise pour une expansion maximale, ainsi que pour la différenciation et la survie des LTm<sup>241,249,258,263</sup>. Lors d'infection *Lm*, les LT CD8<sup>+</sup> doivent percevoir un signal via l'IL-12 et les IFN de type I, qui ont des fonctions redondantes, afin de générer un nombre optimal de LTe et de LTm<sup>258,259</sup>. Comme nous observons une diminution de l'expansion clonale lors d'immunisation avec des CD40-B LPS, comparativement à l'immunisation avec les CD LPS, il est possible que les

CD40-B LPS produisent moins d'IL-12 et d'IFN de type I. L'absence de signal via l'IL-12 et les interférons de type I chez les LT CD8<sup>+</sup> diminue aussi leur production d'IFN- $\gamma$  et leur activité cytolytique<sup>258,259,264</sup>. Le fait que les LTe générés suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS sécrètent des niveaux similaires d'IFN- $\gamma$ , comparativement à ceux générés par l'immunisation avec les CD LPS, est en faveur d'une sécrétion d'IL-12 et d'IFN de type I adéquate par les CD40-B LPS. À l'opposé, la diminution de la production de granzyme B par les LTe générés suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS serait en faveur d'un défaut de sécrétion d'IL-12 et d'IFN de type I par les CD40-B LPS. Nous avons donc caractérisé la sécrétion d'IL-12 et d'IFN de type I par les CD40-B LPS et les CD LPS. Nous avons constaté que les CD40-B LPS produisent moins d'IL-12 et moins d'IFN de type I (IFN $\beta$ ) que les CD (Annexe 2). Afin d'augmenter la présence de ces cytokines au moment de l'activation du LT CD8<sup>+</sup>, du poly I:C a été injecté au moment de l'immunisation avec des CD40-B LPS. L'injection de poly I:C induit la sécrétion d'IFN de type I et d'IL-12 de façon systémique, augmentant l'inflammation<sup>474</sup>. Dans ces expériences, l'amplitude de la réponse de même que le rendement en LTm sont augmentés suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS et le poly I:C (Annexe 3). D'autres expériences doivent être effectuées afin de déterminer spécifiquement quelle cytokine est responsable de l'effet observé. Pour déterminer le rôle de l'IL-12, des immunisations dans des souris ne produisant pas d'IL-12 (délétion de la sous-unité p35 ou de p40) avec des CD40-B LPS et des CD LPS aussi déficientes en IL-12 pourraient être réalisées. Afin de déterminer le rôle des IFN de type 1, des Ac bloquants contre le récepteur des IFN de type I (clone MAR1-5A3) pourraient être administrés avant l'immunisation avec les CD40-B LPS et le poly I:C. Ainsi, si l'IL-12 ou les IFN de type I influencent la génération de LTm suite à l'immunisation avec des CD40-B LPS avec l'ajout de poly I:C, leur absence devrait récapituler le défaut de formation de LTm. Si les LTm sont toujours formés, malgré l'absence de signal via l'IL-12 ou les IFN de type I, alors il est possible qu'une redondance existe entre l'IL-12 et les IFN de type I dans notre modèle, ou qu'une autre cytokine soit responsable de la génération de LTm suite à l'immunisation avec des CD40-B avec l'ajout de poly I:C. En effet, l'injection de poly I:C induit aussi la production d'IL-6 et d'IFN- $\gamma$ , qui peuvent influencer la réponse des LT CD8<sup>+474</sup>.

L'IL-6 est une cytokine qui a le potentiel d'influencer la génération de LTm CD8<sup>+</sup>. Durant la phase effectrice suivant l'immunisation avec un Ag en combinaison avec un adjuvant, une population exprimant fortement le récepteur à l'IL-6 et le récepteur à l'IL-7 est présente et la majorité des LT CD8<sup>+</sup> qui survivent 30 jours post-immunisation expriment fortement ces récepteurs<sup>475</sup>. De plus, lorsque des LTe sont triés et transférés dans des souris ne sécrétant pas l'IL-6, il y a une diminution du nombre de LTm retrouvés, suggérant un rôle pour l'IL-6 dans le développement des LTm<sup>475</sup>. L'IL-6 joue aussi un rôle dans l'efficacité de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> suite à l'immunisation avec des LB activés *in vitro*<sup>121</sup>. En effet, les LB activés via le RCB et le TLR7 ont une plus grande capacité d'activation des LT CD8<sup>+</sup> que les CD40-B, en raison d'une production accrue d'IL-6. La présence d'IL-6 augmente la réponse secondaire des LT CD8<sup>+</sup> donc, potentiellement, le nombre de LTm présents<sup>121</sup>. Le rôle potentiel de l'IL-6 dans la formation et le maintien des LTm nous a mené à mesurer la sécrétion d'IL-6 par les CD40-B LPS et les CD LPS. Nous avons observé que les CD40-B LPS produisent moins d'IL-6 que les CD LPS (Annexe 4, figure 1c). Toutefois, l'ajout d'IL-6 au moment de l'immunisation avec les CD40-B LPS n'a pas augmenté la génération de LTe ni permis de restaurer la formation de LTm (Annexe 4, figure 2). De plus, nous avons démontré que la sécrétion d'IL-6 par les CD n'est pas requise pour la génération de LTm dans notre modèle d'immunisation (Annexe 4, figure 3). La diminution de la sécrétion de l'IL-6 n'est donc pas responsable de l'absence de génération de LTm suite à l'immunisation avec nos CD40-B. Suite à l'injection de poly I:C lors des immunisations avec les CD40-B, il est improbable que l'IL-6 soit responsable de l'augmentation de la génération des LTm.

L'IFN- $\gamma$  augmente l'expansion clonale et la génération de LTm CD8<sup>+</sup> lors d'une infection avec LCMV<sup>476,477</sup>. D'autres groupes ont démontré que la présence d'IFN- $\gamma$  augmente l'expansion clonale, mais aussi la contraction des LT CD8<sup>+</sup> lors d'infection avec *Lm* et LCMV<sup>478,479</sup>. Malgré la présence de données contradictoires dans la littérature, il serait pertinent de quantifier la production d'IFN- $\gamma$  par nos CD40-B LPS et nos CD LPS. Le récepteur de l'IFN- $\gamma$  est exprimé sur les LTn CD8<sup>+</sup><sup>480</sup>. Les LB ainsi que les CD peuvent produire de l'IFN- $\gamma$  dans certaines conditions<sup>93,481,482</sup> rendant possible un signal via l'IFN- $\gamma$  au moment de la reconnaissance antigénique.

Puisque nous observons un défaut d'induction du facteur de transcription Bcl-6 chez les LTe suite à l'immunisation avec les CD40-B LPS et que Bcl-6 peut être induit par la présence d'IL-21 et d'IL-10<sup>380</sup>, il est probable qu'une diminution de la sécrétion de ces cytokines contribue au défaut de génération de LTm observé. En effet, l'IL-21 promeut la survie des LTe, contribuant à leur accumulation au pic de la réponse et à la génération de LTm<sup>483,484</sup>. Puisque l'IL-21 est principalement produite par les LT CD4<sup>+</sup><sup>485</sup>, une diminution de la présence d'IL-21 lors d'immunisation avec les CD40-B pourrait refléter une diminution de l'activation des LT CD4<sup>+</sup> (par l'Ag mâle HY<sup>486</sup>), comparativement à l'immunisation avec les CD. Quant à l'IL-10, une cytokine associée à la répression du système immunitaire, elle augmente aussi la génération de LTm CD8<sup>+</sup> suite à une infection avec *Lm*<sup>487</sup>. L'IL-10 peut être produite par les CD40-B, mais aussi par les CD<sup>93,118,488</sup>.

Si la production de cytokines par les CD40-B LPS est moins importante que celle des CD, il est possible que le nombre de précurseurs transférés affecte la génération de LTm en influençant la biodisponibilité des cytokines, comme notre laboratoire l'a démontré pour l'IL-2 et la génération de SLEC<sup>276</sup>. Le transfert d'un nombre de précurseurs plus faible (500 cellules OT-1) mimant plus fidèlement la réponse endogène<sup>289</sup> serait nécessaire afin d'éliminer tout impact quant à la biodisponibilité des cytokines inflammatoires produites suite à nos immunisations avec des CD40-B LPS et des CD LPS. Lors de ces immunisations, il serait aussi possible de mesurer la réponse endogène et ainsi de déterminer si le répertoire polyclonal se comporte de façon similaire aux LT OT-1. Nous avons démontré que les CD40-B LPS peuvent induire une réponse effectrice endogène (Article 1, figure S2), mais il serait aussi pertinent de quantifier le taux de génération de LTm endogènes et de déterminer leur fonctionnalité par des infections avec une dose létale de *Lm*-OVA. Si la biodisponibilité des cytokines au moment du *priming* influence la génération de LTm, alors la diminution du nombre de précurseurs devrait restaurer la génération de LTm suite à l'immunisation avec des CD40-B LPS. Cette hypothèse pourrait aussi permettre de réconcilier l'absence ou le faible rendement de LTm que nous observons en transférant un nombre élevé de précurseurs à la

génération de LTm endogène suite à l'immunisation avec des CD40-B par le groupe de Vanden Bush<sup>121</sup>.

### **3.1.4 La qualité de l'interaction entre le LB et le LT CD8<sup>+</sup>**

Afin de comparer les signaux donnés par les CD40-B LPS au moment de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> à ceux donnés par les CD LPS, nous avons réalisé une hybridation sur puce d'ADN. Puisque l'activation du LTn CD8<sup>+</sup> permettant la génération de LTm se fait rapidement<sup>282,283,285</sup>, nous avons déterminé le profil d'expression génique des LT OT-1 24 h post-activation avec des CD40-B LPS OVA ou des CD LPS OVA. Cette expérience nous a permis de démontrer qu'environ 950 gènes sont différemment exprimés par les LT CD8<sup>+</sup> activés par les CD40-B LPS OVA et les LT CD8<sup>+</sup> activés par les CD LPS OVA (Annexe 2). Une analyse des voies de signalisation différemment induites a permis de constater une diminution de la signalisation en aval du RCT, des récepteurs de molécules de costimulation (CD28, CD27, OX40, 4-1BB) et des récepteurs de cytokines (IFN, TNF, IL-6) chez les LT OT-1 activés par les CD40-B LPS (Annexe 5). En raison des résultats présentés dans cette thèse et discutés précédemment, la diminution de la signalisation en aval du RCT et des molécules de costimulation nous a surpris. En effet, nous avons déterminé que les CD40-B LPS devaient fournir un signal 1 et un signal 2 de façon adéquate et que le défaut d'expansion des LTe et la génération inefficace des LTm devaient être causés par une production défailante de cytokines. Toutefois, ces données d'expression géniques suggèrent plutôt que les CD40-B LPS n'ont pas la capacité de fournir les 3 signaux de façon optimale pour activer complètement les LT CD8<sup>+</sup>.

Afin d'être activé de façon optimale, le LT CD8<sup>+</sup> requiert une interaction stable avec la CD, ce qui peut certainement influencer la transmission de tous les signaux d'activation. En absence de l'expression d'ICAM-1 par les CD, l'amplitude de la réponse effectrice n'est pas affectée, mais très peu de LTm sont générés<sup>389</sup>. Les CD40-B et les CD ayant une taille et une morphologie distinctes, il est possible que la surface et la durée de l'interaction avec le LT CD8<sup>+</sup> soient différentes. En effet, grâce à leurs dendrites, les CD matures ont la capacité

d'interagir intimement avec le LT CD8<sup>+</sup> en l'engloutissant lors de la reconnaissance antigénique, ce qui permet la formation d'une synapse immunologique organisée et une interaction prolongée<sup>389,489</sup>. Les CD, étant plus volumineuses que les CD40-B et possédant des dendrites, interagissent probablement sur une plus grande surface avec le LT CD8<sup>+</sup> au moment de la reconnaissance antigénique. Ainsi, plus d'interactions CMH/RCT peuvent avoir lieu simultanément, augmentant le signal RCT. De même, plus d'interactions entre les différentes molécules de costimulation peuvent avoir lieu, augmentant la force de ces signaux. Il est aussi possible que cette surface d'interaction accrue permette une interaction plus solide par la liaison des molécules d'adhésion, augmentant la durée d'interaction et ainsi la qualité des signaux perçus. Une proximité accrue et plus durable entre le LT CD8<sup>+</sup> et la CPA pourrait aussi permettre une meilleure perception du signal d'inflammation par le LT CD8<sup>+</sup> qui serait mieux positionné dans le microenvironnement inflammatoire.

Des expériences de microscopie pourraient clarifier l'hypothèse que les CD40-B interagissent moins longuement et intimement avec les LT CD8<sup>+</sup> que les CD. Il serait possible de comparer l'interaction des LT OT-1 avec des CD40-B LPS OVA et des DC LPS OVA lors d'activation *in vitro*. Grâce à des expériences de microscopie par intervalle, l'interaction des LT OT-1 avec les CD40-B ou les CD pourrait être caractérisée durant plusieurs heures. L'analyse informatique des images pourrait permettre de calculer la surface moyenne d'interaction ainsi que le temps moyen d'interaction entre les CD40-B/LT CD8<sup>+</sup> comparativement aux CD/LT CD8<sup>+</sup>. Si mon hypothèse s'avère véridique, alors la surface d'interaction sera plus petite et la durée d'interaction plus courte entre les CD40-B/LT CD8<sup>+</sup> comparativement aux CD/LT CD8<sup>+</sup>. Une diminution de la qualité d'interaction entre les CD40-B et les LT CD8<sup>+</sup> pourrait expliquer pourquoi les hybridations sur puce (Annexe 5) suggèrent que l'ensemble des signaux (RCT, costimulation, cytokine) est diminué chez le LT CD8<sup>+</sup> lors de l'activation *in vitro*.

### **3.1.5 Modèle illustrant l'activation des LT CD8<sup>+</sup> par les CD40-B et les CD**

Selon toutes les expériences que j'ai réalisées et en m'appuyant sur la littérature, je propose que l'activation des LTn CD8<sup>+</sup> par les CD40-B LPS soit sous-optimale en raison d'une diminution de la durée et de l'intimité d'interaction au moment de l'activation. Ainsi, malgré une expression suffisante de l'Ag et des molécules de costimulation à leur surface, les CD40-B sont incapables de fournir ces signaux adéquatement aux LT CD8<sup>+</sup> en raison d'une interaction de trop courte durée entre eux. De plus, le signal 3 donné par la sécrétion de cytokines est diminué puisque les CD40-B LPS produisent moins d'IL-12 et d'IFN de type I que les CD LPS. Encore une fois, des interactions de trop courtes durée peuvent diminuer la perception du signal des cytokines par les LT CD8<sup>+</sup>, ceux-ci étant en contact avec la cellule productrice moins longtemps et donc soumis à une concentration moins élevée de cytokines. Le signal global perçu par le LT CD8<sup>+</sup> n'est alors plus suffisant pour induire la différenciation en LTm. L'activation des LT CD8<sup>+</sup> par les CD40-B et les CD est schématisée à la figure 15.

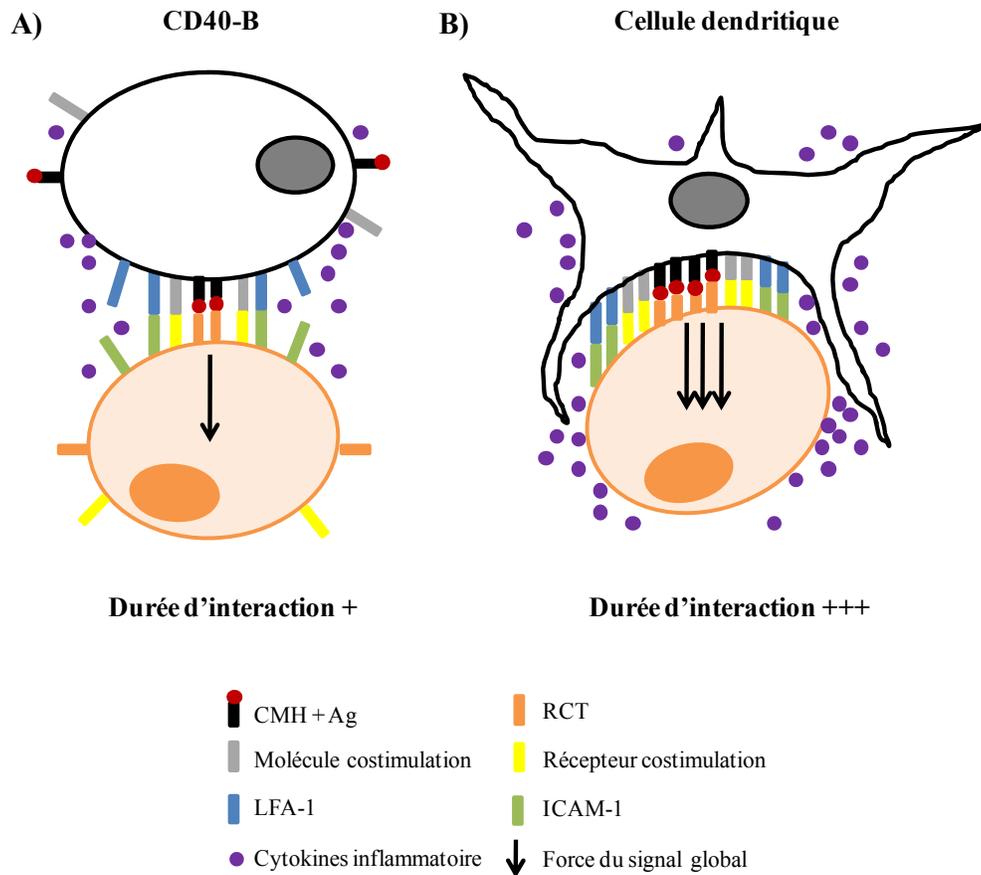


Figure 15. Modèle d'activation d'un LT CD8<sup>+</sup> par une CD40-B (A) et une cellule dendritique (B). Les CD40-B interagiraient moins intimement et moins longtemps avec les LT CD8<sup>+</sup> lors de l'activation diminuant le signal global donné.

### 3.1.6 Perspectives

#### 3.1.6.1 L'utilisation thérapeutique des CD40-B

Malgré une présentation de l'Ag sous optimale, il est pertinent de poursuivre l'étude des CD40-B en tant que CPA. D'abord, malgré une génération déficiente de LTm CD8<sup>+</sup> suite à l'immunisation, des LTE fonctionnels sont produits, ce qui peut s'avérer très important dans un contexte de vaccination thérapeutique contre des cellules tumorales. Un point très positif est la production d'IFN- $\gamma$  et l'activité cytotoxique des LTE générés suite à l'immunisation avec

les CD40-B. En effet, la production d'IFN- $\gamma$  est associée au contrôle des tumeurs<sup>490,491</sup> alors que l'activité cytotoxique peut permettre l'élimination directe de cellules tumorales. Afin d'améliorer leur potentiel de présentation de l'Ag dans un contexte activateur, les CD40-B pourront être modifiés. En effet, les CD40-B peuvent être transfectés avec différents ARN codant pour des cytokines comme par exemple l'IL-12 afin d'augmenter leur capacité de présentation de l'Ag<sup>123,125</sup>. Les CD40-B pourraient aussi être administrés en combinaison avec un adjuvant comme le poly I:C, qui peut être utilisé chez l'humain, afin d'augmenter la réponse des LT CD8<sup>+</sup> et de favoriser l'élimination des cellules cancéreuses<sup>492,493</sup>. De plus, afin d'optimiser le nombre de CPA produites à partir d'un seul don de sang, des CD et des CD40-B pourraient être isolés ou différenciés, puis maturés simultanément. Les CD40-B pourraient être administrés en combinaison avec les CD, ou encore en tant que rappel suite à une première immunisation avec les CD. Finalement, les CD40-B pourraient servir de CPA *in vitro*, afin d'activer des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> contre différents Ag tumoraux; ces LT pourraient ensuite être infusés au patient. Les CD40-B pourraient être chargés avec des peptides connus comme gp100 ou Melan-A/MART-1<sub>26-35</sub> dans le cas de mélanome ou des lysats tumoraux, puisque les CD40-B ont une certaine capacité à acquérir et à présenter des Ag solubles<sup>91,92,494</sup>.

Des thérapies où l'injection de CD s'est faite en combinaison avec un autre traitement, comme l'injection d'IL-2 (carcinome rénal)<sup>495</sup> ou d'un Ac anti-CTLA4 (mélanome)<sup>496</sup>, démontrent une régression tumorale durable. L'immunothérapie se dirige vers des traitements où la réactivation du système immunitaire se fait en combinaison avec d'autres traitements qui visent l'activation générale du système immunitaire ou l'inhibition des mécanismes de tolérance tumoraux<sup>83,497</sup>. De nouvelles thérapies proposent même de traiter de façon préventive certains patients avec des lésions à haut risque tumoral (adénomes avancés du colon)<sup>498</sup>. Une niche potentielle pour la vaccination avec les CD40-B pourrait être l'immunisation de patients en rémission d'un cancer dont les chances de rechutes sont élevées, comme les leucémies T lymphoblastiques aiguës ou les leucémies myéloïdes aiguës<sup>499-501</sup>. L'immunisation des patients en rémission, avec les CD40-B présentant des Ag issus de leurs cellules cancéreuses, pourrait contribuer à générer des LTm spécifiques, les protégeant contre une éventuelle rechute. La génération de LTe pourrait aussi permettre d'éliminer la maladie

résiduelle, un autre avantage potentiel de la vaccination thérapeutique. Les CD40-B pourraient donc faire partie des cocktails de traitement pour traiter ou prévenir le cancer. L'utilisation de CD40-B serait avantageuse, car ils peuvent être obtenus en grands nombres à partir d'un don de sang.

Dans un contexte d'immunothérapie, il est primordial de pouvoir amplifier les cellules selon une méthode appropriée pour l'utilisation en clinique. Jusqu'à maintenant, les CD40-B ont principalement été générés sur des fibroblastes murins 3T3 exprimant le CD40L<sup>109</sup>. Toutefois, une contamination indésirable de ces cellules pourrait accompagner les CD40-B humain et induire une réponse immunitaire. Pour contrer cela, des équipes optimisent l'activation des LB par du CD40L trimérique, nécessaire pour un signal approprié via le CD40<sup>130,502</sup>. Cette activation est efficace pour amplifier et activer des LB naïfs, mais aussi pour rendre des LB malins immunostimulateurs<sup>503</sup>. Pour l'utilisation clinique, des milieux sans sérum sont utilisés afin de minimiser les contaminations par différents pathogènes et d'éliminer l'effet de protéines inconnues qui peuvent influencer la culture, mais aussi être immunogènes. À cet effet, Héma-Québec met présentement au point des protocoles de cultures des CD40-B où les milieux sont supplémentés, entre autres, avec de l'albumine humaine<sup>504</sup>. Les CD40-B présentent donc un intérêt réel comme source alternative de CPA.

### **3.1.6.2 Avancement des connaissances**

D'un point de vue fondamental, l'étude des CD40-B en tant que CPA contribue aussi à mieux comprendre les mécanismes permettant de générer des LTm CD8<sup>+</sup>. Le fait que l'activation des LT CD8<sup>+</sup> avec les CD40-B permette la génération de LTe, mais pas la génération de LTm, démontre que les signaux donnés au moment de la reconnaissance antigénique sont importants pour influencer le devenir du LT. Ce fait est en faveur du modèle de différenciation de la force du signal. Selon ce modèle, un signal d'une certaine intensité doit être donné afin de permettre la génération de LTm, mais ce signal serait moins fort que celui requis pour induire la différenciation terminale des LTe. Dans notre modèle, le signal donné par les CD40-B est suffisant pour induire la génération de LTe, mais pas celle de LTm.

Si la diminution de l'intimité et de la durée d'interaction entre le CD40-B et le LT diminue la force du signal perçu au moment de l'activation, induisant la différenciation en LTe, mais pas en LTm, alors cela signifie que la différenciation des LTe requiert un signal d'une intensité plus faible que la différenciation des LTm. Cela irait à l'encontre des modèles du potentiel décroissant et de la force du signal proposés pour expliquer la génération des différentes populations de LT CD8<sup>+</sup> suite à une réponse immune, où la force du signal permettant la différenciation des LTm est plus faible que la force du signal requis pour la différenciation des LTe. Mes données actuelles quant à l'immunisation avec les CD40-B peuvent difficilement être mises en perspective quant au modèle de la division asymétrique. Cependant, dans l'éventualité où nous démontrerions que les CD40-B donnent un signal d'activation global plus faible que celui des CD au moment de l'immunisation, nous pourrions émettre l'hypothèse que l'activation des LT CD8<sup>+</sup> par les CD40-B ne permet pas la division asymétrique car une certaine force d'activation serait nécessaire pour l'induire. La cellule proximale à la synapse immunologique reçoit un signal plus fort que la cellule distale et acquiert un phénotype de SLEC alors que la cellule distale acquiert un phénotype de MPEC et se différencie en LTm<sup>364-366</sup>. Il est donc possible que suite à une activation de force insuffisante, la division asymétrique n'ait pas lieu diminuant la génération de LTm. De telles observations pourraient permettre de démontrer l'importance du modèle de la division asymétrique dans la génération de LTm.

## **3.2 Le rôle de la voie de signalisation de Notch lors de la réponse immune des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

### **3.2.1 La régulation de l'expression de PD-1**

#### **3.2.1.1 La régulation directe au promoteur de PD-1**

La seconde hypothèse émise dans le cadre de ma thèse était que la voie de signalisation Notch influence la réponse du LT CD8<sup>+</sup>. Dans l'article 2 (*Notch signalling regulates PD-1 expression during CD8<sup>+</sup> T cells activation*), j'ai démontré que la transcription de l'ARNm de PD-1 est directement régulée par la voie de signalisation de Notch suite à l'activation des LT

CD8<sup>+</sup>. Grâce à des immunoprécipitations de la chromatine, nous avons montré que le site de liaison de RBPJκ auquel le NICD se lie est situé entre l'exon 1 et 2 du gène *Pdcd1* (Article 2, figure 6). La figure 16 illustre ce site de liaison du NICD à RBPJκ parmi les sites de liaisons des autres facteurs de transcription connus pour réguler la transcription de *Pdcd1*. Des études de CHIP-seq, réalisées dans des leucémies T lymphoblastiques (T-LL), démontrent que la majorité des sites de liaisons du NICD aux gènes régulés par Notch se retrouve à l'extérieur des régions promotrices, soit dans les introns, les exons ou des régions intergéniques, c'est-à-dire des amplificateurs (*enhancers*) distaux<sup>505</sup>. Il n'est donc pas étonnant de retrouver ce site de liaison dans un intron.

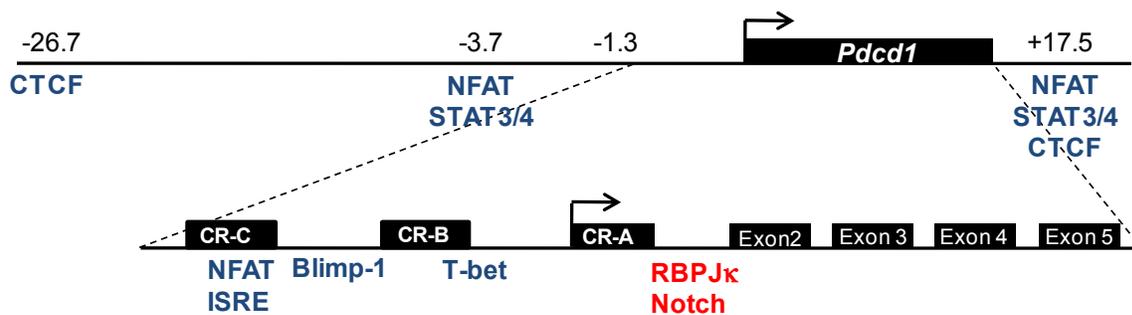


Figure 16. Schéma du site d'interaction de RBPJκ et du NICD au gène *Pdcd1* ainsi que des autres facteurs de transcription connus pour leur liaison directe au promoteur. Les chiffres représentent les distances en Kb par rapport au site d'initiation. La flèche représente le site d'initiation de la transcription. CR-A B et C : région conservée A, B et C. La région CR-A correspond à l'exon 1 du gène *Pdcd1*.

Nos expériences d'immunoprécipitation de la chromatine démontrent que RBPJκ n'est pas présent au site de liaison chez les LTn (Article 2, figure 6). L'activation du LT CD8<sup>+</sup> est donc nécessaire afin de permettre l'accessibilité de RBPJκ et du NICD au promoteur *Pdcd1*. L'augmentation de la liaison de RBPJκ et du NICD au site RBPJκ numéro 3 du promoteur de *Pdcd1* est statistiquement significative seulement 6 h post-activation, alors que l'expression de la protéine PD-1 est diminuée durant au moins 48 h en présence du GSI (Article 2, figure 5 et

6). Dans l'article 2, nous avons posé trois hypothèses afin d'expliquer cette observation. Premièrement, la liaison du NICD pourrait induire un changement de conformation permanent de la chromatine augmentant la transcription du gène *Pdcd1* en y facilitant l'accès des autres éléments régulateurs. Dans ce cas, 6 h et 24 h post activation, la chromatine ouverte aux environs du site d'interaction de Notch (région CR-A qui correspond à l'exon 1) devrait être hypersensible à la DNaseI. De plus, le profil d'acétylation et de méthylation des nucléosomes devrait être caractéristique d'un gène actif. La transcription active est caractérisée par H3K9Ac, H3K27Ac, H3Ac, H3K4me2 et H3K4me3<sup>506</sup> alors que la présence de H3K9me3, H3K27me3 et H4K20me3 est associé à la répression de la transcription<sup>193</sup>. L'induction d'un changement de conformation de la chromatine par le NICD, en influençant l'acétylation/méthylation des histones, est possible car le NICD a la capacité de recruter des acétyltransférases comme p300 et PCAF<sup>416</sup> mais aussi des méthyltransférases comme SETDB1<sup>507</sup>. Il serait aussi pertinent de caractériser l'état de la chromatine aux régions CR-B et CR-C, qui pourraient être influencées par la présence du NICD soit de façon distale ou grâce à l'interaction avec d'autres facteurs de transcription, indépendamment de RBPJK. La présence du NICD peut induire des modifications du profil d'acétylation principalement via H3K27Ac sur le promoteur et ses amplificateurs distaux dans un modèle de T-LL<sup>505</sup>. Ces changements dépendants du NICD peuvent s'effectuer sur une distance dépassant les 10-20 Kb<sup>505</sup>. Cette hypothèse est plausible puisque les gènes situés dans une région bordée par des sites de liaison CTCF (comme *Pdcd1*, figure 16), contenant un site de liaison RBPJK/NICD, ont une probabilité plus élevée d'être régulé par Notch<sup>505</sup>. Les sites de liaison de CTCF agissent comme des frontières délimitant des domaines géniques arborant des modifications de la chromatine activatrices et inhibitrices<sup>508</sup>. Deuxièmement, un Ac anti-N1 a été utilisé pour les immunoprécipitations de la chromatine, alors qu'il y a une redondance entre les récepteurs N1 et N2 et que les LT CD8<sup>+</sup> activés expriment les 2 récepteurs. Il est donc possible que le NICD de N1 ne soit plus présent à ce site 24 h post immunisation, laissant la place au NICD de N2. Toutefois, l'expression des récepteurs N1 et N2 étant augmentée simultanément suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> et maintenue plus de 24 h post-activation (Article 2, figure 1), il est peu probable que seul N1 soit responsable de l'expression précoce de PD-1 et que seul N2 soit

responsable de l'expression tardive de PD-1. Troisièmement, il est possible que la protéine PD-1 soit très stable, alors l'effet de Notch serait maintenu au cours du temps.

D'autres hypothèses peuvent expliquer la présence de RBPJ $\kappa$  et du NICD au site de liaison RBPJ $\kappa$ 3 seulement 6 h, mais pas 24 h, post activation, alors que l'expression de la protéine PD-1 est diminuée durant plus de 24 h en présence de GSI. D'abord, le NICD pourrait interagir avec un autre facteur de transcription impliqué dans la régulation de la transcription de *Pdcd1*. En effet, le NICD a la capacité de lier d'autres facteurs de transcription que RBPJ $\kappa$ , par exemple CREB<sup>427</sup> et NF- $\kappa$ B<sup>429</sup>. Des études à l'aide de promoteurs *Pdcd1* tronqués, couplés à un gène rapporteur de luciférase, pourraient permettre de déterminer si d'autres régions en aval du site de transcription sont importantes pour l'effet de Notch sur la transcription de *Pdcd1*. Ces promoteurs tronqués pourraient être cotransfectés avec le NICD dans des EL4, et l'activité de la luciférase mesurée suite à l'activation des EL4 par la PMA/ionomycine<sup>193,461</sup>. Si la délétion d'une région diminue l'activité de la luciférase, alors cette région contiendra des éléments de régulation directe de la transcription par Notch. Une analyse *in silico* de cette région pourrait permettre d'identifier des facteurs de transcription s'y liant, représentant alors des partenaires potentiels d'interaction avec le NICD. Finalement, il pourrait y avoir un effet indirect de N1 sur la transcription d'autres gènes requis pour la transcription de *Pdcd1*. En effet, Notch a la capacité d'augmenter la transcription de nombreux gènes. Il pourrait donc augmenter directement la transcription de *Pdcd1* dans les heures suivant l'activation des LT CD8<sup>+</sup> et ensuite augmenter indirectement sa transcription via l'augmentation de l'expression d'autres facteurs de transcription connus pour réguler l'expression de PD-1.

### **3.2.1.2 La régulation de l'expression de PD-1 *in vivo***

Nos expériences *in vitro* démontrent que l'expression de PD-1 induite suite à l'activation du LT CD8<sup>+</sup> est augmentée par la voie de signalisation Notch. Nous pouvons émettre l'hypothèse que, suite à la reconnaissance de l'Ag, l'expression de PD-1 sera augmentée suite à l'activation de la voie de signalisation Notch *in vivo*. Afin de démontrer

cette hypothèse, des souris exprimant ou non les récepteurs N1 et N2 chez les LT CD8<sup>+</sup> (souris N1N2<sup>Δ/Δ</sup> ou N1N2<sup>fl/fl</sup>) pourraient être infectées avec LCMV Armstrong ou *Lm*-OVA. Puisque la voie de signalisation Notch régule l'expression de PD-1 *in vitro* suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> (Article 2), il est attendu que les LTe N1N2<sup>Δ/Δ</sup> expriment moins de PD-1 lors d'infection LCMV Armstrong ou *Lm*-OVA que les LTe N1N2<sup>fl/fl</sup>. Cependant, dans un modèle de GVHD, il a été démontré que les LT CD8<sup>+</sup> expriment plus fortement PD-1 lorsque la voie Notch est inhibée grâce à l'expression de DNMA1<sup>433</sup>. Dans ce modèle d'induction de GVHD, les souris sont irradiées, ce qui induit de l'inflammation. De plus, les dommages tissulaires provoqués par la GVHD induisent aussi de l'inflammation<sup>509,510</sup>. Puisque la voie de signalisation Notch module l'expression de certaines molécules chez les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en fonction du contexte inflammatoire<sup>454,461</sup>, il est probable que l'effet de la signalisation de Notch varie en fonction des modèles étudiés. La GVHD et les infections *Lm* ou LCMV induisent tous un profil de cytokines distinct, qui pourrait influencer l'expression de PD-1<sup>259,509,510</sup>. Lors de la GVHD, une multitude de cytokines est sécrétée (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-21, IL-22, IL-23)<sup>510</sup> alors que l'infection avec LCMV induit principalement la production d'interférons de type I et l'infection avec *Lm* la production d'IL-12 et d'interférons de type I<sup>259</sup>. Par exemple, IRF9 (liant les ISRE) et les STAT3/4 induits suite à la signalisation par les interférons et certaines cytokines pourraient contribuer à augmenter l'expression de PD-1<sup>189,190</sup>. À l'opposé, une induction forte de T-bet et de Blimp-1, qui inhibent l'expression de PD-1 suite à l'activation du LT<sup>192,193</sup>, pourrait réprimer l'expression de PD-1. Il est probable que l'effet de la signalisation de Notch sur l'expression de PD-1 soit influencé par l'environnement génique façonné par la présence des autres facteurs de transcription induits dans les différents modèles étudiés.

Suite à la reconnaissance de l'Ag, il y a une augmentation transitoire de PD-1, mais lorsque l'Ag est présent de façon chronique, l'expression du PD-1 est maintenue et caractérise les LTe CD8<sup>+</sup> épuisés non fonctionnels<sup>305</sup>. Il serait intéressant de caractériser l'effet de la délétion des récepteurs Notch sur l'expression du PD-1 lors d'infections chroniques avec LCMV clone 13. Si l'inhibition de la voie de signalisation Notch permet aussi de diminuer l'expression de PD-1 dans ce type d'infection, alors il est probable que l'inhibition de la voie

de signalisation Notch contribue à restaurer les fonctions effectrices des LTe épuisés. L'inhibition de cette voie pourrait potentiellement contribuer au traitement d'infections incurables comme le VIH ou l'hépatite C.

### **3.2.2 Le rôle de Notch lors de la réponse immune des LT CD8<sup>+</sup>**

Dans le 3<sup>e</sup> article de cette thèse (*Context dependent role for the Notch signalling pathway during CD8<sup>+</sup> T cell response*), nous avons comparé la réponse des LT CD8<sup>+</sup> exprimant ou non les récepteurs N1 et N2, suite à l'infection avec *Lm* ou l'immunisation avec les CD. Brièvement, dans nos deux modèles, l'absence de ces récepteurs Notch influence l'expansion clonale et le phénotype des LTe, mais n'a pas empêché la formation de LTm. La production d'IFN- $\gamma$  est diminuée en absence des récepteurs Notch suite à l'immunisation avec les CD, mais pas suite à l'infection avec *Lm*. Les différents phénotypes observés dans cet article seront discutés et des hypothèses pour les expliquer seront proposées.

#### **3.2.2.1 La voie de signalisation de Notch et la réponse effectrice**

##### *3.2.2.1.1 Les phénotypes SLEC et MPEC*

Au pic de la réponse immune, le LTn CD8<sup>+</sup> a fait un choix de différenciation afin de former les MPEC, les SLEC ou les EEC<sup>287,297</sup>. Nous avons démontré que la voie de signalisation Notch est impliquée dans ce choix de différenciation SLEC/MPEC/EEC. En effet, suite à une infection avec *Lm* ou à une immunisation avec des CD, l'absence des récepteurs N1 et N2 chez les LT CD8<sup>+</sup> a induit une diminution de la génération de SLEC et une augmentation des EEC (Article 3, figure 1c, d et 2c, d). Les EEC sont des LTe moins différenciés, qui ont encore la capacité de former des SLEC ou des MPEC<sup>297</sup>. La signalisation Notch contribuerait donc à la différenciation des EEC en SLEC. En absence des récepteurs Notch, une diminution de la génération de SLEC pourrait être causée par une diminution du signal des cytokines inflammatoires comme l'IL-2 ou l'IL-12<sup>246,247,254,259,276</sup>. Il est aussi probable que l'expression de différents facteurs de transcription comme T-bet, Eomes,

Blimp-1 ou Bcl-6<sup>246,251,254,275,276,367,368,375,380,381,383</sup>, qui jouent un rôle central dans la différenciation des SLEC et des MPEC, soit affectée. Ces hypothèses seront détaillées et discutées dans les prochains paragraphes.

Un signal primordial pour la génération de SLEC est celui provenant de l'IL-2. Les LT CD8<sup>+</sup> exprimant plus fortement l'IL-2R $\alpha$  (CD25) reçoivent un signal plus fort de l'IL-2, ce qui mène à l'activation du facteur de transcription Blimp-1 et à la formation préférentielle de SLEC<sup>246,247,275,276</sup>. La signalisation Notch augmente l'expression de l'IL-2R $\alpha$  chez les LT CD4<sup>+</sup><sup>511</sup>. L'IL-2R $\alpha$  a aussi été identifiée comme une cible directe du NICD chez les thymocytes<sup>512</sup>. Il est donc probable que la voie de signalisation Notch régule aussi l'expression de l'IL-2R $\alpha$  chez les LT CD8<sup>+</sup> activés. Suite aux infections et aux immunisations, les souris N1N2 $\Delta\Delta$  pourraient donc exprimer moins d'IL-2R $\alpha$ , diminuant le signal provenant de l'IL-2 et l'induction de Blimp-1, causant ainsi une diminution des SLEC. En appui à cette hypothèse, 5 jours post-immunisation, nous observons une diminution de l'expression de l'IL-2R $\alpha$  en absence des récepteurs Notch chez les LT CD8<sup>+</sup> (données de Frédéric Duval, Annexe 6). Cependant, puisque la voie de signalisation Notch induit l'expression d'autres facteurs de transcription comme Hes1, Deltex ou Myc<sup>512</sup>, il est possible que cette régulation de l'expression de l'IL-2R $\alpha$  soit indirecte. En effet, la surexpression de Hes1, qui est induite par le NICD suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> (Article 2, figure 1d), augmente l'expression de l'IL-2R $\alpha$  chez les thymocytes<sup>513</sup>. De plus, dans nos expériences d'activation *in vitro*, l'utilisation de GSI affecte peu l'expression de IL-2R $\alpha$  à des temps précoces suivant l'activation des LT CD8<sup>+</sup> (Article 2, données non présentées). Il est donc possible que la signalisation Notch permette de soutenir l'expression de CD25 à des temps plus tardifs pour favoriser la différenciation en SLEC. Une telle observation a été faite chez les LT CD4<sup>+</sup>. Chez les LT CD4<sup>+</sup> n'exprimant pas RBPJ $\kappa$ , l'expression de CD25 est normale 36 h suivant l'induction de la GVHD, alors qu'elle est diminuée au 5<sup>e</sup> jour<sup>455</sup>.

Il serait possible qu'une diminution de la sensibilité à d'autres cytokines comme l'IL-12, via l'induction de T-bet, contribue aussi à la diminution de la génération de SLEC en

absence de signal Notch. Une diminution de l'expression de l'ARNm de l'IL-12R $\beta$ 2 a été observée chez les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> exprimant un DNAM1 dans un modèle de GVHD<sup>455</sup>. Cependant, dans ce modèle, malgré une diminution de l'IL-12R $\beta$ 2, l'expression de T-bet n'est pas affectée<sup>433,455</sup>. Le signal via l'IL-12 influence directement les niveaux d'expression de T-bet qui, à son tour, promeut la différenciation des SLEC<sup>254</sup>. Or, suite à l'infection avec *Lm* ou l'immunisation avec les CD, les niveaux d'expression de T-bet sont identiques chez les LTe N1N2 $\Delta\Delta$  et N1N2<sup>fl/fl</sup> au pic de la réponse (Article 3, figure S2c, d). Il est donc probable que le signal via l'IL-12 soit perçu de façon similaire par les LTe N1N2 $\Delta\Delta$  et N1N2<sup>fl/fl</sup>. Pour cette raison, l'hypothèse que l'expression des récepteurs Notch influence l'expression de l'IL-12R $\beta$ 2 chez les LT CD8<sup>+</sup> afin de moduler la différenciation en SLEC est défavorisée.

Le phénotype MPEC/SLEC est aussi influencé par les niveaux relatifs de différents facteurs de transcription dont T-bet, Eomes, Blimp-1 et Bcl-6. Suite à l'infection avec *Lm* ou l'immunisation avec les CD, l'expression de T-bet et Eomes chez les LTe au jour 7 post-immunisation a été mesurée. Dans les deux modèles, nous avons observé une expression similaire de T-bet, mais une diminution de l'expression d'Eomes chez les LTe N1N2 $\Delta\Delta$  comparativement aux LTe N1N2<sup>fl/fl</sup> (Article 3, figure S2). La diminution de l'expression d'Eomes en absence des récepteurs Notch est en accord avec les données du groupe d'Osborne<sup>428</sup>. À l'opposé, lors d'induction de GVHD, les LT CD8<sup>+</sup> expriment des niveaux plus élevés d'Eomes<sup>433,455</sup> suggérant que l'influence de la signalisation Notch sur l'expression des facteurs de transcription peut varier en fonction des modèles étudiés. Une étude a montré que T-bet est nécessaire pour induire la formation des SLEC<sup>254</sup>. Or dans notre modèle, une diminution importante des SLEC est possible, même en présence de niveau d'expression de T-bet similaire, indiquant qu'un autre facteur de transcription est requis pour la différenciation des SLEC. Ce facteur de transcription pourrait être Blimp-1, qui est induit par le signal du récepteur à l'IL-2<sup>246,247,276</sup>. Il sera important de mesurer l'expression de Blimp-1 chez nos différents LTe. Une diminution de l'expression de Blimp-1 appuierait l'hypothèse d'une diminution de l'expression de l'IL-2R $\alpha$  en absence des récepteurs Notch. Malgré une inhibition du signal Notch, des niveaux d'expression de T-bet similaires chez les LT et CD8<sup>+</sup> ont aussi été observés dans des modèles de GVHD<sup>454,455</sup>. Il est possible que

l'expression de T-bet, qui peut aussi être induite par la signalisation du RCT et un signal via l'IL-12R<sup>254,370</sup>, ne soit pas influencée par la présence de Notch dans nos modèles d'immunisation et d'infection ou lors de la GVHD.

Selon les différentes hypothèses discutées précédemment, nous proposons que l'induction de la différenciation des SLEC par la voie de signalisation Notch puisse se faire de la façon suivante. Suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup>, l'augmentation des récepteurs Notch permettrait d'augmenter le signal Notch induit par l'interaction avec leurs ligands. Le NICD régulerait directement et/ou indirectement la transcription de l'IL-2R $\alpha$  pour augmenter la réceptivité envers l'IL-2. Chez les LT CD8<sup>+</sup> exprimant fortement les ligands de Notch, le signal accru via l'IL-2R permettrait d'activer le facteur de transcription Blimp-1 pour favoriser la différenciation en SLEC (Figure 17).

La régulation de l'IL-2R $\alpha$  par la signalisation Notch semble une candidate particulièrement intéressante pour expliquer la diminution de la génération de SLEC en absence des récepteurs Notch. Les éléments régulateurs liés par le NICD peuvent être situés hors de la région promotrice des gènes et certains sites liés par le NICD ne sont pas régulés de façon dynamique suite à la signalisation Notch<sup>505</sup>. Ainsi, il est probable de manquer un site de liaison du NICD ou d'identifier un site de liaison du NICD qui ne contribue pas à la régulation du gène d'intérêt. Alors, pour identifier un gène cible potentiellement directement régulé par la voie de signalisation Notch comme l'IL-2R $\alpha$ , il serait pertinent de réaliser des essais de lavage d'inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase<sup>461,505,514</sup>. Pour ce faire, des LT CD8<sup>+</sup> seraient activés *in vitro* en présence d'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase (GSI, le DAPT par exemple) ce qui causerait une accumulation des récepteurs Notch partiellement clivés par ADAM à la surface des cellules. Ensuite, le GSI serait lavé, permettant le clivage complet du NICD. Au moment du lavage, de la cycloheximide serait ajoutée afin d'inhiber la synthèse protéique. Si l'expression de l'IL-2R $\alpha$  est directement régulée par Notch, alors son expression sera inhibée par le GSI et son ARNm sera rapidement transcrit suite au lavage. Par la suite, si l'IL-2R $\alpha$  se comporte comme un gène directement régulé par Notch, les sites de liaison RBPJk pourraient

être identifiés dans sa séquence génique et des immunoprécipitations de la chromatine avec des Ac anti-NICD et anti-RBPJk pourraient être réalisées afin de confirmer leurs présences aux sites d'intérêts.

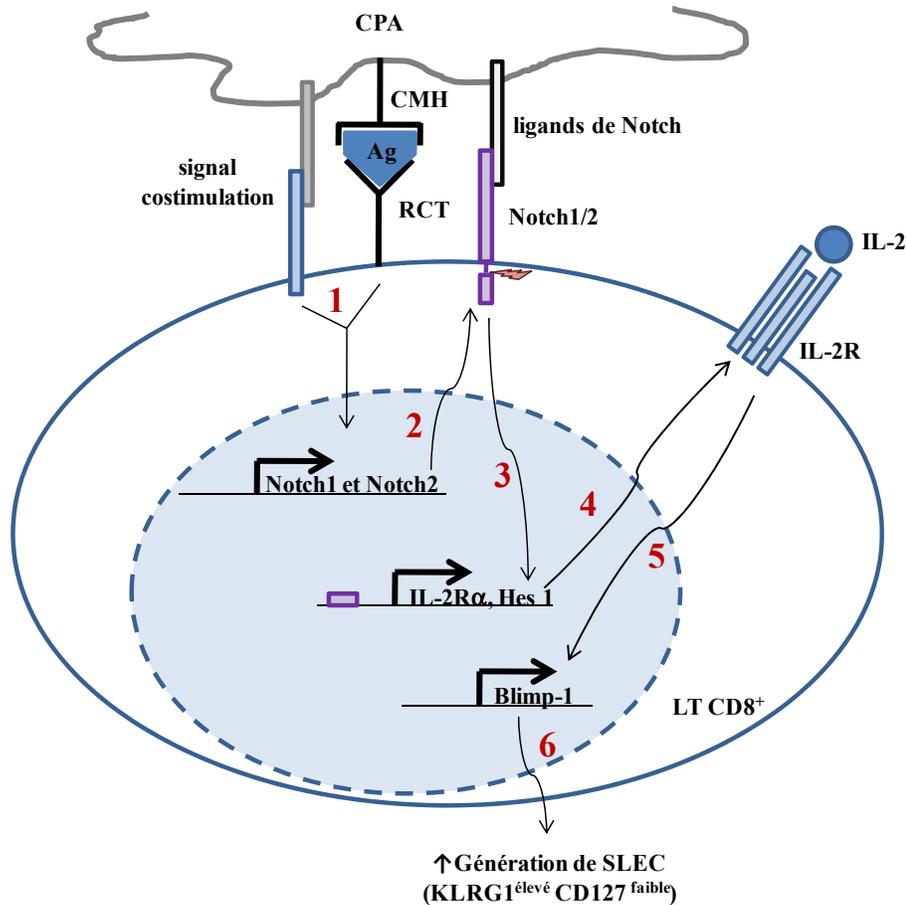


Figure 17. Mécanisme proposé permettant à la voie de signalisation Notch de promouvoir la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> en SLEC. Suite à la reconnaissance de l'Ag, il y a augmentation de la transcription (1) et de l'expression des récepteurs N1 et N2 à la surface des LT CD8<sup>+</sup> (2). L'interaction des récepteurs Notch avec les ligands de Notch présents sur les CPA augmente la concentration de NICD, qui transloquent au noyau afin d'activer des gènes cibles comme CD25 ou Hes1 (3), qui vont permettre d'augmenter directement ou indirectement l'expression de l'IL-2R (4), et ainsi permettre un signal accru via l'IL-2, ce qui induira une augmentation de l'expression de Blimp-1 (5), qui favorisera la différenciation en SLEC (6).

### 3.2.2.1.2 La sécrétion de cytokines et la fonctionnalité

Un défaut de production d'IFN- $\gamma$  par les LTe N1N2 $\Delta\Delta$  suite à l'immunisation avec les CD a été observé (Article 3, figure 3c, d). Par contre la production d'IFN- $\gamma$  suite à une infection avec *Lm*-OVA est similaire entre les LTe N1N2 $\Delta\Delta$  et N1N2 $^{fl/fl}$  (Article 3, figure 3a, b). Afin de corrélérer la sécrétion d'IFN- $\gamma$  avec la fonctionnalité des LTe, des infections avec une dose létale de *Lm*-OVA 7 jours post-immunisation ont été réalisées. En effet, la production d'IFN- $\gamma$  est importante pour le contrôle de l'infection avec *Lm*<sup>56</sup>. Lorsque les souris N1N2 $\Delta\Delta$  et N1N2 $^{fl/fl}$  ont préalablement été immunisées avec des CD-OVA, le contrôle de la dose létale de *Lm*-OVA est 10 à 1000 fois supérieur chez les souris N1N2 $^{fl/fl}$  que les souris N1N2 $\Delta\Delta$  (Article 3, figure 3f). Ce résultat est en accord avec un défaut de production de l'IFN- $\gamma$  par les LT CD8<sup>+56</sup>. Les LT CD8<sup>+</sup> peuvent aussi assurer une protection contre une infection *Lm* grâce à la sécrétion de TNF- $\alpha$ <sup>515,516</sup>. La production de TNF- $\alpha$  par les LTe N1N2 $\Delta\Delta$  et N1N2 $^{fl/fl}$  générés suite à l'immunisation avec des CD, est similaire (Annexe 7), il est donc peu probable que le TNF- $\alpha$  soit responsable du défaut d'élimination de *Lm*. Lorsque les souris N1N2 $\Delta\Delta$  et N1N2 $^{fl/fl}$  sont préalablement infectées avec *Lm*-OVA, le contrôle de la dose létale de *Lm*-OVA par les LTe est similaire chez les souris N1N2 $\Delta\Delta$  et N1N2 $^{fl/fl}$  (Article 3, figure 3e). Ce résultat est en accord avec une production similaire d'IFN- $\gamma$  par les LTe exprimant ou non les récepteurs Notch suite à une infection *Lm*.

Il est probable que la différence entre les niveaux d'inflammation présents lors d'infection avec *Lm* et d'immunisation avec les CD soit responsable des différents phénotypes observés au niveau de la production d'IFN- $\gamma$ . En effet, il est possible que lors d'infection avec *Lm*, la production d'IFN- $\gamma$  soit maximale en raison du signal fourni par les cytokines inflammatoires. Suite à une infection avec *Lm*, une grande quantité d'IL-12 est produite. L'IL-12 peut induire le facteur de transcription T-bet, qui régule directement la transcription de l'IFN- $\gamma$  chez les LT CD4<sup>+461</sup>, de façon dose-dépendante<sup>254</sup>. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une induction forte de T-bet serait suffisante afin d'induire la production maximale d'IFN- $\gamma$  chez les LT CD8<sup>+</sup>. Le signal via l'IL-12R active STAT4, qui permet aussi

d'augmenter la transcription de l'IFN- $\gamma$ <sup>10,248,517</sup>. De plus, le facteur de transcription Eomes collabore avec T-bet pour induire la production d'IFN- $\gamma$  chez les LTe<sup>372</sup>. Lors d'infection avec *Lm*, STAT4 et Eomes pourraient donc coopérer avec T-bet pour induire la production maximale d'IFN- $\gamma$ . Lors d'immunisation avec les CD, la production d'IL-12, de même que l'induction de T-bet, sont moins importantes<sup>106,254</sup>. La signalisation Notch pourrait donc être nécessaire pour augmenter la transcription de l'IFN- $\gamma$ , afin de permettre sa production maximale (Figure 18). En effet, chez les LT CD4<sup>+</sup>, le NICD et T-bet se lient directement à un amplificateur et au promoteur de l'IFN- $\gamma$  respectivement et agissent en synergie pour augmenter la transcription de l'IFN- $\gamma$ <sup>461</sup>. Seul, le NICD ne peut pas induire la transcription de l'IFN- $\gamma$ , son effet requiert la présence de T-bet<sup>461</sup>. Cette hypothèse est plausible puisque les expressions relatives de T-bet et d'Eomes sont plus élevées chez les LTe lors d'infections avec *Lm* que lors des immunisations avec les CD (Article 3, figure S2). Afin de démontrer que la présence d'une inflammation plus importante lors d'infection *Lm* permet la production similaire d'IFN- $\gamma$  entre les souris N1N2<sup>fl/fl</sup> et N1N2 <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  et élimine la dépendance envers la signalisation Notch pour une production maximale d'IFN- $\gamma$ , il serait pertinent d'infecter les souris avec *Lm* (n'exprimant pas OVA) au moment de l'immunisation avec les CD. Si la production d'IFN- $\gamma$  est restaurée chez les LTe N1N2 <sup>$\Delta/\Delta$</sup> , cela démontrera un effet de l'environnement inflammatoire sur la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ . Il serait aussi possible d'infecter des souris ne produisant pas d'IL-12 avec *Lm*-OVA et d'injecter un Ac bloquant contre le récepteur des IFN de type I. Dans ces expériences, le niveau d'inflammation perçu par les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'OVA<sub>257-264</sub> sera grandement diminué, ce qui devrait rendre la production maximale d'IFN- $\gamma$  dépendante de la signalisation Notch. Il serait aussi intéressant de déterminer si la voie de signalisation Notch régule directement la transcription de l'IFN- $\gamma$  chez les LT CD8<sup>+</sup>. Ceci pourrait être fait avec des essais de lavage d'inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase tel que décrit dans la section précédente pour la molécule CD25.

Un autre facteur qui pourrait influencer la production d'IFN- $\gamma$  par les LT CD8<sup>+</sup> est la qualité de l'aide CD4. En effet, dans un modèle de GVHD aiguë, l'absence d'aide CD4 induit un défaut de production d'IFN- $\gamma$  plus marqué par les LT CD8 exprimant DNAM1L<sup>433</sup>. Il est

possible que l'aide CD4 soit fournie plus efficacement lors des infections avec *Lm* que lors des immunisations avec les CD. En effet, les LT CD4<sup>+</sup> reconnaissant leur Ag spécifique lors d'une infection *Lm* sont aussi activés dans un environnement plus inflammatoire, ce qui pourrait augmenter leur expression de CD40L, augmentant l'activation des CD (molécules de costimulation CD80, CD86, CD70 et sécrétion de cytokines) et ainsi la qualité de l'activation des LT CD8<sup>+</sup><sup>394,395</sup>.

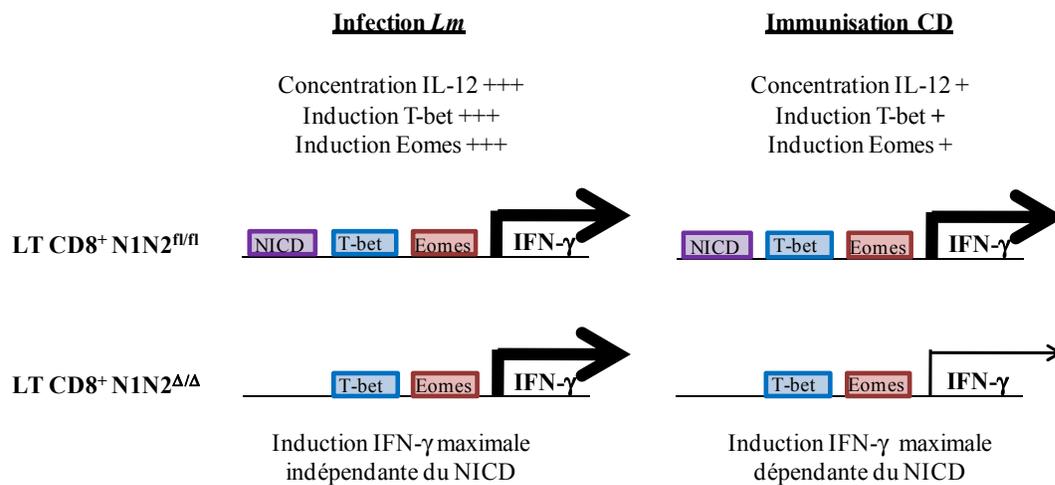


Figure 18. Schéma représentant l'induction de la transcription de l'IFN- $\gamma$  chez les LTe suite à l'infection avec *Lm* ou l'immunisation avec les CD.

Suite à l'immunisation avec des CD, la diminution de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  est en accord avec les données *in vitro* et *in vivo* publiées par d'autres groupes<sup>428,433,455,463</sup>. Cependant, nous n'avons pas observé de différence dans la production d'IL-2, de TNF- $\alpha$  et de granzyme B par les différents LTe générés (Article 3, figure S2 et données non présentées). Différents groupes ont observé un défaut de production de granzyme B et de perforine *in vitro* et *in vivo* chez les LT CD8<sup>+</sup><sup>427,428,455</sup>. De plus, *in vivo*, une diminution de la capacité de cytolyse des LTe CD8<sup>+</sup> en absence du récepteur N2 a été observée suite à une immunisation avec des CD<sup>427</sup>. Nous n'avons pas quantifié la capacité de cytolyse ni la production de perforine des différents LTe. Le fait que les LTe N1N2<sup>Δ/Δ</sup> générés suite à une infection *Lm* ou une immunisation avec les CD puissent présenter un défaut de cytolyse ne peut pas être exclu.

Des essais de lyse *in vivo* de splénocytes chargés avec OVA ou de lymphome exprimant OVA (E.G7-OVA) pourraient être réalisés afin de quantifier leur cytotoxicité.

### 3.2.2.2 La voie de signalisation de Notch et la génération de LTm

Suite à une infection avec *Lm* ou à une immunisation avec les CD, les souris N1N2<sup>ΔΔ</sup> ont généré des LTm aussi efficacement que les souris N1N2<sup>fl/fl</sup>. Ceci démontre que la signalisation Notch n'est pas requise pour la génération de LTm. Suite à l'infection avec *Lm*, les souris N1N2<sup>ΔΔ</sup> ont généré plus de LTe et plus de MPEC, une génération supérieure de LTm était donc attendue comparativement aux souris N1N2<sup>fl/fl</sup> (Article 3, figure 1). Cependant, au stade mémoire, un pourcentage et un nombre similaires de LTm sont présents chez les souris N1N2<sup>ΔΔ</sup> et N1N2<sup>fl/fl</sup> (Article 3, figure 4a). Suite à l'immunisation avec des CD, autant de LTe et de MPEC ont été générés chez les souris N1N2<sup>ΔΔ</sup> et N1N2<sup>fl/fl</sup> (Article 3, figure 2). Une fois au stade mémoire, plus de LTm (pourcentage et nombre) sont présents chez les souris N1N2<sup>ΔΔ</sup> (Article 3, figure 4b). Cela suggère que suite à l'immunisation avec des CD, le rendement en LTm est plus élevé en absence des récepteurs Notch, alors qu'il est légèrement plus faible suite à l'infection avec *Lm* (Article 3, figure 4a et b).

Récemment, il a été démontré que deux facteurs de transcription, Bcl-6 et Ikaros, peuvent réprimer sélectivement la transcription de certains gènes cibles de la voie de signalisation Notch<sup>435,512</sup>. Nous pouvons imaginer que les LT CD8<sup>+</sup> qui se différencient en LTm expriment un ou des facteurs de transcription capables de réprimer sélectivement la transcription de certains gènes impliqués dans la différenciation en SLEC activés par la voie de signalisation Notch. Ce mécanisme permettrait à la signalisation Notch de favoriser la différenciation de SLEC sans empêcher la génération de LTm. Puisque l'expression de Bcl-6 est associée à la différenciation des LTm<sup>380,381,383</sup>, ce facteur de transcription est un candidat intéressant pour réprimer des gènes cibles de la signalisation Notch chez LTe CD8<sup>+</sup>. Dans des cellules neuronales, il a été démontré que Bcl-6 peut se lier au promoteur de Hes5, un gène cible de la signalisation Notch. Bcl-6 interagit directement avec le NICD pour réprimer la

transcription de Hes5, en déplaçant MAML et en recrutant Sirt1, une déacétylase<sup>435</sup>. Des expériences d'activation anti-CD3/CD28 de LT CD8<sup>+</sup> *in vitro*, ont démontré que 72 à 96 h post activation en présence d'IL-2, l'ARNm de Bcl-6 est diminué. Cependant, un signal fort via l'IL-2 est requis pour maintenir l'inhibition de l'expression de l'ARNm de Bcl-6 aux 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> jours post activation<sup>246</sup>. Il est donc probable que suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> il y ait augmentation de l'expression des récepteurs Notch, ce qui permettra une augmentation du signal Notch contribuant à augmenter l'expression de gènes associés à la différenciation des SLEC (comme l'IL-2R $\alpha$ ). Les LTe qui recevront un signal fort via l'IL-2 maintiendront une faible expression de Bcl-6 et se différencieront en SLEC destinés à mourir par apoptose, tandis que les LTe qui recevront un signal plus faible via l'IL-2 augmenteront l'expression de Bcl-6 qui réprimera l'expression de certains gènes spécifiques de la voie Notch pour favoriser la différenciation de MPEC et de LTm (figure 19). Selon cette hypothèse, les LTe recevant un signal plus faible via la voie de signalisation Notch pourraient aussi se différencier en LTm si l'expression de Bcl-6 est induite. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi la signalisation Notch est requise pour la différenciation en SLEC, mais pas pour la différenciation en LTm. De plus, un tel mécanisme permettrait à certaines cibles directes de la signalisation Notch de demeurer actives pour influencer le phénotype des LTm sans affecter leur génération.

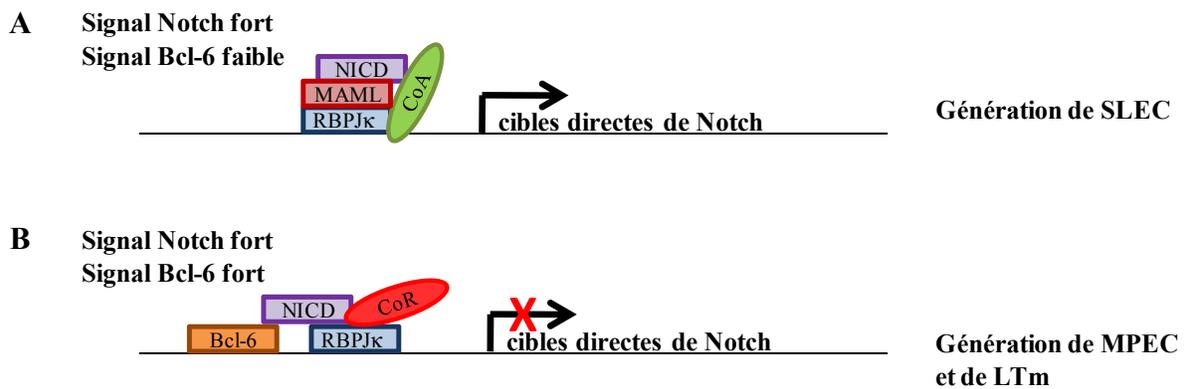


Figure 19. L'inhibition probable de la signalisation Notch par Bcl-6 lors de la réponse immune des LT CD8<sup>+</sup>. (A) En présence d'un signal fort de la voie de signalisation Notch et d'une induction faible de Bcl-6, les gènes cibles directement régulés par Notch sont transcrits pour favoriser la différenciation en SLEC. (B) En présence d'un signal fort de la voie de

signalisation Notch et d'une induction forte de Bcl-6, certains gènes cibles de la voie de signalisation Notch sont inhibé pour favoriser la différenciation de MPEC et de LTm.

Un rôle pour le facteur de transcription Ikaros dans la régulation de la signalisation Notch, afin de moduler la différenciation des LTe et des LTm, ne peut pas être exclu. En effet, il a été démontré que suite à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> en présence d'IL-2 ou d'IL-12, il y a une diminution de l'expression d'Ikaros. Une diminution d'Ikaros est associée à une augmentation de l'expression de l'IL-2R $\alpha$ , de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de l'activité cytolytique<sup>518,519</sup>. Une diminution de l'expression d'Ikaros produit un phénotype opposé à la diminution de l'expression des récepteurs Notch. Ces observations sont donc en accord avec le potentiel d'Ikaros de réprimer certains gènes activés par le NICD<sup>512</sup>. L'expression d'Ikaros est plus forte chez les LTn et les MPEC que chez les SLEC<sup>519</sup>. De façon similaire à Bcl-6, il est possible que l'expression d'Ikaros soit diminuée suite à l'activation de LT CD8<sup>+</sup> et que son expression soit augmentée chez les MPEC, qui perçoivent un signal moins fort via l'IL-2 et l'IL-12, pour contribuer à l'inhibition de la transcription de certains gènes directement activés par Notch afin de favoriser la différenciation en LTm.

### 3.2.3 Perspectives

Malgré l'obtention de résultats fort intéressants quant au rôle de la voie de signalisation Notch lors de la réponse immune des LT CD8<sup>+</sup>, de nombreuses questions demeurent sans réponse et méritent d'être étudiées. En voici quelques exemples. Premièrement, nous avons démontré que la voie de signalisation Notch régule directement la transcription de PD-1 et nous proposons qu'elle puisse être impliquée dans la régulation de gènes permettant la différenciation en SLEC. Comme la voie de signalisation Notch régule l'expression de différents gènes en fonction du type cellulaire et du contexte d'activation, il serait pertinent de déterminer l'identité de l'ensemble des gènes régulés par la voie de signalisation Notch chez les LT CD8<sup>+</sup> suite à leur activation par la reconnaissance de leur Ag spécifique. Pour ce faire, il serait pertinent de réaliser des immunoprécipitations de la chromatine avec un Ac anti-NICD de N1 ou de N2, suivies du séquençage des fragments d'ADN obtenus (ChIP-seq). La liaison

du NICD de N1 ou de N2 aux promoteurs des gènes identifiés devrait être confirmée par des ChIP classiques et l'expression différentielle des gènes candidats identifiés confirmée par qRT-PCR. Cette approche pourrait permettre de découvrir de nouveaux gènes régulés directement par Notch chez les LT CD8<sup>+</sup>. De nouvelles molécules importantes pour la réponse effectrice et mémoire des LT CD8<sup>+</sup> et régulées par la voie de signalisation Notch pourraient ainsi être identifiées. De plus, des gènes régulés de façon non redondante par N1 et N2 pourraient être découverts.

La voie de signalisation Notch étant conservée, les récepteurs ont certaines fonctions redondantes. Cependant, un seul récepteur ou un seul ligand peut être responsable d'un phénotype particulier. Par exemple, dans un modèle de GVHD aiguë, il a été montré que Notch1 et Dll4 sont responsables de la majorité des phénotypes observés<sup>456</sup>. Dans nos modèles d'infection et d'immunisation, il serait intéressant d'étudier les souris où il y a délétion d'un seul gène, soit N1 ou N2. Des fonctions associées seulement à un récepteur pourraient ainsi être révélées. Une expérience préliminaire, où nous avons immunisé des souris où seul N1 est absent chez les LT CD8<sup>+</sup> ne permet pas de récapituler tout les phénotypes observés suite à la délétion de N1 et N2, suggérant un certain rôle non redondant des récepteurs. Il faut cependant considérer que l'absence d'un seul récepteur peut mener à une augmentation de l'expression des autres récepteurs<sup>431</sup> pouvant influencer le phénotype observé.

Nous avons étudié la génération de LTm, mais il faudra aussi comparer adéquatement leurs propriétés caractéristiques, comme la capacité de proliférer lors d'une seconde infection ou leur capacité d'autorenouvellement. Suite à l'immunisation avec les CD, les LTe et les LTm des souris N1N2<sup>Δ/Δ</sup> expriment moins d'Eomes que les souris N1N2<sup>fl/fl</sup> (Article 3, figureS2a, b). Cette diminution d'Eomes pourrait diminuer la capacité d'autorenouvellement des LTm des souris N1N2<sup>Δ/Δ</sup>. En effet, Eomes régule la sensibilité à l'IL-15, impliquée dans la prolifération homéostatique des LTm<sup>368</sup>. De plus, nous avons effectué un marquage contre Bcl-2, une molécule anti-apoptotique ce qui nous a permis d'observer que les LTm N1N2<sup>Δ/Δ</sup> expriment moins de Bcl-2 (Annexe 8) que les LTm N1N2<sup>fl/fl</sup> ce qui suggère que leur survie

pourrait aussi être affectée. D'autres études sont requises afin de démontrer si l'absence de signalisation Notch affecte la survie et l'autorenouvellement des LTm. Par exemple, il serait intéressant de comparer la persistance des LTm à très long terme (6 mois et plus) chez nos différentes souris. De plus, pour quantifier l'autorenouvellement des LTm, il est possible de donner du BrdU (un analogue de la thymidine) aux souris durant deux semaines pour ensuite mesurer son incorporation dans l'ADN des cellules ayant proliféré. Si les LTm N1N2<sup>Δ/Δ</sup> prolifèrent moins que les N1N2<sup>fl/fl</sup>, elles incorporeront moins de BrdU ce qui démontrerait un défaut de prolifération homéostatique.

Finalement, une meilleure compréhension de la voie de signalisation Notch chez les LT CD8<sup>+</sup> a des implications plus générales. Le développement de certains cancers, comme les leucémies T lymphoblastiques (T-ALL), les leucémies myéloïdes ou le cancer du sein, implique un dérèglement de la voie de signalisation Notch<sup>520</sup>. L'identification des gènes régulés par la voie de signalisation Notch chez les LT pourrait permettre de mieux comprendre les T-ALL, en supposant que l'induction de certains gènes cibles sera conservée. De plus, l'inhibition de la voie de signalisation Notch présente un intérêt thérapeutique. Les GSI ont d'abord été administrés chez l'humain afin de réduire les peptides β-amyloïdes chez les patients atteints d'Alzheimer. Des études cliniques de phase I et II administrant des GSI pour le traitement de différentes tumeurs, dont les T-ALL, sont en cours<sup>521</sup>. Cependant, l'administration de GSI engendre de nombreux effets secondaires causés par l'inhibition de la voie de signalisation Notch, comme une toxicité gastro-intestinale. Il est donc aussi primordial de bien comprendre les différents mécanismes d'action de la signalisation Notch pour mieux anticiper les effets secondaires que pourront causer les inhibiteurs de la voie. Maintenant, d'autres techniques d'inhibition de la voie de signalisation Notch ont été développées et sont à l'étude. Par exemple, des Ac antagonistes ciblant les ligands Dll1 et Dll4 ont été développés et permettent de protéger contre le développement de la GVHD chez la souris<sup>456</sup>. Ces nouveaux traitements auront probablement moins d'effets secondaires que l'utilisation de GSI. Pour terminer, nos données démontrant que la voie de signalisation Notch régule directement la transcription de PD-1, une molécule impliquée dans l'épuisement des LT CD8<sup>+</sup> suggèrent

aussi que l'administration d'inhibiteurs de la voie de signalisation Notch pourrait contribuer à restaurer la fonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> lors des infections chroniques.

### 3.2.4 Conclusions

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés aux signaux importants pour le développement des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs et mémoires suite à une infection ou une immunisation. Les résultats obtenus ont définitivement contribué à l'avancement des connaissances dans le domaine de la réponse immunitaire des LT CD8<sup>+</sup>. Premièrement, nous sommes les premiers à avoir caractérisé la réponse des LT CD8<sup>+</sup> induite par l'immunisation avec les CD40-B *in vivo*. Nous avons démontré que l'immunisation avec les CD40-B générés *in vitro* permet de générer les LTe CD8<sup>+</sup> fonctionnels, mais pas des LTm CD8<sup>+</sup>. Les CD40-B ont donc le potentiel d'induire des effecteurs fonctionnels, ce qui pourrait s'avérer intéressant puisque ces CD40-B représentent une nouvelle source de cellules présentatrices d'antigènes afin de développer de nouveaux vaccins thérapeutiques. Puisque les CD40-B peuvent être produits en grande quantité à partir d'un prélèvement sanguin, ils pourraient être utilisés seul ou en combinaison avec les CD, afin d'améliorer les traitements aujourd'hui disponibles. Nous ne sommes pas parvenus à identifier le signal manquant afin de restaurer la génération de LTm CD8<sup>+</sup> suite à l'immunisation avec les CD40-B. D'autres études seront nécessaires afin d'identifier ce signal et d'augmenter le potentiel thérapeutique de l'immunisation avec des CD40-B. Il est primordial de parvenir à générer des LTm CD8<sup>+</sup> afin d'assurer une meilleure protection de l'organisme à long terme. Ces résultats révèlent aussi qu'il ne suffit pas de présenter l'Ag en présence d'un signal de costimulation afin de générer une réponse complète des LT CD8<sup>+</sup>.

Deuxièmement, nous avons démontré pour la première fois que la voie de signalisation Notch régule directement la transcription de *Pdcd1* codant pour PD-1, une protéine impliquée dans l'épuisement des LT CD8<sup>+</sup>. Cette étude identifie une nouvelle voie de signalisation pouvant réguler la transcription de PD-1. L'état d'épuisement des LT CD8<sup>+</sup>, dans lequel PD-1 est impliqué, contribue à l'incapacité du système immunitaire à éliminer certaines cellules

tumorales ou certaines infections chroniques comme le HIV ou l'hépatite chez l'humain. Pour cette raison, il est primordial de mieux comprendre les mécanismes permettant de réguler l'expression de PD-1. D'autres études devront confirmer ces résultats *in vivo*. L'administration d'inhibiteurs de la signalisation Notch pourrait diminuer l'expression de PD-1 chez les LT CD8<sup>+</sup> épuisés, afin de restaurer leur fonctionnalité pour permettre l'élimination des cellules tumorales ou infectées lors de maladies chroniques.

Troisièmement, nous avons caractérisé les phénotypes associés à la délétion des gènes N1 et N2 chez les LT CD8<sup>+</sup> suite à une infection *Lm* ou une immunisation CD. La voie de signalisation Notch est requise pour la différenciation en SLEC, mais pas la génération de LTm CD8<sup>+</sup>. La production d'IFN- $\gamma$  semble être indépendante ou dépendante de la signalisation Notch en fonction de la présence d'inflammation. Plusieurs phénotypes sont observés, mais les mécanismes permettant de les expliquer devront être élucidés. L'étude détaillée du rôle de la voie de signalisation Notch chez les LT CD8<sup>+</sup> pourrait permettre de mieux comprendre le développement des leucémies T lymphoblastiques. Comme des inhibiteurs de la voie Notch sont aussi développés afin de traiter certaines maladies dont le cancer, une compréhension du rôle de la voie de signalisation Notch dans le système immunitaire permettra une meilleure prédiction des effets secondaires



## Bibliographie

1. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983 (1996).
2. Galluzzi, L., Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* **1**, 699-716 (2012).
3. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135-145 (2001).
4. Yuseff, M.I., Pierobon, P., Reversat, A. & Lennon-Dumenil, A.M. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol* **13**, 475-486 (2013).
5. Mitchison, N.A. T-cell-B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol* **4**, 308-312 (2004).
6. Elgueta, R., de Vries, V.C. & Noelle, R.J. The immortality of humoral immunity. *Immunol Rev* **236**, 139-150 (2010).
7. Tobon, G.J., Izquierdo, J.H. & Canas, C.A. B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity-Focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Dis* **2013**, 827254 (2013).
8. Jiang, S. & Dong, C. A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev* **252**, 5-11 (2013).
9. Vahedi, G., A, C.P., Hand, T.W., Laurence, A., Kanno, Y., O'Shea, J.J. & Hirahara, K. Helper T-cell identity and evolution of differential transcriptomes and epigenomes. *Immunol Rev* **252**, 24-40 (2013).
10. 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).
11. Elo, L.L., Jarvenpaa, H., Tuomela, S., Raghav, S., Ahlfors, H., Laurila, K., Gupta, B., Lund, R.J., Tahvanainen, J., Hawkins, R.D., Oresic, M., Lahdesmaki, H., Rasool, O., Rao, K.V., Aittokallio, T. & Lahesmaa, R. Genome-wide profiling of interleukin-4 and STAT6 transcription factor regulation of human Th2 cell programming. *Immunity* **32**, 852-862 (2010).
12. Schmitt, E., Klein, M. & Bopp, T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol* (2013).
13. Stassen, M., Schmitt, E. & Bopp, T. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann N Y Acad Sci* **1247**, 56-68 (2012).
14. Zuniga, L.A., Jain, R., Haines, C. & Cua, D.J. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev* **252**, 78-88 (2013).
15. Stockinger, B., Veldhoen, M. & Martin, B. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* **19**, 353-361 (2007).
16. Durant, L., Watford, W.T., Ramos, H.L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., Takahashi, H., Sun, H.W., Kanno, Y., Powrie, F. & O'Shea, J.J. Diverse targets of the

- transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* **32**, 605-615 (2010).
17. Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* **10**, 857-863 (2009).
  18. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* **29**, 621-663 (2011).
  19. Zheng, Y., Josefowicz, S.Z., Kas, A., Chu, T.T., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* **445**, 936-940 (2007).
  20. Wei, L., Laurence, A. & O'Shea, J.J. New insights into the roles of Stat5a/b and Stat3 in T cell development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* **19**, 394-400 (2008).
  21. Zheng, Y. & Rudensky, A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* **8**, 457-462 (2007).
  22. Shrikant, P.A., Rao, R., Li, Q., Kesterson, J., Eppolito, C., Mischo, A. & Singhal, P. Regulating functional cell fates in CD8 T cells. *Immunol Res* **46**, 12-22 (2010).
  23. Schwaiger, S., Wolf, A.M., Robatscher, P., Jenewein, B. & Grubeck-Loebenstern, B. IL-4-producing CD8<sup>+</sup> T cells with a CD62L<sup>++</sup>(bright) phenotype accumulate in a subgroup of older adults and are associated with the maintenance of intact humoral immunity in old age. *J Immunol* **170**, 613-619 (2003).
  24. Hinrichs, C.S., Kaiser, A., Paulos, C.M., Cassard, L., Sanchez-Perez, L., Heemskerk, B., Wrzesinski, C., Borman, Z.A., Muranski, P. & Restifo, N.P. Type 17 CD8<sup>+</sup> T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood* **114**, 596-599 (2009).
  25. Liu, S.J., Tsai, J.P., Shen, C.R., Sher, Y.P., Hsieh, C.L., Yeh, Y.C., Chou, A.H., Chang, S.R., Hsiao, K.N., Yu, F.W. & Chen, H.W. Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J Leukoc Biol* **82**, 354-360 (2007).
  26. Hamada, H., Garcia-Hernandez Mde, L., Reome, J.B., Misra, S.K., Strutt, T.M., McKinstry, K.K., Cooper, A.M., Swain, S.L. & Dutton, R.W. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol* **182**, 3469-3481 (2009).
  27. Yeh, N., Glosston, N.L., Wang, N., Guindon, L., McKinley, C., Hamada, H., Li, Q., Dutton, R.W., Shrikant, P., Zhou, B., Brutkiewicz, R.R., Blum, J.S. & Kaplan, M.H. Tc17 cells are capable of mediating immunity to vaccinia virus by acquisition of a cytotoxic phenotype. *J Immunol* **185**, 2089-2098 (2010).
  28. Robb, R.J., Lineburg, K.E., Kuns, R.D., Wilson, Y.A., Raffelt, N.C., Olver, S.D., Varelias, A., Alexander, K.A., Teal, B.E., Sparwasser, T., Hammerling, G.J., Markey, K.A., Koyama, M., Clouston, A.D., Engwerda, C.R., Hill, G.R. & MacDonald, K.P. Identification and expansion of highly suppressive CD8<sup>(+)</sup>FoxP3<sup>(+)</sup> regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **119**, 5898-5908 (2012).
  29. Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J.A. & Herold, K.C. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8<sup>+</sup> T cell population and induces CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. *J Clin Invest* **115**, 2904-2913 (2005).

30. Xystrakis, E., Dejean, A.S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D. & Saoudi, A. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* **104**, 3294-3301 (2004).
31. Zhang, L., Bertucci, A.M., Ramsey-Goldman, R., Burt, R.K. & Datta, S.K. Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF-beta-producing CD8+ Treg cells are associated with immunological remission of lupus. *J Immunol* **183**, 6346-6358 (2009).
32. Kiniwa, Y., Miyahara, Y., Wang, H.Y., Peng, W., Peng, G., Wheeler, T.M., Thompson, T.C., Old, L.J. & Wang, R.F. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 6947-6958 (2007).
33. Sawamukai, N., Satake, A., Schmidt, A.M., Lamborn, I.T., Ojha, P., Tanaka, Y. & Kambayashi, T. Cell-autonomous role of TGFbeta and IL-2 receptors in CD4+ and CD8+ inducible regulatory T-cell generation during GVHD. *Blood* **119**, 5575-5583 (2012).
34. Beres, A.J. & Drobyski, W.R. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front Immunol* **4**, 163 (2013).
35. Ahmadi, T., Flies, A., Efebera, Y. & Sherr, D.H. CD40 Ligand-activated, antigen-specific B cells are comparable to mature dendritic cells in presenting protein antigens and major histocompatibility complex class I- and class II-binding peptides. *Immunology* **124**, 129-140 (2008).
36. Pozzi, L.A., Maciaszek, J.W. & Rock, K.L. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J Immunol* **175**, 2071-2081 (2005).
37. Steinman, R.M., Gutchinov, B., Witmer, M.D. & Nussenzweig, M.C. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med* **157**, 613-627 (1983).
38. Steinman, R.M. & Witmer, M.D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5132-5136 (1978).
39. Pape, K.A., Catron, D.M., Itano, A.A. & Jenkins, M.K. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* **26**, 491-502 (2007).
40. Schultze, J.L., Michalak, S., Seamon, M.J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., Delgado, J.C., Gribben, J.G. & Nadler, L.M. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* **100**, 2757-2765 (1997).
41. Matsushima, H., Geng, S., Lu, R., Okamoto, T., Yao, Y., Mayuzumi, N., Kotol, P.F., Chojnacki, B.J., Miyazaki, T., Gallo, R.L. & Takashima, A. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood* **121**, 1677-1689 (2013).
42. Beauvillain, C., Delneste, Y., Scotet, M., Peres, A., Gascan, H., Guermonprez, P., Barnaba, V. & Jeannin, P. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* **110**, 2965-2973 (2007).
43. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820 (2010).

44. Van Kaer, L. Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides. *Immunol Res* **23**, 205-214 (2001).
45. Huber, E.M., Basler, M., Schwab, R., Heinemeyer, W., Kirk, C.J., Groettrup, M. & Groll, M. Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* **148**, 727-738 (2012).
46. Basler, M., Kirk, C.J. & Groettrup, M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr Opin Immunol* **25**, 74-80 (2013).
47. Mantegazza, A.R., Magalhaes, J.G., Amigorena, S. & Marks, M.S. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* **14**, 135-152 (2013).
48. Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **12**, 557-569 (2012).
49. Heath, W.R. & Carbone, F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* **1**, 126-134 (2001).
50. Conlan, J.W. Early host-pathogen interactions in the liver and spleen during systemic murine listeriosis: an overview. *Immunobiology* **201**, 178-187 (1999).
51. Conlan, J.W. & North, R.J. Neutrophils are essential for early anti-Listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med* **179**, 259-268 (1994).
52. Shaughnessy, L.M. & Swanson, J.A. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front Biosci* **12**, 2683-2692 (2007).
53. Zammit, D.J., Cauley, L.S., Pham, Q.M. & Lefrancois, L. Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. *Immunity* **22**, 561-570 (2005).
54. Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, E.G., Littman, D.R. & Lang, R.A. In vivo depletion of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells abrogates priming of CD8<sup>+</sup> T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**, 211-220 (2002).
55. Stavru, F., Archambaud, C. & Cossart, P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunol Rev* **240**, 160-184 (2011).
56. Pamer, E.G. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* **4**, 812-823 (2004).
57. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
58. Palucka, K. & Banchereau, J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* **39**, 38-48 (2013).
59. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**, 1142-1162 (1973).
60. Trombetta, E.S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* **23**, 975-1028 (2005).
61. 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).
62. Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T. & Munz, C. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* **307**, 593-596 (2005).

63. Probst, H.C. & van den Broek, M. Priming of CTLs by lymphocytic choriomeningitis virus depends on dendritic cells. *J Immunol* **174**, 3920-3924 (2005).
64. Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R. & Yona, S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* **14**, 571-578 (2014).
65. Haniffa, M., Collin, M. & Ginhoux, F. Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv Immunol* **120**, 1-49 (2013).
66. Villadangos, J.A. & Shortman, K. Found in translation: the human equivalent of mouse CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med* **207**, 1131-1134 (2010).
67. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* **31**, 563-604 (2013).
68. Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. & Steinman, R.M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**, 1693-1702 (1992).
69. Xu, Y., Zhan, Y., Lew, A.M., Naik, S.H. & Kershaw, M.H. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* **179**, 7577-7584 (2007).
70. Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X.L., Trinchieri, G., O'Garra, A. & Liu, Y.J. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **195**, 953-958 (2002).
71. Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A. & Pamer, E.G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**, 59-70 (2003).
72. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-1118 (1994).
73. Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J.L. & Maliszewski, C.R. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* **96**, 3029-3039 (2000).
74. Naik, S.H., Proietto, A.I., Wilson, N.S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M.H., O'Keeffe, M., Shao, Q.X., Chen, W.F., Villadangos, J.A., Shortman, K. & Wu, L. Cutting edge: generation of splenic CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>-</sup> dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* **174**, 6592-6597 (2005).
75. Mildner, A. & Jung, S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* **40**, 642-656 (2014).
76. Shi, C. & Pamer, E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 762-774 (2011).
77. Leon, B. & Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* **86**, 320-324 (2008).

78. Cheong, C., Matos, I., Choi, J.H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., Koh, H., Rodriguez, A., Idoyaga, J., Pack, M., Velinzon, K., Park, C.G. & Steinman, R.M. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* **143**, 416-429 (2010).
79. Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. & Schadendorf, D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **4**, 328-332 (1998).
80. Banchereau, J., Palucka, A.K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K.M., Bhardwaj, N., Pineiro, L., Steinman, R. & Fay, J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* **61**, 6451-6458 (2001).
81. Rosenberg, S.A., Yang, J.C. & Restifo, N.P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* **10**, 909-915 (2004).
82. Coffman, R.L., Sher, A. & Seder, R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**, 492-503 (2010).
83. Butterfield, L.H. Dendritic cells in cancer immunotherapy clinical trials: are we making progress? *Front Immunol* **4**, 454 (2013).
84. Klechevsky, E., Flamar, A.L., Cao, Y., Blanck, J.P., Liu, M., O'Bar, A., Agouna-Deciat, O., Klucar, P., Thompson-Snipes, L., Zurawski, S., Reiter, Y., Palucka, A.K., Zurawski, G. & Banchereau, J. Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* **116**, 1685-1697 (2010).
85. Sancho, D., Mourao-Sa, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R. & Reis e Sousa, C. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* **118**, 2098-2110 (2008).
86. Dakappagari, N., Maruyama, T., Renshaw, M., Tacke, P., Figdor, C., Torensma, R., Wild, M.A., Wu, D., Bowdish, K. & Kretz-Rommel, A. Internalizing antibodies to the C-type lectins, L-SIGN and DC-SIGN, inhibit viral glycoprotein binding and deliver antigen to human dendritic cells for the induction of T cell responses. *J Immunol* **176**, 426-440 (2006).
87. Flacher, V., Sparber, F., Tripp, C.H., Romani, N. & Stoitzner, P. Targeting of epidermal Langerhans cells with antigenic proteins: attempts to harness their properties for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 1137-1147 (2009).
88. Steinman, R.M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* **30**, 1-22 (2012).
89. Tel, J., Schreiber, G., Sittig, S.P., Mathan, T.S., Buschow, S.I., Cruz, L.J., Lambeck, A.J., Figdor, C.G. & de Vries, I.J. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* **121**, 459-467 (2013).
90. Tel, J., Aarntzen, E.H., Baba, T., Schreiber, G., Schulte, B.M., Benitez-Ribas, D., Boerman, O.C., Croockewit, S., Oyen, W.J., van Rossum, M., Winkels, G., Coulie, P.G., Punt, C.J., Figdor, C.G. & de Vries, I.J. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res* **73**, 1063-1075 (2013).

91. Zhong, G., Reis e Sousa, C. & Germain, R.N. Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure in vivo or in vitro. *J Exp Med* **186**, 673-682 (1997).
92. Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J. & Hwu, P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* **63**, 2836-2843 (2003).
93. Barr, T.A., Brown, S., Ryan, G., Zhao, J. & Gray, D. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur J Immunol* **37**, 3040-3053 (2007).
94. Boeglin, E., Smulski, C.R., Brun, S., Milosevic, S., Schneider, P. & Fournel, S. Toll-like receptor agonists synergize with CD40L to induce either proliferation or plasma cell differentiation of mouse B cells. *PLoS One* **6**, e25542 (2011).
95. Guo, S., Xu, J., Denning, W. & Hel, Z. Induction of protective cytotoxic T-cell responses by a B-cell-based cellular vaccine requires stable expression of antigen. *Gene Ther* **16**, 1300-1313 (2009).
96. Shen, H., Whitmire, J.K., Fan, X., Shedlock, D.J., Kaech, S.M. & Ahmed, R. A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* **170**, 1443-1451 (2003).
97. Whitmire, J.K., Asano, M.S., Kaech, S.M., Sarkar, S., Hannum, L.G., Shlomchik, M.J. & Ahmed, R. Requirement of B cells for generating CD4+ T cell memory. *J Immunol* **182**, 1868-1876 (2009).
98. Homann, D., Tishon, A., Berger, D.P., Weigle, W.O., von Herrath, M.G. & Oldstone, M.B. Evidence for an underlying CD4 helper and CD8 T-cell defect in B-cell-deficient mice: failure to clear persistent virus infection after adoptive immunotherapy with virus-specific memory cells from muMT/muMT mice. *J Virol* **72**, 9208-9216 (1998).
99. Christensen, J.P., Kauffmann, S.O. & Thomsen, A.R. Deficient CD4+ T cell priming and regression of CD8+ T cell functionality in virus-infected mice lacking a normal B cell compartment. *J Immunol* **171**, 4733-4741 (2003).
100. Bergmann, C.C., Ramakrishna, C., Kornacki, M. & Stohlman, S.A. Impaired T cell immunity in B cell-deficient mice following viral central nervous system infection. *J Immunol* **167**, 1575-1583 (2001).
101. Badovinac, V.P., Messingham, K.A., Griffith, T.S. & Harty, J.T. TRAIL deficiency delays, but does not prevent, erosion in the quality of "helpless" memory CD8 T cells. *J Immunol* **177**, 999-1006 (2006).
102. Lund, F.E. & Randall, T.D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol* **10**, 236-247 (2010).
103. DiLillo, D.J., Yanaba, K. & Tedder, T.F. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol* **184**, 4006-4016 (2010).
104. Leon, B., Ballesteros-Tato, A., Randall, T.D. & Lund, F.E. Prolonged antigen presentation by immune complex-binding dendritic cells programs the proliferative capacity of memory CD8 T cells. *J Exp Med* (2014).

105. Crawford, A., Macleod, M., Schumacher, T., Corlett, L. & Gray, D. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. *J Immunol* **176**, 3498-3506 (2006).
106. Pham, N.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).
107. Archambault, A.S., Carrero, J.A., Barnett, L.G., McGee, N.G., Sim, J., Wright, J.O., Raabe, T., Chen, P., Ding, H., Allenspach, E.J., Dragatsis, I., Laufer, T.M. & Wu, G.F. Cutting edge: Conditional MHC class II expression reveals a limited role for B cell antigen presentation in primary and secondary CD4 T cell responses. *J Immunol* **191**, 545-550 (2013).
108. Kondo, E., Gryschock, L., Klein-Gonzalez, N., Rademacher, S., Weihrauch, M.R., Liebig, T., Shimabukuro-Vornhagen, A., Kochanek, M., Draube, A. & von Bergwelt-Baildon, M.S. CD40-activated B cells can be generated in high number and purity in cancer patients: analysis of immunogenicity and homing potential. *Clin Exp Immunol* **155**, 249-256 (2009).
109. Liebig, T.M., Fiedler, A., Zoghi, S., Shimabukuro-Vornhagen, A. & von Bergwelt-Baildon, M.S. Generation of human CD40-activated B cells. *J Vis Exp* (2009).
110. von Bergwelt-Baildon, M., Shimabukuro-Vornhagen, A., Popov, A., Klein-Gonzalez, N., Fiore, F., Debey, S., Draube, A., Maecker, B., Menezes, I., Nadler, L.M. & Schultze, J.L. CD40-activated B cells express full lymph node homing triad and induce T-cell chemotaxis: potential as cellular adjuvants. *Blood* **107**, 2786-2789 (2006).
111. Shimabukuro-Vornhagen, A., Draube, A., Liebig, T.M., Rothe, A., Kochanek, M. & von Bergwelt-Baildon, M.S. The immunosuppressive factors IL-10, TGF-beta, and VEGF do not affect the antigen-presenting function of CD40-activated B cells. *J Exp Clin Cancer Res* **31**, 47 (2012).
112. Shimabukuro-Vornhagen, A., Draube, A., Liebig, T., Popov, A., Rothe, A. & von Bergwelt-Baildon, M. The properties of human CD40-activated B cells as antigen-presenting cells are not affected by PGE2. *Oncol Rep* **29**, 1061-1065 (2013).
113. Ritchie, D.S., Yang, J., Hermans, I.F. & Ronchese, F. B-Lymphocytes activated by CD40 ligand induce an antigen-specific anti-tumour immune response by direct and indirect activation of CD8(+) T-cells. *Scand J Immunol* **60**, 543-551 (2004).
114. Clatza, A., Bonifaz, L.C., Vignali, D.A. & Moreno, J. CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation. *J Immunol* **171**, 6478-6487 (2003).
115. Hanafi, L.A., Bolduc, M., Gagne, M.E., Dufour, F., Langelier, Y., Boulassel, M.R., Routy, J.P., Leclerc, D. & Lapointe, R. Two distinct chimeric potexviruses share antigenic cross-presentation properties of MHC class I epitopes. *Vaccine* **28**, 5617-5626 (2010).
116. Leclerc, D., Beauseigle, D., Denis, J., Morin, H., Pare, C., Lamarre, A. & Lapointe, R. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *J Virol* **81**, 1319-1326 (2007).

117. Fuchs, E.J. & Matzinger, P. B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* **258**, 1156-1159 (1992).
118. Parekh, V.V., Prasad, D.V., Banerjee, P.P., Joshi, B.N., Kumar, A. & Mishra, G.C. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol* **170**, 5897-5911 (2003).
119. Raimondi, G., Zanoni, I., Citterio, S., Ricciardi-Castagnoli, P. & Granucci, F. Induction of peripheral T cell tolerance by antigen-presenting B cells. II. Chronic antigen presentation overrides antigen-presenting B cell activation. *J Immunol* **176**, 4021-4028 (2006).
120. Raimondi, G., Zanoni, I., Citterio, S., Ricciardi-Castagnoli, P. & Granucci, F. Induction of peripheral T cell tolerance by antigen-presenting B cells. I. Relevance of antigen presentation persistence. *J Immunol* **176**, 4012-4020 (2006).
121. Vanden Bush, T.J., Buchta, C.M., Claudio, J. & Bishop, G.A. Cutting Edge: Importance of IL-6 and cooperation between innate and adaptive immune receptors in cellular vaccination with B lymphocytes. *J Immunol* **183**, 4833-4837 (2009).
122. Leignadier, J. & Labrecque, N. Epitope density influences CD8+ memory T cell differentiation. *PLoS One* **5**, e13740 (2010).
123. Lee, J., Dollins, C.M., Boczkowski, D., Sullenger, B.A. & Nair, S. Activated B cells modified by electroporation of multiple mRNAs encoding immune stimulatory molecules are comparable to mature dendritic cells in inducing in vitro antigen-specific T-cell responses. *Immunology* **125**, 229-240 (2008).
124. von Bergwelt-Baildon, M.S., Vonderheide, R.H., Maecker, B., Hirano, N., Anderson, K.S., Butler, M.O., Xia, Z., Zeng, W.Y., Wucherpfennig, K.W., Nadler, L.M. & Schultze, J.L. Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood* **99**, 3319-3325 (2002).
125. Coughlin, C.M., Vance, B.A., Grupp, S.A. & Vonderheide, R.H. RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood* **103**, 2046-2054 (2004).
126. Zheng, J., Liu, Y., Lau, Y.L. & Tu, W. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* **7**, 44-50 (2010).
127. Fecteau, J.F. & Neron, S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol* **171**, 4621-4629 (2003).
128. Fecteau, J.F., Roy, A. & Neron, S. Peripheral blood CD27+ IgG+ B cells rapidly proliferate and differentiate into immunoglobulin-secreting cells after exposure to low CD154 interaction. *Immunology* **128**, e353-365 (2009).
129. Neron, S., Racine, C., Roy, A. & Guerin, M. Differential responses of human B-lymphocyte subpopulations to graded levels of CD40-CD154 interaction. *Immunology* **116**, 454-463 (2005).
130. Kornbluth, R.S., Stempniak, M. & Stone, G.W. Design of CD40 agonists and their use in growing B cells for cancer immunotherapy. *Int Rev Immunol* **31**, 279-288 (2012).
131. Sakata, N., Hamelmann, E., Siadak, A.W., Terada, N., Gerwins, P., Aruffo, A., Johnson, G.L. & Gelfand, E.W. Differential regulation of CD40-mediated human B

- cell responses by antibodies directed against different CD40 epitopes. *Cell Immunol* **201**, 109-123 (2000).
132. Barr, T.A. & Heath, A.W. Functional activity of CD40 antibodies correlates to the position of binding relative to CD154. *Immunology* **102**, 39-43 (2001).
  133. Shen, S.N., Xu, Z., Qian, X.P., Ding, Y.T., Yu, L.X. & Liu, B.R. RNA-electroporated CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against HepG2 cells. *Eur J Cancer Care (Engl)* **17**, 404-411 (2008).
  134. Sorenmo, K.U., Krick, E., Coughlin, C.M., Overley, B., Gregor, T.P., Vonderheide, R.H. & Mason, N.J. CD40-activated B cell cancer vaccine improves second clinical remission and survival in privately owned dogs with non-Hodgkin's lymphoma. *PLoS One* **6**, e24167 (2011).
  135. Kondo, E., Gryschok, L., Schultze, J.L. & von Bergwelt-Baildon, M.S. Using CD40-activated B cells to efficiently identify epitopes of tumor antigens. *J Immunother* **32**, 157-160 (2009).
  136. Kondo, E., Maecker, B., Draube, A., Klein-Gonzalez, N., Shimabukuro-Vornhagen, A., Schultze, J.L. & von Bergwelt-Baildon, M.S. The shared tumor associated antigen cyclin-A2 is recognized by high-avidity T-cells. *Int J Cancer* **125**, 2474-2478 (2009).
  137. Lazarevic, V., Glimcher, L.H. & Lord, G.M. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 777-789 (2013).
  138. Rudolph, M.G., Stanfield, R.L. & Wilson, I.A. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* **24**, 419-466 (2006).
  139. Zehn, D., King, C., Bevan, M.J. & Palmer, E. TCR signaling requirements for activating T cells and for generating memory. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1565-1575 (2012).
  140. Valitutti, S. The Serial Engagement Model 17 Years After: From TCR Triggering to Immunotherapy. *Front Immunol* **3**, 272 (2012).
  141. Morris, G.P. & Allen, P.M. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat Immunol* **13**, 121-128 (2012).
  142. Huppa, J.B., Axmann, M., Mortelmaier, M.A., Lillemeier, B.F., Newell, E.W., Brameshuber, M., Klein, L.O., Schutz, G.J. & Davis, M.M. TCR-peptide-MHC interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity. *Nature* **463**, 963-967 (2010).
  143. Huang, J., Zarnitsyna, V.I., Liu, B., Edwards, L.J., Jiang, N., Evavold, B.D. & Zhu, C. The kinetics of two-dimensional TCR and pMHC interactions determine T-cell responsiveness. *Nature* **464**, 932-936 (2010).
  144. Casrouge, A., Beaudoin, E., Dalle, S., Pannetier, C., Kanellopoulos, J. & Kourilsky, P. Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol* **164**, 5782-5787 (2000).
  145. Robins, H.S., Campregher, P.V., Srivastava, S.K., Wachter, A., Turtle, C.J., Kahsai, O., Riddell, S.R., Warren, E.H. & Carlson, C.S. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood* **114**, 4099-4107 (2009).
  146. Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. & Jordan, M.S. T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**, 591-619 (2009).
  147. Dustin, M.L. & Depoil, D. New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat Rev Immunol* **11**, 672-684 (2011).

148. Huppa, J.B. & Davis, M.M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983 (2003).
149. Yokosuka, T. & Saito, T. Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol Rev* **229**, 27-40 (2009).
150. Saito, T., Yokosuka, T. & Hashimoto-Tane, A. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS Lett* **584**, 4865-4871 (2010).
151. Zehn, D., Lee, S.Y. & Bevan, M.J. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* **458**, 211-214 (2009).
152. Teixeira, E., Daniels, M.A., Hamilton, S.E., Schrum, A.G., Bragado, R., Jameson, S.C. & Palmer, E. Different T cell receptor signals determine CD8+ memory versus effector development. *Science* **323**, 502-505 (2009).
153. 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).
154. Zhu, Y., Yao, S. & Chen, L. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity* **34**, 466-478 (2011).
155. Chen, L. & Flies, D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* **13**, 227-242 (2013).
156. Yokosuka, T. & Saito, T. The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. *Curr Top Microbiol Immunol* **340**, 81-107 (2010).
157. Boomer, J.S. & Green, J.M. An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002436 (2010).
158. Schwartz, R.H. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**, 305-334 (2003).
159. Zha, Y., Marks, R., Ho, A.W., Peterson, A.C., Janardhan, S., Brown, I., Praveen, K., Stang, S., Stone, J.C. & Gajewski, T.F. T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase- $\alpha$ . *Nat Immunol* **7**, 1166-1173 (2006).
160. Clavijo, P.E. & Frauwirth, K.A. Anergic CD8+ T lymphocytes have impaired NF- $\kappa$ B activation with defects in p65 phosphorylation and acetylation. *J Immunol* **188**, 1213-1221 (2012).
161. Srinivasan, M. & Frauwirth, K.A. Reciprocal NFAT1 and NFAT2 nuclear localization in CD8+ anergic T cells is regulated by suboptimal calcium signaling. *J Immunol* **179**, 3734-3741 (2007).
162. Dubois, P.M., Pihlgren, M., Tomkowiak, M., Van Mechelen, M. & Marvel, J. Tolerant CD8 T cells induced by multiple injections of peptide antigen show impaired TCR signaling and altered proliferative responses in vitro and in vivo. *J Immunol* **161**, 5260-5267 (1998).
163. McAdam, A.J., Farkash, E.A., Gewurz, B.E. & Sharpe, A.H. B7 costimulation is critical for antibody class switching and CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte generation in the host response to vesicular stomatitis virus. *J Virol* **74**, 203-208 (2000).
164. Kundig, T.M., Shahinian, A., Kawai, K., Mittrucker, H.W., Sebzda, E., Bachmann, M.F., Mak, T.W. & Ohashi, P.S. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* **5**, 41-52 (1996).
165. Lumsden, J.M., Roberts, J.M., Harris, N.L., Peach, R.J. & Ronchese, F. Differential requirement for CD80 and CD80/CD86-dependent costimulation in the lung immune response to an influenza virus infection. *J Immunol* **164**, 79-85 (2000).

166. Halstead, E.S., Mueller, Y.M., Altman, J.D. & Katsikis, P.D. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Nat Immunol* **3**, 536-541 (2002).
167. Grujic, M., Bartholdy, C., Remy, M., Pinschewer, D.D., Christensen, J.P. & Thomsen, A.R. The role of CD80/CD86 in generation and maintenance of functional virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* **185**, 1730-1743 (2010).
168. Fuse, S., Zhang, W. & Usherwood, E.J. Control of memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation by CD80/CD86-CD28 costimulation and restoration by IL-2 during the recall response. *J Immunol* **180**, 1148-1157 (2008).
169. Borowski, A.B., Boesteanu, A.C., Mueller, Y.M., Carafides, C., Topham, D.J., Altman, J.D., Jennings, S.R. & Katsikis, P.D. Memory CD8<sup>+</sup> T cells require CD28 costimulation. *J Immunol* **179**, 6494-6503 (2007).
170. Williams, M.A., Tyznik, A.J. & Bevan, M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8<sup>+</sup> memory T cells. *Nature* **441**, 890-893 (2006).
171. van der Merwe, P.A., Bodian, D.L., Daenke, S., Linsley, P. & Davis, S.J. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* **185**, 393-403 (1997).
172. Stamper, C.C., Zhang, Y., Tobin, J.F., Erbe, D.V., Ikemizu, S., Davis, S.J., Stahl, M.L., Sehra, J., Somers, W.S. & Mosyak, L. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* **410**, 608-611 (2001).
173. Yokosuka, T., Kobayashi, W., Takamatsu, M., Sakata-Sogawa, K., Zeng, H., Hashimoto-Tane, A., Yagita, H., Tokunaga, M. & Saito, T. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity* **33**, 326-339 (2010).
174. Rudd, C.E., Taylor, A. & Schneider, H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* **229**, 12-26 (2009).
175. Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T.Z., Futter, C.E., Anderson, G., Walker, L.S. & Sansom, D.M. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**, 600-603 (2011).
176. Lee, K.M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D.K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L.E., Thompson, C.B. & Bluestone, J.A. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* **282**, 2263-2266 (1998).
177. Martin, M., Schneider, H., Azouz, A. & Rudd, C.E. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J Exp Med* **194**, 1675-1681 (2001).
178. Walker, L.S. & Sansom, D.M. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol* **11**, 852-863 (2011).
179. Hegel, J.K., Knieke, K., Kolar, P., Reiner, S.L. & Brunner-Weinzierl, M.C. CD152 (CTLA-4) regulates effector functions of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by repressing Eomesodermin. *Eur J Immunol* **39**, 883-893 (2009).

180. Pedicord, V.A., Montalvo, W., Leiner, I.M. & Allison, J.P. Single dose of anti-CTLA-4 enhances CD8<sup>+</sup> T-cell memory formation, function, and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 266-271 (2011).
181. 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).
182. Jin, H.T., Ahmed, R. & Okazaki, T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **350**, 17-37 (2011).
183. Sheppard, K.A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R. & Chaudhary, D. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* **574**, 37-41 (2004).
184. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141-151 (1999).
185. Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* **291**, 319-322 (2001).
186. Kamphorst, A.O. & Ahmed, R. Manipulating the PD-1 pathway to improve immunity. *Curr Opin Immunol* **25**, 381-388 (2013).
187. Penalzo-MacMaster, P., Kamphorst, A.O., Wieland, A., Araki, K., Iyer, S.S., West, E.E., O'Mara, L., Yang, S., Konieczny, B.T., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Rudensky, A.Y. & Ahmed, R. Interplay between regulatory T cells and PD-1 in modulating T cell exhaustion and viral control during chronic LCMV infection. *J Exp Med* **211**, 1905-1918 (2014).
188. 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).
189. Austin, J.W., Lu, P., Majumder, P., Ahmed, R. & Boss, J.M. STAT3, STAT4, NFATc1, and CTCF Regulate PD-1 through Multiple Novel Regulatory Regions in Murine T Cells. *J Immunol* (2014).
190. Terawaki, S., Chikuma, S., Shibayama, S., Hayashi, T., Yoshida, T., Okazaki, T. & Honjo, T. IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *J Immunol* **186**, 2772-2779 (2011).
191. Kinter, A.L., Godbout, E.J., McNally, J.P., Sereti, I., Roby, G.A., O'Shea, M.A. & Fauci, A.S. 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).
192. Kao, C., Oestreich, K.J., Paley, M.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Ali, M.A., Intlekofer, A.M., Boss, J.M., Reiner, S.L., Weinmann, A.S. & Wherry, E.J. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol* **12**, 663-671 (2011).
193. Lu, P., Youngblood, B.A., Austin, J.W., Mohammed, A.U., Butler, R., Ahmed, R. & Boss, J.M. Blimp-1 represses CD8 T cell expression of PD-1 using a feed-forward transcriptional circuit during acute viral infection. *J Exp Med* **211**, 515-527 (2014).

194. Youngblood, B., Oestreich, K.J., Ha, S.J., Duraiswamy, J., Akondy, R.S., West, E.E., Wei, Z., Lu, P., Austin, J.W., Riley, J.L., Boss, J.M. & Ahmed, R. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity* **35**, 400-412 (2011).
195. Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q. & Cheng, G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 193-209 (2003).
196. Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y. & Noelle, R.J. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* **229**, 152-172 (2009).
197. Watts, T.H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* **23**, 23-68 (2005).
198. Bekiaris, V., Gaspal, F., Kim, M.Y., Withers, D.R., Sweet, C., Anderson, G. & Lane, P.J. Synergistic OX40 and CD30 signals sustain CD8+ T cells during antigenic challenge. *Eur J Immunol* **39**, 2120-2125 (2009).
199. Hendriks, J., Xiao, Y., Rossen, J.W., van der Sluijs, K.F., Sugamura, K., Ishii, N. & Borst, J. During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J Immunol* **175**, 1665-1676 (2005).
200. Willoughby, J.E., Kerr, J.P., Rogel, A., Taraban, V.Y., Buchan, S.L., Johnson, P.W. & Al-Shamkhani, A. Differential Impact of CD27 and 4-1BB Costimulation on Effector and Memory CD8 T Cell Generation following Peptide Immunization. *J Immunol* **193**, 244-251 (2014).
201. Tesselaar, K., Xiao, Y., Arens, R., van Schijndel, G.M., Schuurhuis, D.H., Mebius, R.E., Borst, J. & van Lier, R.A. Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo. *J Immunol* **170**, 33-40 (2003).
202. Hendriks, J., Gravestien, L.A., Tesselaar, K., van Lier, R.A., Schumacher, T.N. & Borst, J. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* **1**, 433-440 (2000).
203. Arens, R., Schepers, K., Nolte, M.A., van Oosterwijk, M.F., van Lier, R.A., Schumacher, T.N. & van Oers, M.H. Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8+ T cell formation. *J Exp Med* **199**, 1595-1605 (2004).
204. Schildknecht, A., Miescher, I., Yagita, H. & van den Broek, M. Priming of CD8+ T cell responses by pathogens typically depends on CD70-mediated interactions with dendritic cells. *Eur J Immunol* **37**, 716-728 (2007).
205. Salek-Ardakani, S., Flynn, R., Arens, R., Yagita, H., Smith, G.L., Borst, J., Schoenberger, S.P. & Croft, M. The TNFR family members OX40 and CD27 link viral virulence to protective T cell vaccines in mice. *J Clin Invest* **121**, 296-307 (2011).
206. Hendriks, J., Xiao, Y. & Borst, J. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med* **198**, 1369-1380 (2003).
207. Peperzak, V., Xiao, Y., Veraar, E.A. & Borst, J. CD27 sustains survival of CTLs in virus-infected nonlymphoid tissue in mice by inducing autocrine IL-2 production. *J Clin Invest* **120**, 168-178 (2010).

208. van Gisbergen, K.P., Klarenbeek, P.L., Kragten, N.A., Unger, P.P., Nieuwenhuis, M.B., Wensveen, F.M., ten Brinke, A., Tak, P.P., Eldering, E., Nolte, M.A. & van Lier, R.A. The costimulatory molecule CD27 maintains clonally diverse CD8(+) T cell responses of low antigen affinity to protect against viral variants. *Immunity* **35**, 97-108 (2011).
209. 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).
210. Dawicki, W. & Watts, T.H. Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* **34**, 743-751 (2004).
211. Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H. & Okumura, K. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol* **14**, 275-286 (2002).
212. Wilcox, R.A., Chapoval, A.I., Gorski, K.S., Otsuji, M., Shin, T., Flies, D.B., Tamada, K., Mittler, R.S., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M. & Chen, L. Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol* **168**, 4262-4267 (2002).
213. Cooper, D., Bansal-Pakala, P. & Croft, M. 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but does not contribute to the development of cytotoxicity. *Eur J Immunol* **32**, 521-529 (2002).
214. 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).
215. 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).
216. Humphreys, I.R., Lee, S.W., Jones, M., Loewendorf, A., Gostick, E., Price, D.A., Benedict, C.A., Ware, C.F. & Croft, M. Biphasic role of 4-1BB in the regulation of mouse cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* **40**, 2762-2768 (2010).
217. Lin, G.H., Sedgmen, B.J., Moraes, T.J., Snell, L.M., Topham, D.J. & Watts, T.H. Endogenous 4-1BB ligand plays a critical role in protection from influenza-induced disease. *J Immunol* **182**, 934-947 (2009).
218. Pulle, G., Vidric, M. & Watts, T.H. IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. *J Immunol* **176**, 2739-2748 (2006).
219. al-Shamkhani, A., Birkeland, M.L., Puklavec, M., Brown, M.H., James, W. & Barclay, A.N. OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. *Eur J Immunol* **26**, 1695-1699 (1996).
220. Salek-Ardakani, S., Moutaftsi, M., Crotty, S., Sette, A. & Croft, M. OX40 drives protective vaccinia virus-specific CD8 T cells. *J Immunol* **181**, 7969-7976 (2008).
221. Murata, K., Ishii, N., Takano, H., Miura, S., Ndhlovu, L.C., Nose, M., Noda, T. & Sugamura, K. Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J Exp Med* **191**, 365-374 (2000).
222. Salek-Ardakani, S., Moutaftsi, M., Sette, A. & Croft, M. Targeting OX40 promotes lung-resident memory CD8 T cell populations that protect against respiratory poxvirus infection. *J Virol* **85**, 9051-9059 (2011).

223. Voo, K.S., Bover, L., Harline, M.L., Vien, L.T., Facchinetti, V., Arima, K., Kwak, L.W. & Liu, Y.J. Antibodies targeting human OX40 expand effector T cells and block inducible and natural regulatory T cell function. *J Immunol* **191**, 3641-3650 (2013).
224. Mousavi, S.F., Soroosh, P., Takahashi, T., Yoshikai, Y., Shen, H., Lefrancois, L., Borst, J., Sugamura, K. & Ishii, N. OX40 costimulatory signals potentiate the memory commitment of effector CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **181**, 5990-6001 (2008).
225. Bansal-Pakala, P., Halteman, B.S., Cheng, M.H. & Croft, M. Costimulation of CD8 T cell responses by OX40. *J Immunol* **172**, 4821-4825 (2004).
226. Nishimura, H., Yajima, T., Muta, H., Podack, E.R., Tani, K. & Yoshikai, Y. A novel role of CD30/CD30 ligand signaling in the generation of long-lived memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **175**, 4627-4634 (2005).
227. Kanamaru, F., Youngnak, P., Hashiguchi, M., Nishioka, T., Takahashi, T., Sakaguchi, S., Ishikawa, I. & Azuma, M. Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **172**, 7306-7314 (2004).
228. Stephens, G.L., McHugh, R.S., Whitters, M.J., Young, D.A., Luxenberg, D., Carreno, B.M., Collins, M. & Shevach, E.M. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **173**, 5008-5020 (2004).
229. Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S.F., Frewin, M.R., Cobbold, S.P. & Waldmann, H. Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15059-15064 (2003).
230. Ronchetti, S., Zollo, O., Bruscoli, S., Agostini, M., Bianchini, R., Nocentini, G., Ayroldi, E. & Riccardi, C. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* **34**, 613-622 (2004).
231. Snell, L.M., McPherson, A.J., Lin, G.H., Sakaguchi, S., Pandolfi, P.P., Riccardi, C. & Watts, T.H. CD8 T cell-intrinsic GITR is required for T cell clonal expansion and mouse survival following severe influenza infection. *J Immunol* **185**, 7223-7234 (2010).
232. Lin, G.H., Snell, L.M., Wortzman, M.E., Clouthier, D.L. & Watts, T.H. GITR-dependent regulation of 4-1BB expression: implications for T cell memory and anti-4-1BB-induced pathology. *J Immunol* **190**, 4627-4639 (2013).
233. Croft, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* **9**, 271-285 (2009).
234. Cannons, J.L., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M.A., Yagita, H., Okumura, K. & Watts, T.H. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* **167**, 1313-1324 (2001).
235. Zhu, Y., Zhu, G., Luo, L., Flies, A.S. & Chen, L. CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype. *Blood* **109**, 4882-4889 (2007).
236. Macdonald, D.C., Hotblack, A., Akbar, S., Britton, G., Collins, M.K. & Rosenberg, W.C. 4-1BB Ligand Activates Bystander Dendritic Cells To Enhance Immunization in Trans. *J Immunol* (2014).

237. Gramaglia, I., Weinberg, A.D., Lemon, M. & Croft, M. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* **161**, 6510-6517 (1998).
238. Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., Hammerbeck, C.D., Popescu, F. & Xiao, Z. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* **211**, 81-92 (2006).
239. Curtsinger, J.M. & Mescher, M.F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* **22**, 333-340 (2010).
240. Curtsinger, J.M., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedl, R.M., Jenkins, M.K. & Mescher, M.F. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **162**, 3256-3262 (1999).
241. 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).
242. Raue, 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).
243. 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).
244. Obar, J.J., Molloy, M.J., Jellison, E.R., Stoklasek, T.A., Zhang, W., Usherwood, E.J. & Lefrancois, L. CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 193-198 (2010).
245. Mitchell, D.M., Ravkov, E.V. & Williams, M.A. Distinct roles for IL-2 and IL-15 in the differentiation and survival of CD8+ effector and memory T cells. *J Immunol* **184**, 6719-6730 (2010).
246. Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J. & Rao, A. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* **32**, 79-90 (2010).
247. Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A. & Ahmed, R. Prolonged interleukin-2 expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* **32**, 91-103 (2010).
248. Vignali, D.A. & Kuchroo, V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* **13**, 722-728 (2012).
249. 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).
250. Pearce, E.L. & Shen, H. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J Immunol* **179**, 2074-2081 (2007).
251. Takemoto, N., Intlekofer, A.M., Northrup, J.T., Wherry, E.J. & Reiner, S.L. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* **177**, 7515-7519 (2006).
252. Krieg, A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* **20**, 709-760 (2002).

253. Pham, N.L., Badovinac, V.P. & Harty, J.T. Differential role of "Signal 3" inflammatory cytokines in regulating CD8 T cell expansion and differentiation in vivo. *Front Immunol* **2**, 4 (2011).
254. Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L. & Kaech, S.M. 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).
255. Badovinac, V.P., Messingham, K.A., 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).
256. Lacombe, M.H., Hardy, M.P., Rooney, J. & Labrecque, N. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8+ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* **175**, 4400-4407 (2005).
257. 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).
258. 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).
259. Keppler, S.J., Rosenits, K., Koegl, T., Vucikuja, 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).
260. 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).
261. Samuel, C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents (2001).
262. Gonzalez-Navajas, J.M., Lee, J., David, M. & Raz, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol* **12**, 125-135 (2012).
263. 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. *J Exp Med* **202**, 637-650 (2005).
264. Agarwal, P., Raghavan, A., Nandiwada, S.L., Curtsinger, J.M., Bohjanen, P.R., Mueller, D.L. & Mescher, M.F. 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).
265. Gil, M.P., Ploquin, M.J., Watford, W.T., Lee, S.H., Kim, K., Wang, X., Kanno, Y., O'Shea, J.J. & Biron, C.A. Regulating type I IFN effects in CD8 T cells during viral infections: changing STAT4 and STAT1 expression for function. *Blood* **120**, 3718-3728 (2012).
266. 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).

267. Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G. & Ricciardi-Castagnoli, P. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* **2**, 882-888 (2001).
268. Yui, M.A., Sharp, L.L., Havran, W.L. & Rothenberg, E.V. Preferential activation of an IL-2 regulatory sequence transgene in TCR gamma delta and NKT cells: subset-specific differences in IL-2 regulation. *J Immunol* **172**, 4691-4699 (2004).
269. Feau, S., Arens, R., Togher, S. & Schoenberger, S.P. Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells. *Nat Immunol* **12**, 908-913 (2011).
270. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* **201**, 723-735 (2005).
271. Wojciechowski, W., Harris, D.P., Sprague, F., Mousseau, B., Makris, M., Kusser, K., Honjo, T., Mohrs, K., Mohrs, M., Randall, T. & Lund, F.E. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. *Immunity* **30**, 421-433 (2009).
272. Boyman, O. & Sprent, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* **12**, 180-190 (2012).
273. Liao, W., Lin, J.X. & Leonard, W.J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol* **23**, 598-604 (2011).
274. Morgan, D.A., Ruscetti, F.W. & Gallo, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**, 1007-1008 (1976).
275. Rutishauser, R.L., Martins, G.A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I.A., Meffre, E., Jacob, J., Calame, K. & Kaech, S.M. 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).
276. 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* (2014).
277. Shin, H.M., Kapoor, V.N., Guan, T., Kaech, S.M., Welsh, R.M. & Berg, L.J. Epigenetic modifications induced by Blimp-1 Regulate CD8(+) T cell memory progression during acute virus infection. *Immunity* **39**, 661-675 (2013).
278. Blattman, J.N., Antia, R., Sourdive, D.J., Wang, X., Kaech, S.M., Murali-Krishna, K., Altman, J.D. & Ahmed, R. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 657-664 (2002).
279. Obar, J.J., Khanna, K.M. & Lefrancois, L. Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* **28**, 859-869 (2008).
280. Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Amblard, F. & Amigorena, S. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* **5**, 1235-1242 (2004).
281. Mempel, T.R., Henrickson, S.E. & Von Andrian, U.H. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**, 154-159 (2004).

282. van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E. & Schoenberger, S.P. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* **2**, 423-429 (2001).
283. van Stipdonk, M.J., Hardenberg, G., Bijker, M.S., Lemmens, E.E., Droin, N.M., Green, D.R. & Schoenberger, S.P. Dynamic programming of CD8<sup>+</sup> T lymphocyte responses. *Nat Immunol* **4**, 361-365 (2003).
284. Kaech, S.M. & Ahmed, R. Memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* **2**, 415-422 (2001).
285. Mercado, R., Vijh, S., Allen, S.E., Kerksiek, K., Pilip, I.M. & Pamer, E.G. Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* **165**, 6833-6839 (2000).
286. Williams, M.A. & Bevan, M.J. Shortening the infectious period does not alter expansion of CD8 T cells but diminishes their capacity to differentiate into memory cells. *J Immunol* **173**, 6694-6702 (2004).
287. Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W.N., Konieczny, B.T., Subramaniam, S. & Ahmed, R. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* **205**, 625-640 (2008).
288. Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* **111**, 837-851 (2002).
289. 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).
290. Zhang, N. & Bevan, M.J. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* **35**, 161-168 (2011).
291. Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R. & Lascurain, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* **6**, 15-25 (2009).
292. Chi, H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat Rev Immunol* **12**, 325-338 (2012).
293. Pollizzi, K.N. & Powell, J.D. Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nat Rev Immunol* **14**, 435-446 (2014).
294. Forster, R., Davalos-Misslitz, A.C. & Rot, A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* **8**, 362-371 (2008).
295. Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C. & Iwasaki, A. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* **462**, 510-513 (2009).
296. Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R. & Heath, W.R. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol* **31**, 137-161 (2013).
297. Obar, J.J., Jellison, E.R., Sheridan, B.S., Blair, D.A., Pham, Q.M., Zickovich, J.M. & Lefrancois, L. Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J Immunol* **187**, 4967-4978 (2011).
298. Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D. & Ahmed, R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**, 1191-1198 (2003).

299. Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C. & Lefrancois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* **1**, 426-432 (2000).
300. Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A. & Wherry, E.J. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* **10**, 29-37 (2009).
301. Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J. & Ahmed, R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682-687 (2006).
302. Blackburn, S.D., Shin, H., Freeman, G.J. & Wherry, E.J. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15016-15021 (2008).
303. Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J., Suresh, M., Altman, J.D. & Ahmed, R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* **188**, 2205-2213 (1998).
304. 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).
305. Wherry, E.J., Ha, S.J., Kaech, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L. & Ahmed, R. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**, 670-684 (2007).
306. Shin, H., Blackburn, S.D., Blattman, J.N. & Wherry, E.J. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med* **204**, 941-949 (2007).
307. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**, 1675-1687 (1998).
308. Krammer, P.H., Arnold, R. & Lavrik, I.N. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* **7**, 532-542 (2007).
309. Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308 (1998).
310. Crowder, R.N. & El-Deiry, W.S. Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. *Exp Oncol* **34**, 160-164 (2012).
311. Algeciras-Schimnich, A., Griffith, T.S., Lynch, D.H. & Paya, C.V. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* **162**, 5205-5211 (1999).
312. Schmitz, I., Weyd, H., Krueger, A., Baumann, S., Fas, S.C., Krammer, P.H. & Kirchhoff, S. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J Immunol* **172**, 2194-2200 (2004).
313. Schmitz, I., Krueger, A., Baumann, S., Schulze-Bergkamen, H., Krammer, P.H. & Kirchhoff, S. 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).

314. Kirchhoff, S., Muller, W.W., Krueger, A., Schmitz, I. & Krammer, P.H. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* **165**, 6293-6300 (2000).
315. Blattman, J.N., Grayson, J.M., Wherry, E.J., Kaech, S.M., Smith, K.A. & Ahmed, R. Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nat Med* **9**, 540-547 (2003).
316. Yajima, T., Yoshihara, K., Nakazato, K., Kumabe, S., Koyasu, S., Sad, S., Shen, H., Kuwano, H. & Yoshikai, Y. IL-15 regulates CD8<sup>+</sup> T cell contraction during primary infection. *J Immunol* **176**, 507-515 (2006).
317. Pellegrini, M., Belz, G., Bouillet, P. & Strasser, A. Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14175-14180 (2003).
318. Wojciechowski, S., Jordan, M.B., Zhu, Y., White, J., Zajac, A.J. & Hildeman, D.A. Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory. *Eur J Immunol* **36**, 1694-1706 (2006).
319. Prlic, M. & Bevan, M.J. Exploring regulatory mechanisms of CD8<sup>+</sup> T cell contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16689-16694 (2008).
320. Badovinac, V.P., Porter, B.B. & Harty, J.T. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* **3**, 619-626 (2002).
321. Shi, Y.F., Sahai, B.M. & Green, D.R. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* **339**, 625-626 (1989).
322. Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T. & Nagata, S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**, 969-976 (1994).
323. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. & Nagata, S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**, 314-317 (1992).
324. Teachey, D.T. New advances in the diagnosis and treatment of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Pediatr* **24**, 1-8 (2012).
325. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712 (1999).
326. Wherry, E.J., Teichgraber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H. & Ahmed, R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* **4**, 225-234 (2003).
327. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L. & Lefrancois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**, 2413-2417 (2001).
328. Gebhardt, T., Wakim, L.M., Eidsmo, L., Reading, P.C., Heath, W.R. & Carbone, F.R. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol* **10**, 524-530 (2009).
329. Masopust, D., Choo, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Duraiswamy, J., Akondy, R., Wang, J., Casey, K.A., Barber, D.L., Kawamura, K.S., Fraser, K.A., Webby, R.J., Brinkmann, V., Butcher, E.C., Newell, K.A. & Ahmed, R. Dynamic T cell migration program

- provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med* **207**, 553-564 (2010).
330. Klonowski, K.D., Williams, K.J., Marzo, A.L., Blair, D.A., Lingenheld, E.G. & Lefrancois, L. Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration in vivo. *Immunity* **20**, 551-562 (2004).
  331. Gebhardt, T., Whitney, P.G., Zaid, A., Mackay, L.K., Brooks, A.G., Heath, W.R., Carbone, F.R. & Mueller, S.N. Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells. *Nature* **477**, 216-219 (2011).
  332. Badovinac, V.P. & Harty, J.T. Manipulating the rate of memory CD8+ T cell generation after acute infection. *J Immunol* **179**, 53-63 (2007).
  333. 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).
  334. Sung, J.H., Zhang, H., Moseman, E.A., Alvarez, D., Iannacone, M., Henrickson, S.E., de la Torre, J.C., Groom, J.R., Luster, A.D. & von Andrian, U.H. Chemokine guidance of central memory T cells is critical for antiviral recall responses in lymph nodes. *Cell* **150**, 1249-1263 (2012).
  335. Cho, B.K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H.N. & Chen, J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2976-2981 (1999).
  336. 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. *Eur J Immunol* **29**, 291-299 (1999).
  337. Araki, Y., Wang, Z., Zang, C., Wood, W.H., 3rd, Schones, D., Cui, K., Roh, T.Y., Lhotsky, B., Wersto, R.P., Peng, W., Becker, K.G., Zhao, K. & Weng, N.P. Genome-wide analysis of histone methylation reveals chromatin state-based regulation of gene transcription and function of memory CD8+ T cells. *Immunity* **30**, 912-925 (2009).
  338. Zediak, V.P., Johnnidis, J.B., Wherry, E.J. & Berger, S.L. Cutting edge: persistently open chromatin at effector gene loci in resting memory CD8+ T cells independent of transcriptional status. *J Immunol* **186**, 2705-2709 (2011).
  339. Youngblood, B., Davis, C.W. & Ahmed, R. Making memories that last a lifetime: heritable functions of self-renewing memory CD8 T cells. *Int Immunol* **22**, 797-803 (2010).
  340. Soudja, S.M., Chandrabos, C., Yakob, E., Veenstra, M., Palliser, D. & Lauvau, G. Memory-T-cell-derived interferon-gamma instructs potent innate cell activation for protective immunity. *Immunity* **40**, 974-988 (2014).
  341. Slifka, M.K. & Whitton, J.L. Functional avidity maturation of CD8(+) T cells without selection of higher affinity TCR. *Nat Immunol* **2**, 711-717 (2001).
  342. Kumar, R., Ferez, M., Swamy, M., Arechaga, I., Rejas, M.T., Valpuesta, J.M., Schamel, W.W., Alarcon, B. & van Santen, H.M. Increased sensitivity of antigen-experienced T cells through the enrichment of oligomeric T cell receptor complexes. *Immunity* **35**, 375-387 (2011).
  343. Mehlhop-Williams, E.R. & Bevan, M.J. Memory CD8+ T cells exhibit increased antigen threshold requirements for recall proliferation. *J Exp Med* **211**, 345-356 (2014).

344. Guy, C.S., Vignali, K.M., Temirov, J., Bettini, M.L., Overacre, A.E., Smeltzer, M., Zhang, H., Huppa, J.B., Tsai, Y.H., Lobry, C., Xie, J., Dempsey, P.J., Crawford, H.C., Aifantis, I., Davis, M.M. & Vignali, D.A. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat Immunol* **14**, 262-270 (2013).
345. Martin, M.D., Condotta, S.A., Harty, J.T. & Badovinac, V.P. Population dynamics of naive and memory CD8 T cell responses after antigen stimulations in vivo. *J Immunol* **188**, 1255-1265 (2012).
346. Surh, C.D. & Sprent, J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* **29**, 848-862 (2008).
347. Becker, T.C., Wherry, E.J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A. & Ahmed, R. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 1541-1548 (2002).
348. Carrio, R., Rolle, C.E. & Malek, T.R. Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8<sup>+</sup> memory T cells. *Eur J Immunol* **37**, 3078-3088 (2007).
349. Osborne, L.C., Dhanji, S., Snow, J.W., Priatel, J.J., Ma, M.C., Miners, M.J., Teh, H.S., Goldsmith, M.A. & Abraham, N. Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *J Exp Med* **204**, 619-631 (2007).
350. Nolz, J.C., Rai, D., Badovinac, V.P. & Harty, J.T. Division-linked generation of death-intermediates regulates the numerical stability of memory CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6199-6204 (2012).
351. Murali-Krishna, K., Lau, L.L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J. & Ahmed, R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* **286**, 1377-1381 (1999).
352. Leignadier, J., Hardy, M.P., Cloutier, M., Rooney, J. & Labrecque, N. Memory T-lymphocyte survival does not require T-cell receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20440-20445 (2008).
353. Kaech, S.M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **12**, 749-761 (2012).
354. Stemberger, C., Huster, K.M., Koffler, M., Anderl, F., Schiemann, M., Wagner, H. & Busch, D.H. A single naive CD8<sup>+</sup> T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* **27**, 985-997 (2007).
355. Plumlee, C.R., Sheridan, B.S., Cicek, B.B. & Lefrancois, L. Environmental cues dictate the fate of individual CD8<sup>+</sup> T cells responding to infection. *Immunity* **39**, 347-356 (2013).
356. Gerlach, C., van Heijst, J.W., Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R.M., Zehn, D., Bevan, M.J., Schepers, K. & Schumacher, T.N. One naive T cell, multiple fates in CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J Exp Med* **207**, 1235-1246 (2010).
357. Gerlach, C., Rohr, J.C., Perie, L., van Rooij, N., van Heijst, J.W., Velds, A., Urbanus, J., Naik, S.H., Jacobs, H., Beltman, J.B., de Boer, R.J. & Schumacher, T.N. Heterogeneous differentiation patterns of individual CD8<sup>+</sup> T cells. *Science* **340**, 635-639 (2013).
358. Buchholz, V.R., Flossdorf, M., Hensel, I., Kretschmer, L., Weissbrich, B., Graf, P., Verschoor, A., Schiemann, M., Hofer, T. & Busch, D.H. Disparate individual fates compose robust CD8<sup>+</sup> T cell immunity. *Science* **340**, 630-635 (2013).

359. Yuzefpolskiy, Y., Baumann, F.M., Kalia, V. & Sarkar, S. Early CD8 T-cell memory precursors and terminal effectors exhibit equipotent in vivo degranulation. *Cell Mol Immunol* (2014).
360. Bannard, O., Kraman, M. & Fearon, D.T. Secondary replicative function of CD8<sup>+</sup> T cells that had developed an effector phenotype. *Science* **323**, 505-509 (2009).
361. Badovinac, V.P., Porter, B.B. & Harty, J.T. CD8<sup>+</sup> T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* **5**, 809-817 (2004).
362. 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).
363. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* **2**, 982-987 (2002).
364. Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., Killeen, N., Orange, J.S., Russell, S.M., Weninger, W. & Reiner, S.L. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* **315**, 1687-1691 (2007).
365. Chang, J.T., Ciocca, M.L., Kinjyo, I., Palanivel, V.R., McClurkin, C.E., Dejong, C.S., Mooney, E.C., Kim, J.S., Steinel, N.C., Oliaro, J., Yin, C.C., Florea, B.I., Overkleeft, H.S., Berg, L.J., Russell, S.M., Koretzky, G.A., Jordan, M.S. & Reiner, S.L. Asymmetric proteasome segregation as a mechanism for unequal partitioning of the transcription factor T-bet during T lymphocyte division. *Immunity* **34**, 492-504 (2011).
366. Arsenio, J., Kakaradov, B., Metz, P.J., Kim, S.H., Yeo, G.W. & Chang, J.T. Early specification of CD8<sup>+</sup> T lymphocyte fates during adaptive immunity revealed by single-cell gene-expression analyses. *Nat Immunol* **15**, 365-372 (2014).
367. Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., Gapin, L., Ryan, K., Russ, A.P., Lindsten, T., Orange, J.S., Goldrath, A.W., Ahmed, R. & Reiner, S.L. Effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* **6**, 1236-1244 (2005).
368. Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., Wherry, E.J. & Reiner, S.L. Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8<sup>+</sup> T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol* **185**, 4988-4992 (2010).
369. Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Kao, C., Banerjee, A., Schambach, F., Northrop, J.K., Shen, H., Wherry, E.J. & Reiner, S.L. Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* **204**, 2015-2021 (2007).
370. Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M.E., Djuretic, I.M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M.G., Groner, Y. & Rao, A. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med* **206**, 51-59 (2009).
371. Iborra, S., Ramos, M., Arana, D.M., Lazaro, S., Aguilar, F., Santos, E., Lopez, D., Fernandez-Malave, E. & Del Val, M. N-ras couples antigen receptor signaling to Eomesodermin and to functional CD8<sup>+</sup> T cell memory but not to effector differentiation. *J Exp Med* **210**, 1463-1479 (2013).
372. Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Takemoto, N., Gordon, S.M., Dejong, C.S., Shin, H., Hunter, C.A., Wherry, E.J., Lindsten, T. & Reiner, S.L. Anomalous type 17 response

- to viral infection by CD8<sup>+</sup> T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* **321**, 408-411 (2008).
373. Paley, M.A., Gordon, S.M., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Wherry, E.J. & Reiner, S.L. Technical Advance: Fluorescent reporter reveals insights into eomesodermin biology in cytotoxic lymphocytes. *J Leukoc Biol* **93**, 307-315 (2013).
374. Crotty, S., Johnston, R.J. & Schoenberger, S.P. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol* **11**, 114-120 (2010).
375. Kallies, A., Xin, A., Belz, G.T. & Nutt, S.L. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8<sup>(+)</sup> T cells and memory responses. *Immunity* **31**, 283-295 (2009).
376. Gong, D. & Malek, T.R. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. *J Immunol* **178**, 242-252 (2007).
377. Kwon, H., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Kim, H.P., Oh, J., Tunyaplin, C., Carotta, S., Donovan, C.E., Goldman, M.L., Taylor, P., Ozato, K., Levy, D.E., Nutt, S.L., Calame, K. & Leonard, W.J. Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity* **31**, 941-952 (2009).
378. Yoshida, K., Sakamoto, A., Yamashita, K., Arguni, E., Horigome, S., Arima, M., Hatano, M., Seki, N., Ichikawa, T. & Tokuhsa, T. Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* **36**, 3146-3156 (2006).
379. Fukuda, T., Miki, T., Yoshida, T., Hatano, M., Ohashi, K., Hirotsawa, S. & Tokuhsa, T. The murine BCL6 gene is induced in activated lymphocytes as an immediate early gene. *Oncogene* **11**, 1657-1663 (1995).
380. Cui, W., Liu, Y., Weinstein, J.S., Craft, J. & Kaech, S.M. An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* **35**, 792-805 (2011).
381. Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y. & Tokuhsa, T. Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **173**, 883-891 (2004).
382. Ji, Y., Pos, Z., Rao, M., Klebanoff, C.A., Yu, Z., Sukumar, M., Reger, R.N., Palmer, D.C., Borman, Z.A., Muranski, P., Wang, E., Schrumpp, D.S., Marincola, F.M., Restifo, N.P. & Gattinoni, L. Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* **12**, 1230-1237 (2011).
383. Ichii, H., Sakamoto, A., Hatano, M., Okada, S., Toyama, H., Taki, S., Arima, M., Kuroda, Y. & Tokuhsa, T. Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* **3**, 558-563 (2002).
384. Yoshida, T., Fukuda, T., Hatano, M., Koseki, H., Okabe, S., Ishibashi, K., Kojima, S., Arima, M., Komuro, I., Ishii, G., Miki, T., Hirotsawa, S., Miyasaka, N., Taniguchi, M., Ochiai, T., Isono, K. & Tokuhsa, T. The role of Bcl6 in mature cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **42**, 670-679 (1999).
385. Murre, C. Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat Immunol* **6**, 1079-1086 (2005).
386. Yang, C.Y., Best, J.A., Knell, J., Yang, E., Sheridan, A.D., Jesionek, A.K., Li, H.S., Rivera, R.R., Lind, K.C., D'Cruz, L.M., Watowich, S.S., Murre, C. & Goldrath, A.W.

- The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8<sup>+</sup> T cell subsets. *Nat Immunol* **12**, 1221-1229 (2011).
387. Cannarile, M.A., Lind, N.A., Rivera, R., Sheridan, A.D., Camfield, K.A., Wu, B.B., Cheung, K.P., Ding, Z. & Goldrath, A.W. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8<sup>+</sup> T cell immunity. *Nat Immunol* **7**, 1317-1325 (2006).
  388. Friedl, P., den Boer, A.T. & Gunzer, M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **5**, 532-545 (2005).
  389. Scholer, A., Hugues, S., Boissonnas, A., Fetler, L. & Amigorena, S. Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8<sup>+</sup> T cell memory. *Immunity* **28**, 258-270 (2008).
  390. Parameswaran, N., Suresh, R., Bal, V., Rath, S. & George, A. Lack of ICAM-1 on APCs during T cell priming leads to poor generation of central memory cells. *J Immunol* **175**, 2201-2211 (2005).
  391. Shedlock, D.J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337-339 (2003).
  392. Sun, J.C. & Bevan, M.J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**, 339-342 (2003).
  393. Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F. & Heath, W.R. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**, 478-480 (1998).
  394. Ferrer, I.R., Liu, D., Pinelli, D.F., Koehn, B.H., Stempora, L.L. & Ford, M.L. CD40/CD154 blockade inhibits dendritic cell expression of inflammatory cytokines but not costimulatory molecules. *J Immunol* **189**, 4387-4395 (2012).
  395. Feau, S., Garcia, Z., Arens, R., Yagita, H., Borst, J. & Schoenberger, S.P. The CD4(+) T-cell help signal is transmitted from APC to CD8(+) T-cells via CD27-CD70 interactions. *Nat Commun* **3**, 948 (2012).
  396. Matter, M.S., Claus, C. & Ochsenein, A.F. CD4<sup>+</sup> T cell help improves CD8<sup>+</sup> T cell memory by retained CD27 expression. *Eur J Immunol* **38**, 1847-1856 (2008).
  397. Wortzman, M.E., Clouthier, D.L., McPherson, A.J., Lin, G.H. & Watts, T.H. The contextual role of TNFR family members in CD8(+) T-cell control of viral infections. *Immunol Rev* **255**, 125-148 (2013).
  398. Janssen, E.M., Droin, N.M., Lemmens, E.E., Pinkoski, M.J., Bensinger, S.J., Ehst, B.D., Griffith, T.S., Green, D.R. & Schoenberger, S.P. CD4<sup>+</sup> T-cell help controls CD8<sup>+</sup> T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* **434**, 88-93 (2005).
  399. Sun, J.C., Williams, M.A. & Bevan, M.J. CD4<sup>+</sup> T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8<sup>+</sup> T cells after acute infection. *Nat Immunol* **5**, 927-933 (2004).
  400. Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C. & Germain, R.N. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8<sup>+</sup> T cells to sites of CD4<sup>+</sup> T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890-895 (2006).
  401. Wiesel, M. & Oxenius, A. From crucial to negligible: functional CD8(+) T-cell responses and their dependence on CD4(+) T-cell help. *Eur J Immunol* **42**, 1080-1088 (2012).

402. Marzo, A.L., Vezys, V., Klonowski, K.D., Lee, S.J., Muralimohan, G., Moore, M., Tough, D.F. & Lefrancois, L. Fully functional memory CD8 T cells in the absence of CD4 T cells. *J Immunol* **173**, 969-975 (2004).
403. Staal, F.J., Luis, T.C. & Tiemessen, M.M. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* **8**, 581-593 (2008).
404. Zhao, D.M., Yu, S., Zhou, X., Haring, J.S., Held, W., Badovinac, V.P., Harty, J.T. & Xue, H.H. Constitutive activation of Wnt signaling favors generation of memory CD8 T cells. *J Immunol* **184**, 1191-1199 (2010).
405. Gattinoni, L., Zhong, X.S., Palmer, D.C., Ji, Y., Hinrichs, C.S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Garvin, L.M., Paulos, C.M., Muranski, P. & Restifo, N.P. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8<sup>+</sup> memory stem cells. *Nat Med* **15**, 808-813 (2009).
406. Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.M., Harty, J.T., Badovinac, V.P. & Xue, H.H. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* **33**, 229-240 (2010).
407. Jeannet, G., Boudousquie, C., Gardiol, N., Kang, J., Huelsken, J. & Held, W. Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9777-9782 (2010).
408. Yuan, J.S., Kousis, P.C., Suliman, S., Visan, I. & Guidos, C.J. Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annu Rev Immunol* **28**, 343-365 (2010).
409. Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J. & MacDonald, H.R. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* **5**, 247-253 (2004).
410. Andersson, E.R., Sandberg, R. & Lendahl, U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* **138**, 3593-3612 (2011).
411. Hicks, C., Johnston, S.H., diSibio, G., Collazo, A., Vogt, T.F. & Weinmaster, G. Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biol* **2**, 515-520 (2000).
412. Kato, T.M., Kawaguchi, A., Kosodo, Y., Niwa, H. & Matsuzaki, F. Lunatic fringe potentiates Notch signaling in the developing brain. *Mol Cell Neurosci* **45**, 12-25 (2010).
413. Besseyrias, V., Fiorini, E., Strobl, L.J., Zimmer-Strobl, U., Dumortier, A., Koch, U., Arcangeli, M.L., Ezine, S., Macdonald, H.R. & Radtke, F. Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. *J Exp Med* **204**, 331-343 (2007).
414. Oswald, F., Tauber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S. & Schmid, R.M. p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol Cell Biol* **21**, 7761-7774 (2001).
415. Wu, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S. & Griffin, J.D. MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* **26**, 484-489 (2000).
416. Wallberg, A.E., Pedersen, K., Lendahl, U. & Roeder, R.G. p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Mol Cell Biol* **22**, 7812-7819 (2002).

417. Zhou, S. & Hayward, S.D. Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex. *Mol Cell Biol* **21**, 6222-6232 (2001).
418. Maillard, I., Adler, S.H. & Pear, W.S. Notch and the immune system. *Immunity* **19**, 781-791 (2003).
419. Fang, T.C., Yashiro-Ohtani, Y., Del Bianco, C., Knoblock, D.M., Blacklow, S.C. & Pear, W.S. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* **27**, 100-110 (2007).
420. Wang, H., Zou, J., Zhao, B., Johannsen, E., Ashworth, T., Wong, H., Pear, W.S., Schug, J., Blacklow, S.C., Arnett, K.L., Bernstein, B.E., Kieff, E. & Aster, J.C. Genome-wide analysis reveals conserved and divergent features of Notch1/RBPJ binding in human and murine T-lymphoblastic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14908-14913 (2011).
421. 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).
422. Guruharsha, K.G., Kankel, M.W. & Artavanis-Tsakonas, S. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* **13**, 654-666 (2012).
423. Sprinzak, D., Lakhanpal, A., Lebon, L., Santat, L.A., Fontes, M.E., Anderson, G.A., Garcia-Ojalvo, J. & Elowitz, M.B. Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* **465**, 86-90 (2010).
424. Luty, W.H., Rodeberg, D., Parness, J. & Vyas, Y.M. Antiparallel segregation of notch components in the immunological synapse directs reciprocal signaling in allogeneic Th:DC conjugates. *J Immunol* **179**, 819-829 (2007).
425. Andersen, P., Uosaki, H., Shenje, L.T. & Kwon, C. Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol* **22**, 257-265 (2012).
426. Auderset, F., Schuster, S., Coutaz, M., Koch, U., Desgranges, F., Merck, E., MacDonald, H.R., Radtke, F. & Tacchini-Cottier, F. Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFN $\gamma$  secretion by T helper 1 cells during infection with *Leishmania major*. *PLoS Pathog* **8**, e1002560 (2012).
427. Maekawa, Y., Minato, Y., Ishifune, C., Kurihara, T., Kitamura, A., Kojima, H., Yagita, H., Sakata-Yanagimoto, M., Saito, T., Taniuchi, I., Chiba, S., Sone, S. & Yasutomo, K. Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* **9**, 1140-1147 (2008).
428. Cho, O.H., Shin, H.M., Miele, L., Golde, T.E., Fauq, A., Minter, L.M. & Osborne, B.A. Notch regulates cytolytic effector function in CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **182**, 3380-3389 (2009).
429. Shin, H.M., Minter, L.M., Cho, O.H., Gottipati, S., Fauq, A.H., Golde, T.E., Sonenshein, G.E. & Osborne, B.A. Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention. *EMBO J* **25**, 129-138 (2006).
430. Anderson, A.C., Kitchens, E.A., Chan, S.W., St Hill, C., Jan, Y.N., Zhong, W. & Robey, E.A. The Notch regulator Numb links the Notch and TCR signaling pathways. *J Immunol* **174**, 890-897 (2005).
431. Dongre, A., Surampudi, L., Lawlor, R.G., Fauq, A.H., Miele, L., Golde, T.E., Minter, L.M. & Osborne, B.A. Non-Canonical Notch Signaling Drives Activation and Differentiation of Peripheral CD4(+) T Cells. *Front Immunol* **5**, 54 (2014).

432. Shin, H.M., Tilahun, M.E., Cho, O.H., Chandiran, K., Kuksin, C.A., Keerthivasan, S., Fauq, A.H., Golde, T.E., Miele, L., Thome, M., Osborne, B.A. & Minter, L.M. NOTCH1 Can Initiate NF-kappaB Activation via Cytosolic Interactions with Components of the T Cell Signalosome. *Front Immunol* **5**, 249 (2014).
433. Sandy, A.R., Chung, J., Toubai, T., Shan, G.T., Tran, I.T., Friedman, A., Blackwell, T.S., Reddy, P., King, P.D. & Maillard, I. 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).
434. Sakano, D., Kato, A., Parikh, N., McKnight, K., Terry, D., Stefanovic, B. & Kato, Y. BCL6 canalizes Notch-dependent transcription, excluding Mastermind-like1 from selected target genes during left-right patterning. *Dev Cell* **18**, 450-462 (2010).
435. Tiberi, L., van den Ameele, J., Dimidschstein, J., Piccirilli, J., Gall, D., Herpoel, A., Bilheu, A., Bonnefont, J., Iacovino, M., Kyba, M., Bouschet, T. & Vanderhaeghen, P. BCL6 controls neurogenesis through Sirt1-dependent epigenetic repression of selective Notch targets. *Nat Neurosci* **15**, 1627-1635 (2012).
436. Doedens, A.L., Phan, A.T., Stradner, M.H., Fujimoto, J.K., Nguyen, J.V., Yang, E., Johnson, R.S. & Goldrath, A.W. Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol* **14**, 1173-1182 (2013).
437. Denko, N.C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* **8**, 705-713 (2008).
438. Bruick, R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev* **17**, 2614-2623 (2003).
439. Gustafsson, M.V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U. & Bondesson, M. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* **9**, 617-628 (2005).
440. Sainson, R.C. & Harris, A.L. Hypoxia-regulated differentiation: let's step it up a Notch. *Trends Mol Med* **12**, 141-143 (2006).
441. Kwon, C., Cheng, P., King, I.N., Andersen, P., Shenje, L., Nigam, V. & Srivastava, D. Notch post-translationally regulates beta-catenin protein in stem and progenitor cells. *Nat Cell Biol* **13**, 1244-1251 (2011).
442. Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N.R., Duarte, A., Macdonald, H.R. & Radtke, F. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med* **205**, 2515-2523 (2008).
443. Hozumi, K., Mailhos, C., Negishi, N., Hirano, K., Yahata, T., Ando, K., Zuklys, S., Hollander, G.A., Shima, D.T. & Habu, S. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* **205**, 2507-2513 (2008).
444. Wilson, A., MacDonald, H.R. & Radtke, F. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* **194**, 1003-1012 (2001).
445. Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R. & Aguet, M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547-558 (1999).
446. Chi, A.W., Bell, J.J., Zlotoff, D.A. & Bhandoola, A. Untangling the T branch of the hematopoiesis tree. *Curr Opin Immunol* **21**, 121-126 (2009).

447. Fiorini, E., Merck, E., Wilson, A., Ferrero, I., Jiang, W., Koch, U., Auderset, F., Laurenti, E., Tacchini-Cottier, F., Pierres, M., Radtke, F., Luther, S.A. & Macdonald, H.R. 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).
448. Riella, L.V., Ueno, T., Batal, I., De Serres, S.A., Bassil, R., Elyaman, W., Yagita, H., Medina-Pestana, J.O., Chandraker, A. & Najafian, N. Blockade of Notch ligand delta1 promotes allograft survival by inhibiting alloreactive Th1 cells and cytotoxic T cell generation. *J Immunol* **187**, 4629-4638 (2011).
449. Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T. & Flavell, R.A. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* **117**, 515-526 (2004).
450. Maekawa, Y., Tsukumo, S., Chiba, S., Hirai, H., Hayashi, Y., Okada, H., Kishihara, K. & Yasutomo, K. Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. *Immunity* **19**, 549-559 (2003).
451. Amsen, D., Antov, A., Jankovic, D., Sher, A., Radtke, F., Souabni, A., Busslinger, M., McCright, B., Gridley, T. & Flavell, R.A. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* **27**, 89-99 (2007).
452. Minter, L.M., Turley, D.M., Das, P., Shin, H.M., Joshi, I., Lawlor, R.G., Cho, O.H., Palaga, T., Gottipati, S., Telfer, J.C., Kostura, L., Fauq, A.H., Simpson, K., Such, K.A., Miele, L., Golde, T.E., Miller, S.D. & Osborne, B.A. Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat Immunol* **6**, 680-688 (2005).
453. Roderick, J.E., Gonzalez-Perez, G., Kuksin, C.A., Dongre, A., Roberts, E.R., Srinivasan, J., Andrzejewski, C., Jr., Fauq, A.H., Golde, T.E., Miele, L. & Minter, L.M. Therapeutic targeting of NOTCH signaling ameliorates immune-mediated bone marrow failure of aplastic anemia. *J Exp Med* **210**, 1311-1329 (2013).
454. Sandy, A.R., Stoolman, J., Malott, K., Pongtornpipat, P., Segal, B.M. & Maillard, I. Notch signaling regulates T cell accumulation and function in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **191**, 1606-1613 (2013).
455. Zhang, Y., Sandy, A.R., Wang, J., Radojcic, V., Shan, G.T., Tran, I.T., Friedman, A., Kato, K., He, S., Cui, S., Hexner, E., Frank, D.M., Emerson, S.G., Pear, W.S. & Maillard, I. Notch signaling is a critical regulator of allogeneic CD4+ T-cell responses mediating graft-versus-host disease. *Blood* **117**, 299-308 (2011).
456. Tran, I.T., Sandy, A.R., Carulli, A.J., Ebens, C., Chung, J., Shan, G.T., Radojcic, V., Friedman, A., Gridley, T., Shelton, A., Reddy, P., Samuelson, L.C., Yan, M., Siebel, C.W. & Maillard, I. Blockade of individual Notch ligands and receptors controls graft-versus-host disease. *J Clin Invest* **123**, 1590-1604 (2013).
457. Beel, A.J. & Sanders, C.R. Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1311-1334 (2008).
458. Ong, C.T., Sedy, 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).

459. Tacchini-Cottier, F., Allenbach, C., Otten, L.A. & Radtke, F. Notch1 expression on T cells is not required for CD4+ T helper differentiation. *Eur J Immunol* **34**, 1588-1596 (2004).
460. 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).
461. Bailis, W., Yashiro-Ohtani, Y., Fang, T.C., Hatton, R.D., Weaver, C.T., Artis, D. & Pear, W.S. Notch simultaneously orchestrates multiple helper T cell programs independently of cytokine signals. *Immunity* **39**, 148-159 (2013).
462. Tu, L., Fang, T.C., Artis, D., Shestova, O., Pross, S.E., Maillard, I. & Pear, W.S. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* **202**, 1037-1042 (2005).
463. 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).
464. Backer, R.A., Helbig, C., Gentek, R., Kent, A., Laidlaw, B.J., Dominguez, C.X., de Souza, Y.S., van Trierum, S.E., van Beek, R., Rimmelzwaan, G.F., Ten Brinke, A., Willemsen, A.M., van Kampen, A.H., Kaech, S.M., Blander, J.M., van Gisbergen, K. & Amsen, D. A central role for Notch in effector CD8 T cell differentiation. *Nat Immunol* (2014).
465. Shaywitz, A.J. & Greenberg, M.E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* **68**, 821-861 (1999).
466. Sugimoto, K., Maekawa, Y., Kitamura, A., Nishida, J., Koyanagi, A., Yagita, H., Kojima, H., Chiba, S., Shimada, M. & Yasutomo, K. Notch2 signaling is required for potent antitumor immunity in vivo. *J Immunol* **184**, 4673-4678 (2010).
467. Kuijk, L.M., Verstege, M.I., Rekers, N.V., Bruijns, S.C., Hooijberg, E., Roep, B.O., de Gruijl, T.D., van Kooyk, Y. & Unger, W.W. Notch controls generation and function of human effector CD8+ T cells. *Blood* **121**, 2638-2646 (2013).
468. Li, Y., Wu, S., Pu, J., Huang, X. & Zhang, P. Dengue Virus Upregulates Expression of Notch Ligands Dll1 and Dll4 Through IFN-beta Signaling Pathway. *Immunology* (2014).
469. Auderset, F., Schuster, S., Fasnacht, N., Coutaz, M., Charmoy, M., Koch, U., Favre, S., Wilson, A., Trottein, F., Alexander, J., Luther, S.A., MacDonald, H.R., Radtke, F. & Tacchini-Cottier, F. Notch signaling regulates follicular helper T cell differentiation. *J Immunol* **191**, 2344-2350 (2013).
470. Fasnacht, N., Huang, H.Y., Koch, U., Favre, S., Auderset, F., Chai, Q., Onder, L., Kallert, S., Pinschewer, D.D., MacDonald, H.R., Tacchini-Cottier, F., Ludewig, B., Luther, S.A. & Radtke, F. Specific fibroblastic niches in secondary lymphoid organs orchestrate distinct Notch-regulated immune responses. *J Exp Med* **211**, 2265-2279 (2014).
471. Williams, M.A., Holmes, B.J., Sun, J.C. & Bevan, M.J. Developing and maintaining protective CD8+ memory T cells. *Immunol Rev* **211**, 146-153 (2006).
472. Kemp, R.A. & Ronchese, F. Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol* **167**, 6497-6502 (2001).

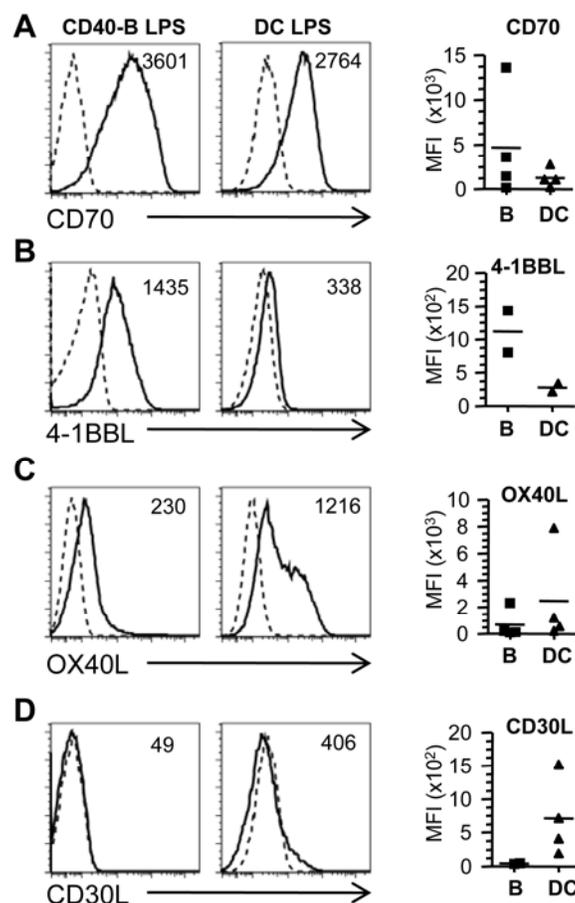
473. Deeths, M.J. & Mescher, M.F. B7-1-dependent co-stimulation results in qualitatively and quantitatively different responses by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* **27**, 598-608 (1997).
474. Kumar, H., Koyama, S., Ishii, K.J., Kawai, T. & Akira, S. Cutting edge: cooperation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *J Immunol* **180**, 683-687 (2008).
475. Castellino, F. & Germain, R.N. Chemokine-guided CD4<sup>+</sup> T cell help enhances generation of IL-6RalphahighIL-7Ralpha high prememory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **178**, 778-787 (2007).
476. Whitmire, J.K., Eam, B., Benning, N. & Whitton, J.L. Direct interferon-gamma signaling dramatically enhances CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell memory. *J Immunol* **179**, 1190-1197 (2007).
477. Whitmire, J.K., Tan, J.T. & Whitton, J.L. Interferon-gamma acts directly on CD8<sup>+</sup> T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med* **201**, 1053-1059 (2005).
478. Badovinac, V.P., Tvinnereim, A.R. & Harty, J.T. Regulation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* **290**, 1354-1358 (2000).
479. Tewari, K., Nakayama, Y. & Suresh, M. Role of direct effects of IFN-gamma on T cells in the regulation of CD8 T cell homeostasis. *J Immunol* **179**, 2115-2125 (2007).
480. Haring, J.S., Corbin, G.A. & Harty, J.T. Dynamic regulation of IFN-gamma signaling in antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells responding to infection. *J Immunol* **174**, 6791-6802 (2005).
481. Bao, Y., Liu, X., Han, C., Xu, S., Xie, B., Zhang, Q., Gu, Y., Hou, J., Qian, L., Qian, C., Han, H. & Cao, X. Identification of IFN-gamma-producing innate B cells. *Cell Res* **24**, 161-176 (2014).
482. Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J. & Koyasu, S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* **22**, 556-560 (2001).
483. Novy, P., Huang, X., Leonard, W.J. & Yang, Y. Intrinsic IL-21 signaling is critical for CD8 T cell survival and memory formation in response to vaccinia viral infection. *J Immunol* **186**, 2729-2738 (2011).
484. Yi, J.S., Ingram, J.T. & Zajac, A.J. IL-21 deficiency influences CD8 T cell quality and recall responses following an acute viral infection. *J Immunol* **185**, 4835-4845 (2010).
485. Liu, S.M. & King, C. IL-21-producing Th cells in immunity and autoimmunity. *J Immunol* **191**, 3501-3506 (2013).
486. Livingstone, A.M. & Kuhn, M. Dendritic cells need T cell help to prime cytotoxic T cell responses to strong antigens. *Eur J Immunol* **29**, 2826-2834 (1999).
487. Foulds, K.E., Rotte, M.J. & Seder, R.A. IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **177**, 2565-2574 (2006).
488. Mion, F., Tonon, S., Toffoletto, B., Cesselli, D., Pucillo, C.E. & Vitale, G. IL-10 production by B cells is differentially regulated by immune-mediated and infectious stimuli and requires p38 activation. *Mol Immunol* (2014).
489. Benvenuti, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Grandjean, I., Jancic, C., Hivroz, C., Trautmann, A., Lantz, O. & Amigorena, S. Dendritic cell maturation controls

- adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol* **172**, 292-301 (2004).
490. Kotredes, K.P. & Gamero, A.M. Interferons as inducers of apoptosis in malignant cells. *J Interferon Cytokine Res* **33**, 162-170 (2013).
491. Dougan, M. & Dranoff, G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* **27**, 83-117 (2009).
492. Cheng, Y.S. & Xu, F. Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biol Ther* **10**, 1219-1223 (2010).
493. Sabbatini, P., Tsuji, T., Ferran, L., Ritter, E., Sedrak, C., Tuballes, K., Jungbluth, A.A., Ritter, G., Aghajanian, C., Bell-McGuinn, K., Hensley, M.L., Konner, J., Tew, W., Spriggs, D.R., Hoffman, E.W., Venhaus, R., Pan, L., Salazar, A.M., Diefenbach, C.M., Old, L.J. & Gnjjatic, S. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* **18**, 6497-6508 (2012).
494. Romero, P., Speiser, D.E. & Rufer, N. Deciphering the unusual HLA-A2/Melan-A/MART-1-specific TCR repertoire in humans. *Eur J Immunol* (2014).
495. Wierecky, J., Muller, M.R., Wirths, S., Halder-Oehler, E., Dorfel, D., Schmidt, S.M., Hantschel, M., Brugger, W., Schroder, S., Horger, M.S., Kanz, L. & Brossart, P. Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res* **66**, 5910-5918 (2006).
496. Ribas, A., Comin-Anduix, B., Chmielowski, B., Jalil, J., de la Rocha, P., McCannel, T.A., Ochoa, M.T., Seja, E., Villanueva, A., Oseguera, D.K., Straatsma, B.R., Cochran, A.J., Glaspy, J.A., Hui, L., Marincola, F.M., Wang, E., Economou, J.S. & Gomez-Navarro, J. Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* **15**, 6267-6276 (2009).
497. Vasaturo, A., Di Blasio, S., Peeters, D.G., de Koning, C.C., de Vries, J.M., Figdor, C.G. & Hato, S.V. Clinical Implications of Co-Inhibitory Molecule Expression in the Tumor Microenvironment for DC Vaccination: A Game of Stop and Go. *Front Immunol* **4**, 417 (2013).
498. Kimura, T., McKolanis, J.R., Dzubinski, L.A., Islam, K., Potter, D.M., Salazar, A.M., Schoen, R.E. & Finn, O.J. MUC1 vaccine for individuals with advanced adenoma of the colon: a cancer immunoprevention feasibility study. *Cancer Prev Res (Phila)* **6**, 18-26 (2013).
499. Roti, G. & Stegmaier, K. New Approaches to Target T-ALL. *Front Oncol* **4**, 170 (2014).
500. Dohner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Buchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Lowenberg, B. & Bloomfield, C.D. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115**, 453-474 (2010).
501. Pui, C.H., Carroll, W.L., Meshinchi, S. & Arceci, R.J. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* **29**, 551-565 (2011).

502. Neron, S., Nadeau, P.J., Darveau, A. & Leblanc, J.F. Tuning of CD40-CD154 interactions in human B-lymphocyte activation: a broad array of in vitro models for a complex in vivo situation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **59**, 25-40 (2011).
503. Naito, M., Hainz, U., Burkhardt, U.E., Fu, B., Aho, D., Stevenson, K.E., Rajasagi, M., Zhu, B., Alonso, A., Witten, E., Matsuoka, K., Neuber, D., Duke-Cohan, J.S., Wu, C.J. & Freeman, G.J. CD40L-Tri, a novel formulation of recombinant human CD40L that effectively activates B cells. *Cancer Immunol Immunother* **62**, 347-357 (2013).
504. Neron, S., Roy, A., Dumont, N. & Dussault, N. Effective in vitro expansion of CD40-activated human B lymphocytes in a defined bovine protein-free medium. *J Immunol Methods* **371**, 61-69 (2011).
505. Wang, H., Zang, C., Taing, L., Arnett, K.L., Wong, Y.J., Pear, W.S., Blacklow, S.C., Liu, X.S. & Aster, J.C. NOTCH1-RBPJ complexes drive target gene expression through dynamic interactions with superenhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 705-710 (2014).
506. Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J. & Kouzarides, T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**, 407-411 (2002).
507. Kim, H.A., Koo, B.K., Cho, J.H., Kim, Y.Y., Seong, J., Chang, H.J., Oh, Y.M., Stange, D.E., Park, J.G., Hwang, D. & Kong, Y.Y. Notch1 counteracts WNT/beta-catenin signaling through chromatin modification in colorectal cancer. *J Clin Invest* **122**, 3248-3259 (2012).
508. Cuddapah, S., Jothi, R., Schones, D.E., Roh, T.Y., Cui, K. & Zhao, K. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res* **19**, 24-32 (2009).
509. Socie, G. & Blazar, B.R. Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood* **114**, 4327-4336 (2009).
510. Blazar, B.R., Murphy, W.J. & Abedi, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* **12**, 443-458 (2012).
511. Adler, S.H., Chiffoleau, E., Xu, L., Dalton, N.M., Burg, J.M., Wells, A.D., Wolfe, M.S., Turka, L.A. & Pear, W.S. Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *J Immunol* **171**, 2896-2903 (2003).
512. Geimer Le Lay, A.S., Oravec, A., Mastio, J., Jung, C., Marchal, P., Ebel, C., Dembele, D., Jost, B., Le Gras, S., Thibault, C., Borggreffe, T., Kastner, P. & Chan, S. The tumor suppressor Ikaros shapes the repertoire of notch target genes in T cells. *Sci Signal* **7**, ra28 (2014).
513. Dudley, D.D., Wang, H.C. & Sun, X.H. Hes1 potentiates T cell lymphomagenesis by up-regulating a subset of notch target genes. *PLoS One* **4**, e6678 (2009).
514. Weng, A.P., Millholland, J.M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M.L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Tobias, J., Li, Y., Wolfe, M.S., Shachaf, C., Felsher, D., Blacklow, S.C., Pear, W.S. & Aster, J.C. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* **20**, 2096-2109 (2006).

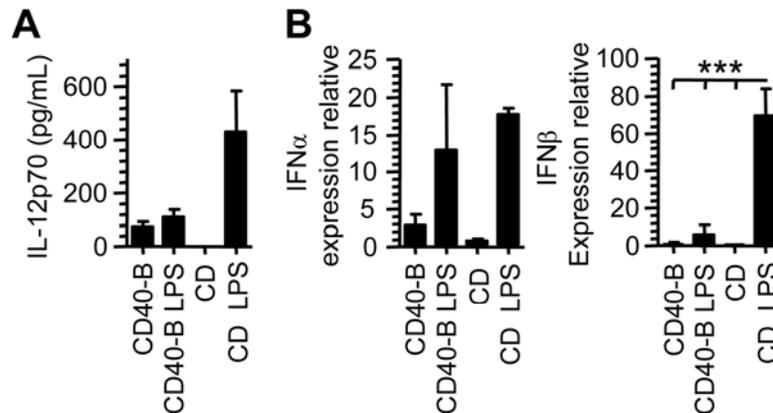
515. White, D.W. & Harty, J.T. Perforin-deficient CD8+ T cells provide immunity to *Listeria monocytogenes* by a mechanism that is independent of CD95 and IFN-gamma but requires TNF-alpha. *J Immunol* **160**, 898-905 (1998).
516. White, D.W., Badovinac, V.P., Kollias, G. & Harty, J.T. Cutting edge: antilisterial activity of CD8+ T cells derived from TNF-deficient and TNF/perforin double-deficient mice. *J Immunol* **165**, 5-9 (2000).
517. Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A. & Strober, W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* **18**, 415-428 (2003).
518. O'Brien, S., Thomas, R.M., Wertheim, G.B., Zhang, F., Shen, H. & Wells, A.D. Ikaros imposes a barrier to CD8+ T cell differentiation by restricting autocrine IL-2 production. *J Immunol* **192**, 5118-5129 (2014).
519. Clambey, E.T., Collins, B., Young, M.H., Eberlein, J., David, A., Kappler, J.W. & Marrack, P. 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).
520. Lobry, C., Oh, P., Mansour, M.R., Look, A.T. & Aifantis, I. Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *Blood* **123**, 2451-2459 (2014).
521. Andersson, E.R. & Lendahl, U. Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet? *Nat Rev Drug Discov* **13**, 357-378 (2014).

## Annexe 1: Expression des molécules de costimulation de la famille des récepteurs TNF par les CD40-B et les CD



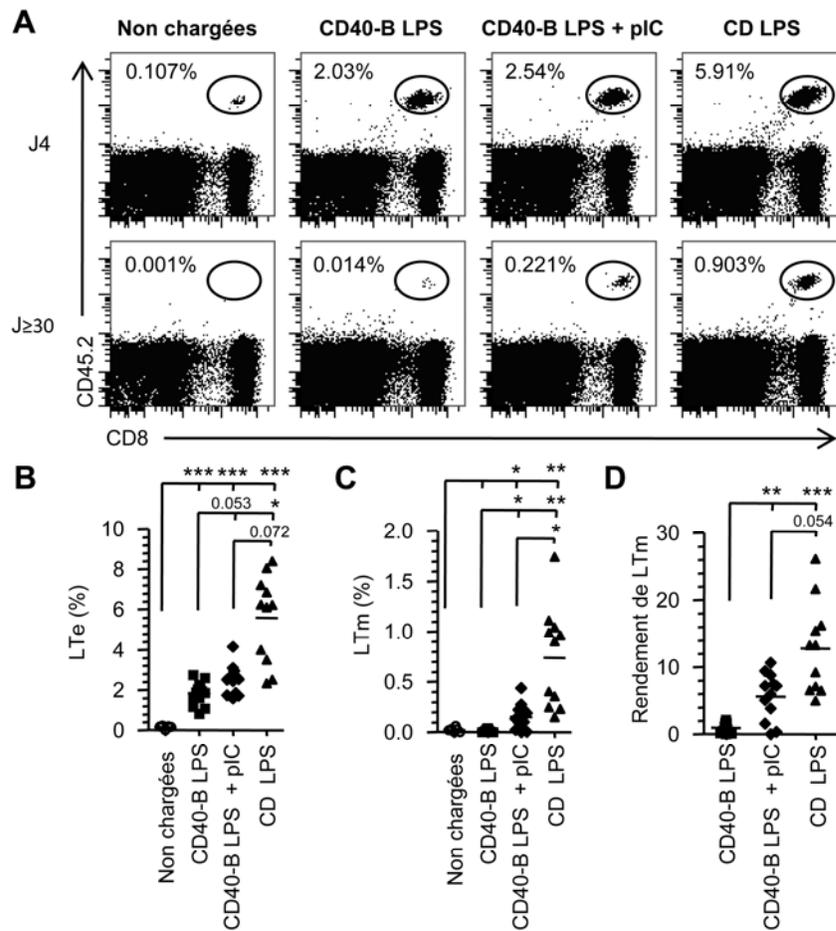
Les CD40-B expriment des molécules de costimulation de la famille des récepteurs TNF. Les CD40-B et les CD ont été cultivés puis maturés avec du LPS. Des marquages extracellulaires contre le CD70 (A), le 4-1BBL (B), le OX40L (C) et le CD30L (D) ont été réalisés. Pour chaque molécule, un marquage représentatif est montré pour les CD40-B et les CD. Le trait plein représente le marquage alors que le trait pointillé représente le FMO (*fluorescence minus one*). Le MFI (*mean fluorescence intensity*) pour chaque marquage est inscrit sur chacun des histogrammes.

## Annexe 2: Les CD40-B et les CD produisent différentes cytokines



**Les CD40-B et les CD produisent différentes cytokines.** (A) Les surnageants provenant de culture de CD40-B ou de CD ont été récoltés et leur concentration en IL-12p70 ont été déterminés par ELISA. La production d'IL-12p70 des CD40-B et des CD non maturés de même que des CD40-B et des CD maturés au LPS est montrée. Les données proviennent de 4 expériences indépendantes. (B) L'expression relative de l'IFN $\alpha$  et de l'IFN $\beta$  par les CD40-B et les CD matures ou non avec le LPS a été déterminée par qRT-PCR. Les données proviennent de 3 expériences indépendantes. Statistique : Anova suivi du post-test Games-Howell \*\*\* p $\leq$ 0.001

## Annexe 3: L'ajout d'inflammation au moment de l'immunisation avec les CD40-B augmente la generation de LTm CD8<sup>+</sup>



L'ajout d'inflammation au moment de l'immunisation avec les CD40-B augmente la generation de LT mémoire.  $10^6$  LT OT-1 T femelles ( $CD8^+CD45.2^+$ ) ont été transférées dans des souris congénique B6SJL femelles ( $CD45.1^+$ ). Deux jours plus tard, ces souris ont été immunisées avec  $2 \times 10^6$  CD40-B cells ou CD maturés au LPS et chargés avec le peptide OVA. Des CD40-B ou des CD non chargés ont été utilisé comme contrôle. Au moment de l'immunisation avec les CD40-B, du poly I:C a été injecté i.p. Les réponses effectrices (jour 4 post-immunisation) et mémoires (J<sub>≥30</sub> post-immunisation) ont été mesurées par chirurgie des

ganglions chez une même souris. (A) Des graphiques représentatifs de la réponse effectrice et mémoire sont montrés pour chacune des conditions. Le pourcentage de LTe ou de LTm est inscrit dans chacun des graphiques. (B-D) Les graphiques montrent des compilations des pourcentages de LTe (B), des pourcentages de LTm (C) et des rendements de LTm (D). Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes avec 2-4 souris par groupes. Statistiques : Anova suivi du post-test Games-Howell. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

## **Annexe 4: IL-6 production by dendritic cells is dispensable for CD8<sup>+</sup> memory T-cell generation**

Daudelin J-F., Mathieu M., Boulet S. et Labrecque N.

Publié dans le Biomed Res Int, doi :10.1155/2013/126189 (2013)

## Research Article

# IL-6 Production by Dendritic Cells Is Dispensable for CD8<sup>+</sup> Memory T-Cell Generation

Jean-François Daudelin,<sup>1</sup> Mélissa Mathieu,<sup>1,2</sup> Salix Boulet,<sup>1</sup> and Nathalie Labrecque<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> *Maisonmeuve-Rosemont Hospital Research Center, University of Montreal, 5415 Boulevard de l'Assomption, Montréal, QC, Canada H1T 2M4*

<sup>2</sup> *Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7*

<sup>3</sup> *Department of Medicine, University of Montreal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7*

Correspondence should be addressed to Nathalie Labrecque; [REDACTED]

Received 18 May 2012; Accepted 19 June 2012

Academic Editor: Zhengguo Xiao

Copyright © 2013 Jean-François Daudelin et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Following activation, naïve CD8<sup>+</sup> T cells will differentiate into effectors that differ in their ability to survive: some will persist as memory cells while the majority will die by apoptosis. Signals given by antigen-presenting cells (APCs) at the time of priming modulate this differential outcome. We have recently shown that, in opposition to dendritic cell (DC), CD40-activated B-(CD40-B) cell vaccination fails to efficiently produce CD8<sup>+</sup> memory T cells. Understanding why CD40-B-cell vaccination does not lead to the generation of functional long-lived memory cells is essential to define the signals that should be provided to naïve T cells by APCs. Here we show that CD40-B cells produce very low amount of IL-6 when compared to DCs. However, supplementation with IL-6 during CD40-B-cell vaccination did not improve memory generation. Furthermore, IL-6-deficient DCs maintained the capacity to promote the formation of functional CD8<sup>+</sup> effectors and memory cells. Our results suggest that in APC vaccination models, IL-6 provided by the APCs is dispensable for proper CD8<sup>+</sup> T-cell memory generation.

## 1. Introduction

The recognition of a foreign antigen (Ag) presented by specialized Ag-presenting cells (APCs) in lymphoid organs by naïve CD8<sup>+</sup> T cells leads to their activation, differentiation, and proliferation. This is accompanied by changes in migration properties and gain of effector functions to control the infection. After elimination of the pathogen, most (90–95%) of the activated CD8<sup>+</sup> effector T cells (Te) die during the contraction phase to reset the system for the next challenge. Importantly, a fraction of the Ag-specific Te cells will survive as resting memory T cells (Tm) able to respond quickly to a second Ag encounter.

During acute infection, two subsets of CD8<sup>+</sup> effectors, short-lived effector cells (SLECs; CD127<sup>lo</sup> and KLRG-1<sup>hi</sup>), and memory precursor effector cells (MPECs; CD127<sup>hi</sup> and KLRG-1<sup>lo</sup>) can be identified at the peak of the response [1–6]. Only MPECs, which represent about 10% of the Ag-specific population at the peak of the response, survive and

further differentiate into Tm cells [1–5]. However, a different picture emerged in vaccination strategies using Ag-pulsed APCs [2, 7–11] or Ag plus adjuvant [8, 12]. We and others have shown that CD8<sup>+</sup> T-cell response to immunization with TLR-stimulated DCs follows a different course than response to infection [2, 7–10]. Due to low inflammation, the majority of CD8<sup>+</sup> Te cells acquire an MPEC phenotype at the peak of the response [2, 7–10]. These MPECs are very good effectors endowed with the ability to produce cytokines and kill target cells [10, 11]. Unlike the MPECs that are generated following infection, MPECs obtained following DC vaccination will still undergo a normal contraction phase [7, 8] and thus only a fraction of them will become long-lived Tm cells. Similarly, vaccination with Ag plus adjuvant generates a high proportion of CD127<sup>hi</sup> cells (MPECs) at the peak of the response and only a fraction of them will survive as long-lived CD8<sup>+</sup> Tm cells [8, 12]. Following vaccination with Ag plus adjuvant, it was shown that high level of expression of IL-6 receptor (R)  $\alpha$  chain in combination with high level of

expression of IL-7R $\alpha$  (CD127) better identifies the MPECs that will further differentiate into Tm cells [12]. This suggests that IL-6 signal might contribute to Tm-cell development.

Until recently, little was known about the potential of other APCs, such as B cells, to induce a CD8<sup>+</sup> T-cell response [11, 13–15]. We and others have shown that CD40-activated B (CD40-B) cells can prime a functional CD8<sup>+</sup> T cell response *in vivo* [11, 13–15]. We have shown that as for DC vaccination, all effectors acquire a MPEC phenotype following CD40-B-cell immunization [11]. Furthermore, these MPECs have excellent effector functions as measured by their ability to secrete cytokines, kill target cells *in vivo* and clear a bacterial infection [11]. Although MPECs were generated with CD40-B-cell vaccination, Tm-cell generation was inefficient [11]. Therefore, understanding why CD40-B cell vaccination does not lead to the formation of functional long-lived Tm cells is essential to define the signals that should be provided to naïve T cells by APCs to promote efficient Tm-cell differentiation. The reported high level of expression of IL-6R $\alpha$  by prememory CD8<sup>+</sup> T cells [12] suggests that IL-6 may be one of the missing signal.

IL-6 was first identified as a B-cell proliferation and differentiation factor [16]. Its high affinity receptor is composed of the IL-6R $\alpha$  chain and the common gp30 chain [16]. As many cytokines, IL-6 has pleiotropic action on different cell types of the immune system [16]. Specifically, on CD8<sup>+</sup> T cells, IL-6 was reported to promote the survival of naïve T cells [17–20], to enhance the proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells following TCR triggering [14, 20–23] and to synergize with IL-7 or IL-15 to induce Ag-independent proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells [24]. IL-6 was also shown to contribute to *in vivo* CD8<sup>+</sup> T-cell response. Indeed, maximal *in vivo* CD8<sup>+</sup> T cell proliferation following vaccination with CD40-B cells stimulated via the B cell receptor and TLR7 was dependent on IL-6 production by B cells [14]. Moreover, cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-cell differentiation was dependent on IL-6 induction by adjuvant in vaccination protocol [25]. Finally, the transfer of CD8<sup>+</sup> MPECs into IL-6-deficient hosts severely impaired the generation of long-lived CD8<sup>+</sup> Tm cells [12]. These studies suggest that IL-6 is essential for optimal and complete *in vivo* response of CD8<sup>+</sup> T cells.

The reported influences of IL-6 on CD8<sup>+</sup> T-cell response lead us to investigate whether IL-6 signal from APCs during priming was necessary to promote the formation of CD8<sup>+</sup> Tm cells following APC vaccination. In this paper, we show that CD40-B cells stimulated with LPS produce very low amount of IL-6 when compared to DCs and that supplementation with IL-6 during CD40-B-cell vaccination did not improve their ability to generate CD8<sup>+</sup> Tm cells. Furthermore, vaccination with IL-6-deficient DCs did not impede their ability to promote the formation of functional CD8<sup>+</sup> effectors and memory T cells.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Mice.** B6.SJL and OT-I [26] mice were bred at the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center facility. IL-6 knock-out (KO) (B6.129S2-*Il6*<sup>tm1Kopf/J</sup>) mice [27] were purchased from The Jackson Laboratory. Mice were housed

in a pathogen-free environment and treated in accordance to the Canadian Council on Animal Care guidelines. Our animal protocol (number: 2007-36) was approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center Animal Care Committee.

**2.2. B-Cell and DC Cultures.** For B-cell culture, lymphocytes were isolated on a FICOLL gradient from male B6.SJL spleen followed by a 4 days culture on irradiated fibroblasts stably transfected with the CD40L cDNA (3T3-CD40L) to generate CD40-B cells [28]. Bone-marrow-derived DCs were generated as previously described [8]. The day before harvesting, lipopolysaccharide (LPS) (1  $\mu$ g/mL) was added to DC and CD40-B-cell cultures. The ovalbumin (OVA<sub>257–264</sub>) peptide (SIINFEKL) (Midwest biotech) was loaded overnight on DCs (2  $\mu$ g/mL) and B cells (4  $\mu$ g/mL).

**2.3. Immunization and Analysis of T-Cell Responses.** Two days after adoptive transfer of 10<sup>6</sup> OT-I T cells (CD45.2<sup>+</sup>; from female mice) into female B6.SJL mice (CD45.1<sup>+</sup>), recipients were immunized intravenously (*i.v.*) with 0.5  $\times$  10<sup>6</sup> DCs or 2  $\times$  10<sup>6</sup> DCs (as indicated in the Figure legend) or 2  $\times$  10<sup>6</sup> CD40-B cells from male mice to induce a CD4<sup>+</sup> T-cell response against the male minor histocompatibility antigen HY [29]. Some mice were injected intraperitoneally (*i.p.*) with 500 ng of recombinant mouse IL-6 (R&D Systems). The presence of T<sub>e</sub> (d4 post-immunization) and T<sub>m</sub> (d45 postimmunization) cells was evaluated in the same mouse by sequential removal of superficial lymph nodes as described previously [8]. Functions of T<sub>e</sub> (d4) and T<sub>m</sub> (d60) were analyzed as previously described with minor modifications [8]. Splenocytes were restimulated with 2  $\mu$ g/mL OVA<sub>257–264</sub> peptide in complete RPMI 1640 for 6 h at 37°C. For the last 3 h, 10  $\mu$ g/mL of brefeldin A (Sigma Aldrich) was added. T<sub>e</sub> and T<sub>m</sub> cells were identified by flow cytometry as being CD8<sup>+</sup> and CD45.2<sup>+</sup>.

**2.4. Mouse Surgery.** Lymph node removal by surgery was done as described [30]. Briefly, mice were anesthetised by inhalation of isoflurane (2%, 1L oxygen). Before the surgery, eye ointment was applied to avoid eye dryness and buprenorphine was administered subcutaneously (0.05–0.1 mg/Kg) as an analgesic. To harvest the brachial and the inguinal lymph nodes, a small incision (5 mm) of the skin was made and the lymph nodes were removed using forceps. The incision was closed with one clip (Michel suture clips, 7.5  $\times$  1.75 mm, Harvard Apparatus).

**2.5. Antibodies, Cytometry, and ELISA.** Anti-CD86 (GL-1), -TNF- $\alpha$  (MP6-XT22), and -Bcl-2 (3F11) antibodies were purchased from BD Biosciences. Anti-H-2K<sup>b</sup> (AF6-88.5), -CD45.2 (104), -CD44 (1M7), -CD8 (53-6.7), -CD19 (6D5), -CD11c (N418), -CD80 (16-10A1), -IL-6R $\alpha$  (D7715A7), -CD43 (1B11), -CD62L (MEL-14), and -IL-2 (JES6-5H4) antibodies were purchased from Biolegend. Anti-I-A<sup>b</sup> (28-16-8S) was purchased from Cedarlane. Anti-CD127 (A7R34), -Eomes (Dan11mag), -KLRG1 (2F1), and -granzyme B (16G6) antibodies were purchased from

eBioscience. Anti-Bcl-6 (7D1) antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-CXCR3 (220803) antibody was purchased from R&D Systems. Anti-IFN- $\gamma$  (XMG1.2) antibody was purchased from Life technologies. OVA peptide loading on K<sup>b</sup> MHC was measured by staining with the 25-D1.16 Ab [31] followed by staining with a rat anti-mouse IgG1 (A85-1) antibody from BD Biosciences. Cell surface and intracellular stainings for cytokines were performed as previously described [8, 32]. Bcl-6 and Eomes intracellular stainings were performed with the FoxP3 kit from eBioscience. For Bcl-2 staining, cells were stained for 30 minutes in 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) and washed twice without saponin before cell surface staining. All stainings were analyzed on a BD FACSCanto I system.

For ELISA, B cells and DCs were cultured as described above. Before harvesting, supernatants were collected and ELISA was performed against IL-6 (Biolegend), according to the manufacturer's protocol.

**2.6. Statistical Analysis.** Statistical analyses for differences between groups were performed using Mann Whitney test (two experimental groups) or one-way ANOVA followed by Games-Howell posttest (3 experimental groups or more). Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). All tests were two-sided and  $P < 0.05$  was considered statistically significant. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and NS: non-significant.

### 3. Results and Discussion

**3.1. Expression of IL-6 $\alpha$  by CD8<sup>+</sup> T Cells following Vaccination with APCs.** Our previous work has shown that vaccination with CD40-B cells matured with LPS and loaded with the OVA peptide leads to the formation of functional CD8<sup>+</sup> Te cells but not Tm cells [11]. Although the CD8<sup>+</sup> Te cells generated following CD40-B cell vaccination were enriched for MPECs (CD127<sup>hi</sup> and KLRG1<sup>lo</sup>), they did not survive the contraction phase [11]. Since high level of IL-6 $\alpha$  expression was shown to better identify at the peak of the T-cell response the MPECs that will differentiate into CD8<sup>+</sup> Tm cells [12], we have evaluated if the MPECs generated following CD40-B-cell vaccination express high level of IL-6 $\alpha$ . As shown in Figures 1(a) and 1(b), at the peak of the T-cell response (day 4 in this model) most of the OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te cells express high level of IL-6 $\alpha$ . Furthermore, the CD8<sup>+</sup> Te cells generated following CD40-B-cell vaccination express similar level of IL-6 $\alpha$  than those obtained with DC vaccination (Figures 1(a) and 1(b)), which efficiently generates CD8<sup>+</sup> Tm cells. These results indicate that MPECs generated following CD40-B cell vaccination should be able to respond to IL-6 during the contraction phase of the response. The fact that CD40-B-cell vaccination generates MPECs expressing high levels of both IL-7 $\alpha$  (Supplemental Figure 1 and ref [11] see Supplementary Materials available online at doi:10.1155/2012/126189.) and IL-6 $\alpha$  suggests that these MPECs should received the proper survival signals allowing them to persist during the contraction phase and further differentiate into Tm cells. However, our previous

work has shown that the MPECs obtained with CD40-B cell vaccination rapidly contract during the T cell response and do not differentiate into CD8<sup>+</sup> Tm cells [11]. This suggests that other survival and differentiation factors might be implicated for the differentiation of MPECs into CD8<sup>+</sup> Tm cells.

**3.2. IL-6 Supplementation Does Not Enhance CD8<sup>+</sup> Tm-Cell Generation following CD40-B-Cell Vaccination.** The reported role of IL-6 in CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation and differentiation [12, 14, 20–23, 25] leads us to evaluate if CD40-B cells were providing IL-6 during the priming of naïve CD8<sup>+</sup> T cells. IL-6 was quantified in the supernatants obtained at the end of CD40-B-cell and DC cultures. As shown in Figure 1(c), CD40-B cells produce around 5-fold less IL-6 than DCs. This reduced production of IL-6 might be responsible for the lack of CD8<sup>+</sup> Tm-cell generation with CD40-B-cell vaccination.

To test whether the decreased IL-6 production by CD40-B cells was responsible for their inability to induce CD8<sup>+</sup> Tm-cell development, we injected IL-6 at the time of CD40-B-cell immunization. The dose of IL-6 was chosen based on previous publications where IL-6 injection had an effect on T-cell response [33, 34]. As shown in Figure 2, the administration of IL-6 (500 ng) i.p. at the time of OT-I naïve CD8<sup>+</sup> T-cell priming by CD40-B cells did not enhance the generation of CD8<sup>+</sup> Te and Tm cells. Furthermore, the effectors generated with or without IL-6 supplementation had a similar phenotype as determined by the expression of CD44, CD127, and Bcl-2 (Supplemental Figure 1).

**3.3. IL-6 Is Dispensable for the Generation of CD8<sup>+</sup> Tm Cells following Vaccination with DCs.** Since it was possible that the amount administered and the route of injection did not lead to a sufficient IL-6 signals in naïve OT-I T cells, we tested whether IL-6 production by DCs was necessary for the generation of long-lived CD8<sup>+</sup> Tm cells. To do so, we generated DCs from the bone marrow of IL-6-deficient mice. Before using these IL-6-deficient DCs in our vaccination protocol, we confirmed that they had a similar phenotype than wild-type DCs following LPS maturation (Supplemental Figure 2). Furthermore, IL-6-deficient DCs were equally loaded with the OVA peptide as WT DCs (Supplemental Figure 2). We then compared the OVA-specific CD8<sup>+</sup> T-cell response following vaccination with IL-6-deficient or -sufficient DCs. As shown in Figure 3, a similar frequency and number (not shown) of CD8<sup>+</sup> Te and Tm cells were generated following vaccination with WT or IL-6 KO DCs. Furthermore, the yield of CD8<sup>+</sup> Tm cells (% of Te cells that developed into Tm cells) was similar in both groups (Figure 3(b)). These results show that IL-6 production by APCs at the priming of naïve CD8<sup>+</sup> T cells is not necessary for the generation of CD8<sup>+</sup> Te and Tm cells. Several reports have shown that IL-6 can enhance CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation *in vitro* [14, 20–24] and *in vivo* [14]. However, the use of IL-6-deficient DCs did not reduce the number of CD8<sup>+</sup> Te cells generated. Thus, it is possible that the basal level of IL-6 present in the host is sufficient for optimal T-cell proliferation or that IL-6 production by DCs is not necessary for maximal

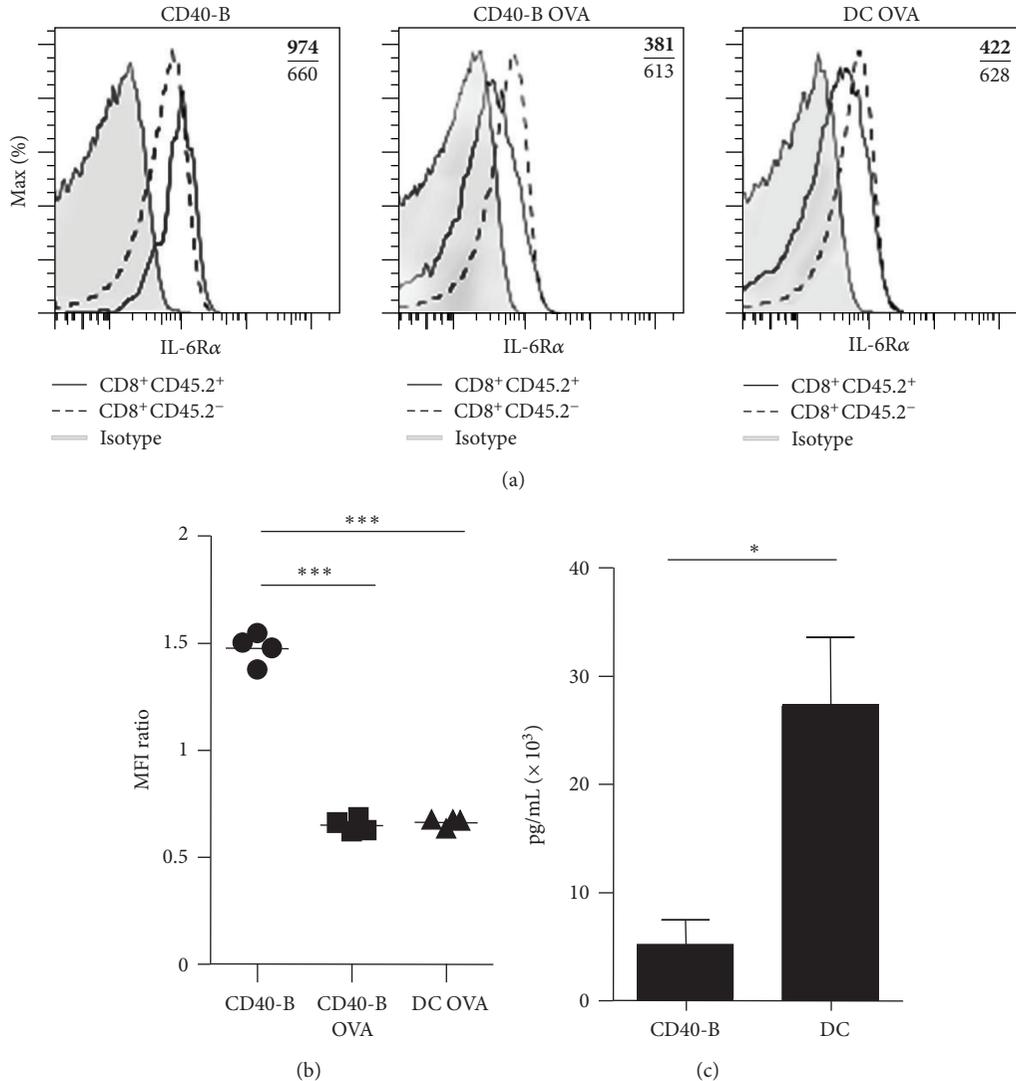


FIGURE 1: CD40-B cell and DC immunizations generate effectors expressing similar levels of IL-6Rα. (a) Expression of IL-6Rα by OVA-specific Te cells at the peak of the T cell response (day 4).  $10^6$  female OT-I T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) were adoptively transferred into congenic B6.SJL female mice (CD45.1<sup>+</sup>) followed by immunization two days later with  $2 \times 10^6$  LPS-matured unloaded CD40-B cells (CD40-B), LPS-matured CD40-B cells loaded with the OVA peptide (CD40-B OVA) or LPS-matured DCs loaded with the OVA peptide (DC OVA). The representative overlay histograms show expression of IL-6Rα by OVA-specific Te cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) and endogenous T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>). The upper bold number indicates the mean fluorescence intensity (MFI) of OVA-specific Te cells while the lower number is for the endogenous CD8<sup>+</sup> T cells. (b) Quantification of IL-6Rα expression by effectors. The MFI of IL-6Rα expression by effector CD8<sup>+</sup> T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) was normalized to the MFI of the recipient CD8<sup>+</sup> T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>). Each dot represents one mouse. (c) CD40-B cells produce less IL-6 than DCs. Supernatants from CD40-B LPS or DC LPS culture were used to measure IL-6 secretion by ELISA. Mean ± SEM is shown for 3 independent experiments. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells. Moreover, IL-6 production by CD40-B cells stimulated via the BCR and TLR7 was reported to be necessary for the maximal expansion of Ag-specific CD8<sup>+</sup> T cells following vaccination [14]. Thus, our results with IL-6 KO DCs suggest that different APC types might produce different cytokines to promote the full expansion of CD8<sup>+</sup> T cells. However, in our hands supplementation of IL-6 during CD40-B-cell vaccination did not increase T-cell expansion (Figure 2). This might be explained by the use of different stimuli (BCR + TLR7 ligand versus LPS) to mature

the CD40B cells that may lead to production of different cytokines.

**3.4. Vaccination with IL-6-Deficient DCs Generates Functional CD8<sup>+</sup> Te and Tm Cells.** Since IL-6 was shown to influence cytotoxic T-cell differentiation [25], we have carefully evaluated the phenotype and functions of the OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te and Tm cells generated following vaccination with WT or IL-6 KO DCs. As shown in Figure 4, both types of effectors produce similar amounts of IFN-γ, TNF-α, IL-2, and

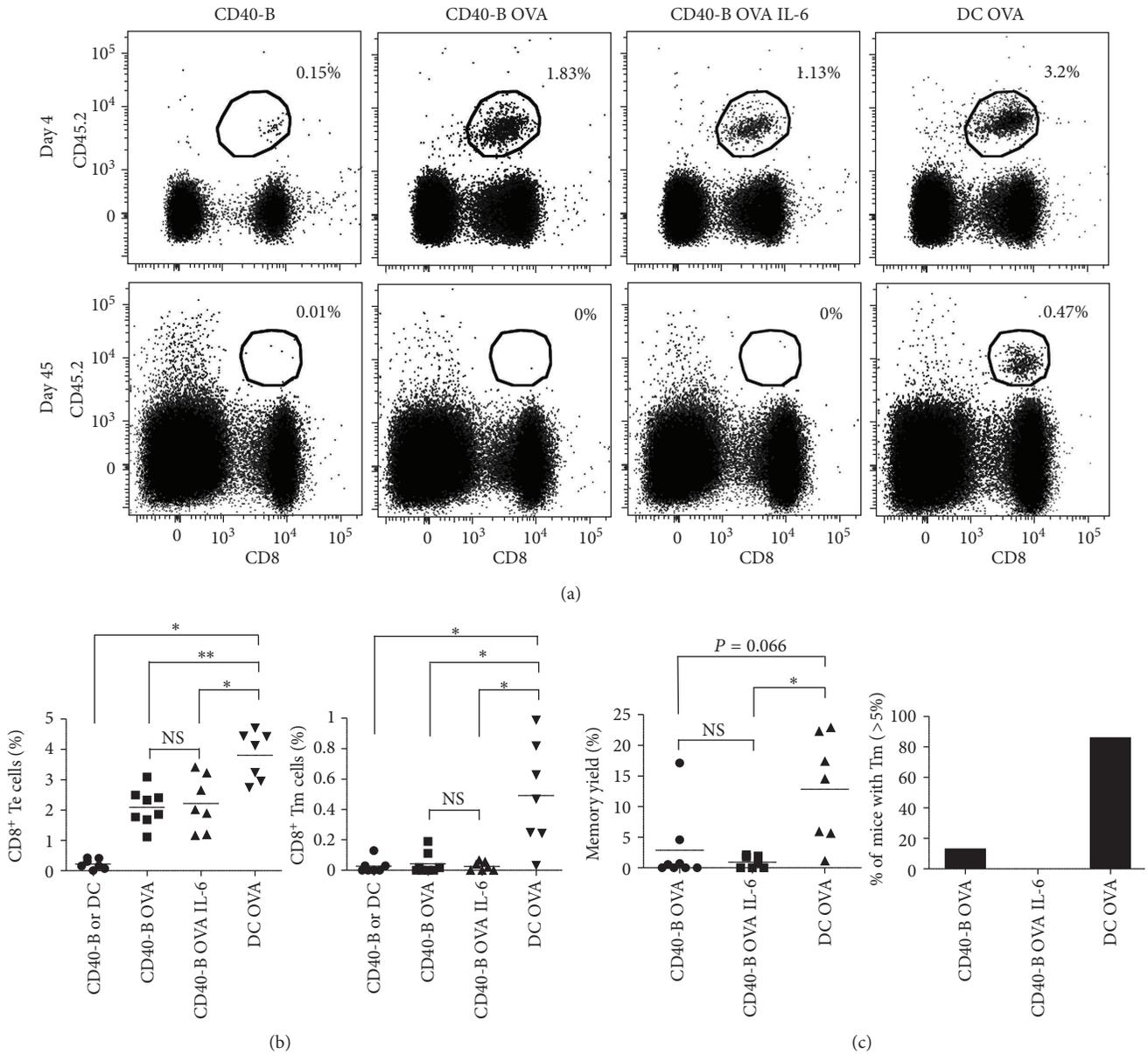
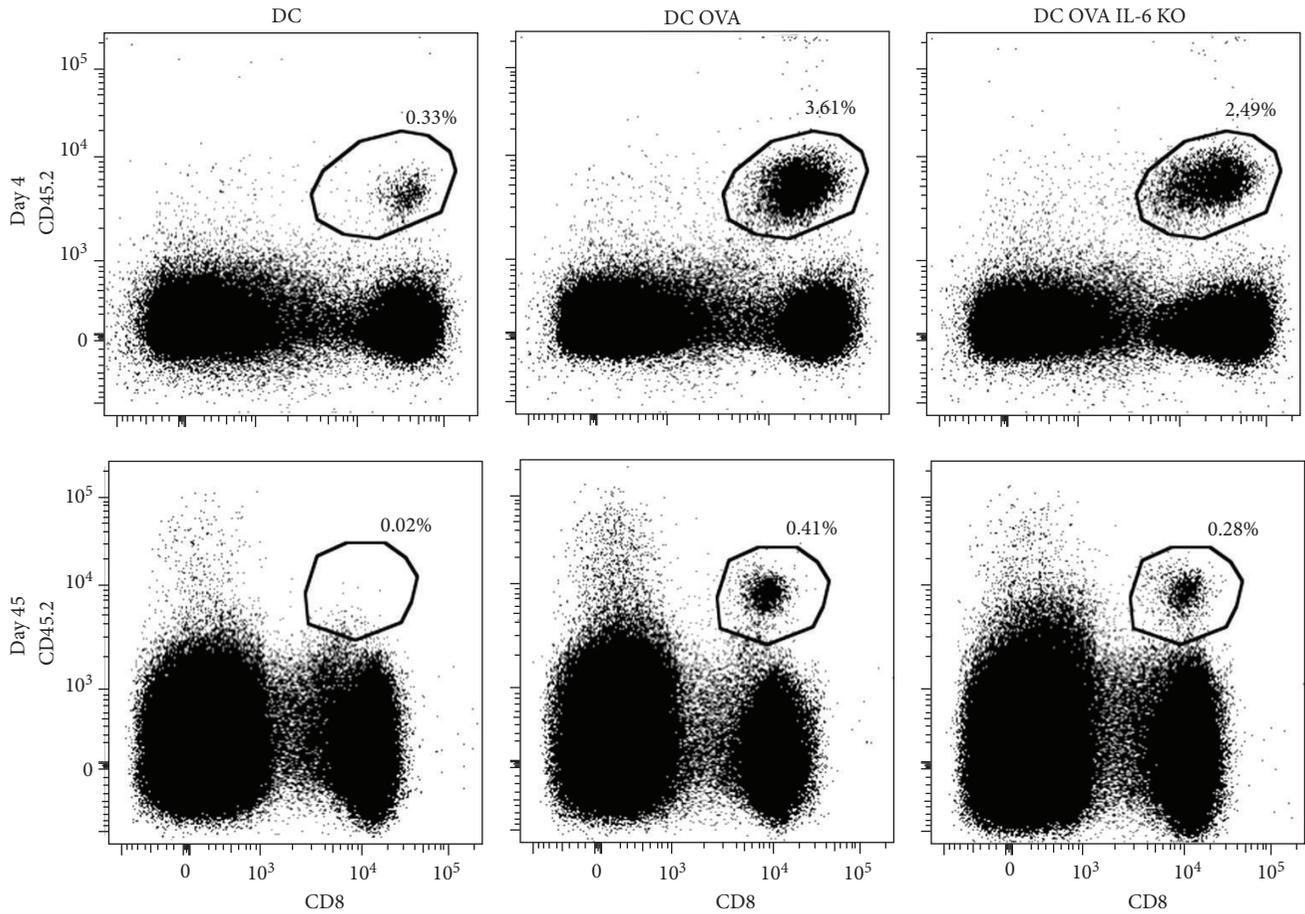


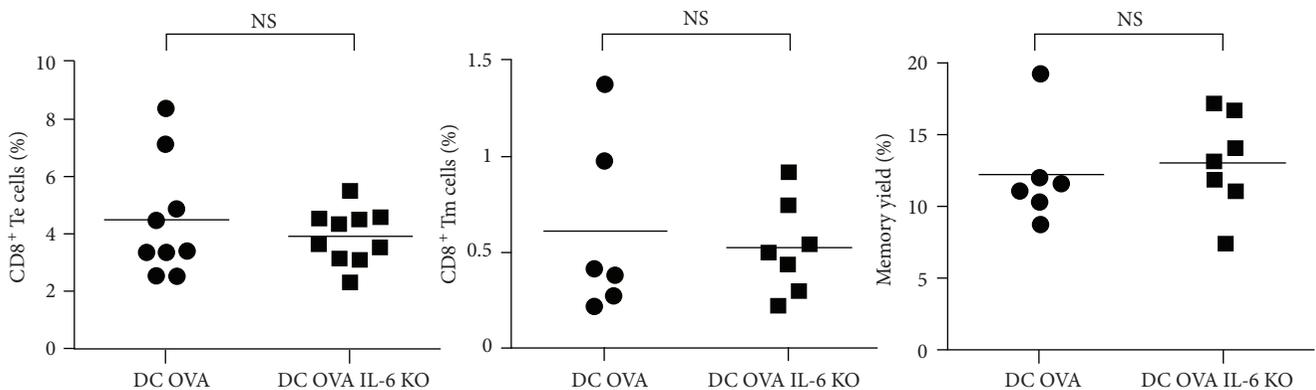
FIGURE 2: IL-6 supplementation does not increase the generation of CD8<sup>+</sup> memory T cells following CD40-B cell immunization. (a) CD40-B cell vaccination with or without IL-6 co-injection generates Te cells but not Tm cells. Immunizations were performed as in Figure 1. One group of CD40-B cell vaccinated mice received recombinant IL-6 (500 ng, i.p.). OVA-specific T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) were analyzed in the same mouse by surgical removal of superficial lymph nodes at day 4 (effector) and day 45 (memory) post-immunization. The percentage of Te and Tm cells generated are indicated on each dot plot. (b) Percentage of CD8<sup>+</sup> Te (day 4, left panel) and Tm (day 45, right panel) cells in one lymph node is shown. (c) Efficiency of CD8<sup>+</sup> Tm cell generation. Left panel shows the yield of Tm cell formation calculated as the percentage of Te cells that develop into Tm cells while the right panel shows the percentage of mice that generates more than 5% of CD8<sup>+</sup> Tm cells for the different immunization conditions. The results are from three independent experiments. \**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01.

granzyme B indicating that IL-6 signals from APCs at priming are not necessary for the acquisition of effector functions. Moreover, the OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te cells obtained with WT and IL-6 KO DCs express similar levels of CD44, CD127, 1B11, CD62L, CXCR3, and KLRG1 (Supplemental Figure 3). Furthermore, the OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te cells obtained with WT or IL-6 KO DCs have both undergone the proper differentiation program since they express similar level of

Eomes and Bcl-6 (Figure 5), two key transcription factors controlling the differentiation of CD8<sup>+</sup> Tm cells [35–40]. It is interesting to note that Bcl-6 expression is induced normally in CD8<sup>+</sup> Te cells that have encountered the Ag on IL-6 KO DCs since IL-6 signals have been shown to influence the differentiation of follicular helper CD4<sup>+</sup> T cells by modulating the expression level of Bcl-6 [41–43]. This suggests that the regulation of Bcl-6 expression is different in



(a)



(b)

FIGURE 3: Normal generation of CD8<sup>+</sup> effector and memory T cells following vaccination with IL-6-deficient DCs. (a) Vaccination with WT or IL-6 KO DCs generates OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te cells and Tm cells. 10<sup>6</sup> female OT-I T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) were adoptively transferred into congenic B6.SJL female mice (CD45.1<sup>+</sup>) followed by immunization two days later with 0.5 × 10<sup>6</sup> WT or IL-6 KO DCs, matured with LPS and loaded or not with OVA peptide. Te and Tm cells were identified as CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup> by flow cytometry. The percentage of Te and Tm cells generated are indicated on each dot plot. (b) Quantification of CD8<sup>+</sup> T cell response. Percentage of CD8<sup>+</sup> Te (day 4, left panel) and Tm (day 45, middle panel) cells in one lymph node is shown. The yield of Tm cell formation was calculated as the percentage of Te cells that develop into Tm cells (right panel). The results are from two independent experiments with at least three mice per group. NS, non-significant.

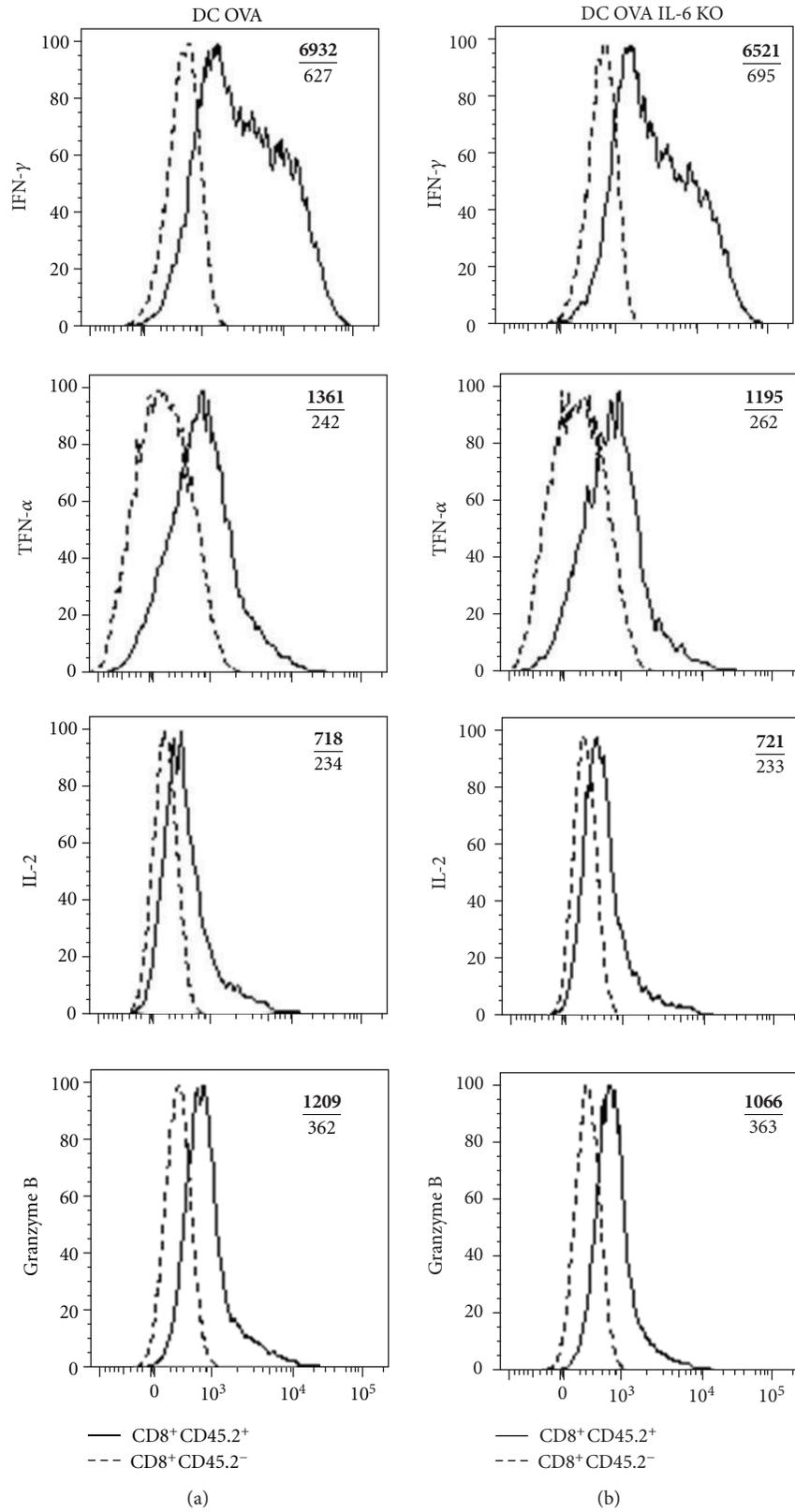
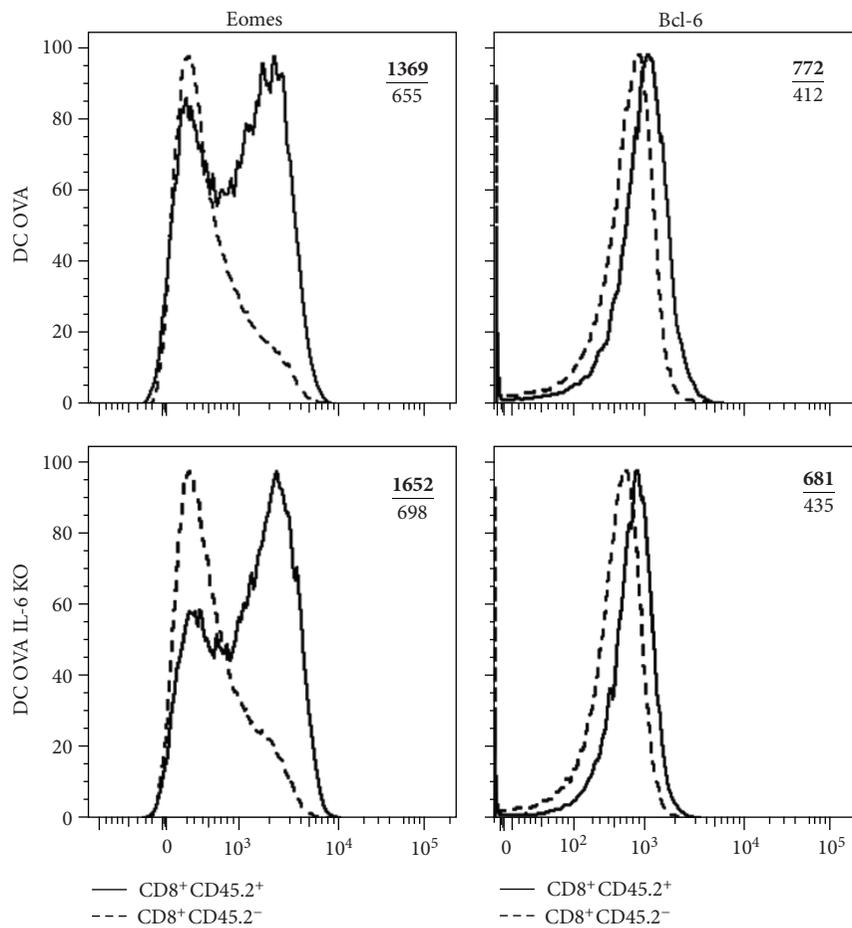
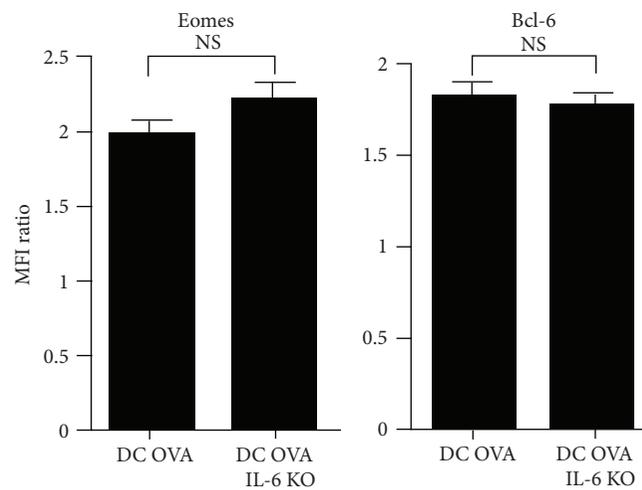


FIGURE 4: Generation of functional OVA-specific CD8<sup>+</sup> effector T cells following immunization with IL-6-deficient DCs. Mice were immunized as in Figure 3 and effector molecules production was analyzed following a short *in vitro* stimulation with the OVA peptide. The overlays show production of the different effector molecules by OVA-specific T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) compared to endogenous T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>) at day 4 post-immunization with WT (left) or IL-6 KO (right) DCs. The MFI of effector molecule expression by OVA-specific CD8<sup>+</sup> effectors (upper bold number) and endogenous CD8<sup>+</sup> T cells (lower number) are indicated on each overlay.

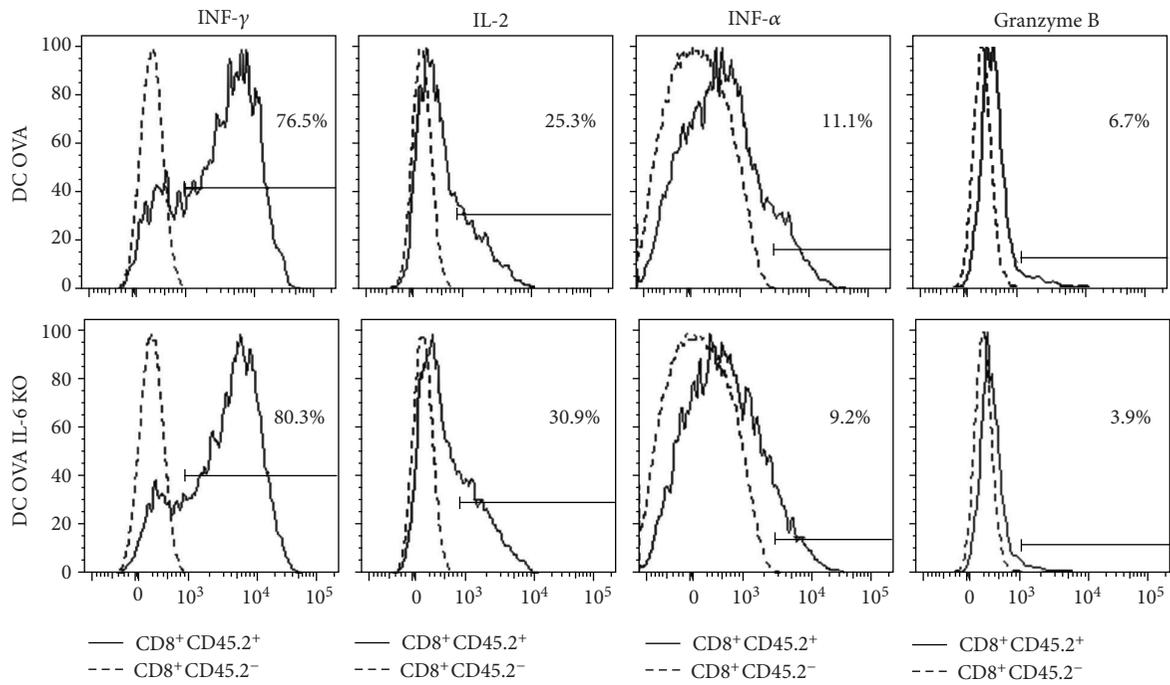


(a)

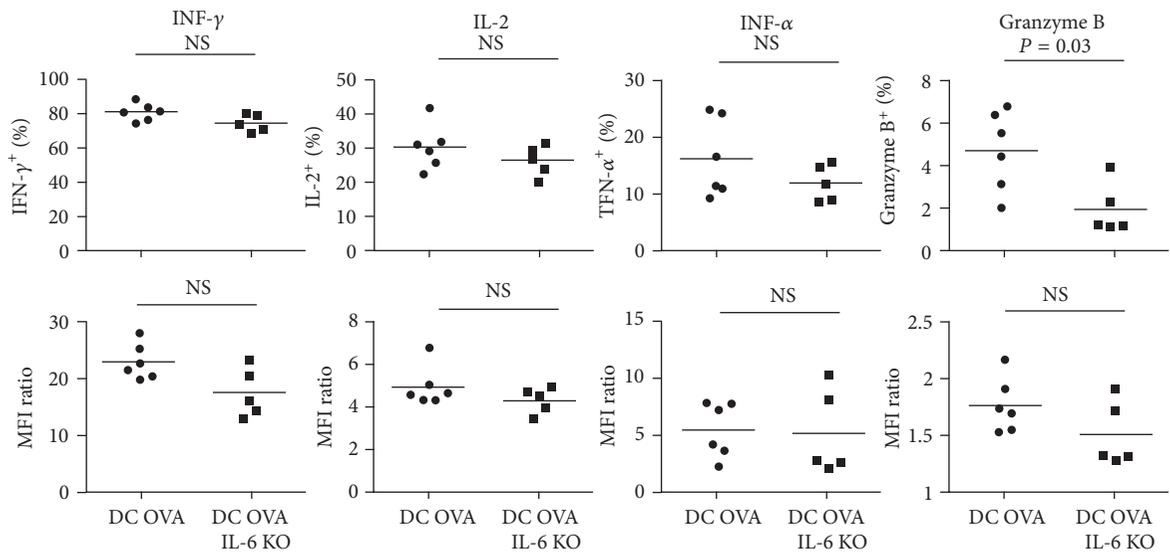


(b)

FIGURE 5: WT or IL-6 KO DC immunization generates effectors expressing similar levels of the transcription factors Eomes and Bcl-6. (a) The representative overlay histogram shows expression of Eomes and Bcl-6 by OVA-specific Te cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) and endogenous T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>). The MFI of Bcl-6 or Eomes expression by OVA-specific CD8<sup>+</sup> effectors (upper bold number) and endogenous CD8<sup>+</sup> T cells (lower number) are indicated on each overlay. Mice were immunized as in Figure 3. (b) Quantification of the level of expression of Eomes and Bcl-6. The bar charts show the MFI of expression for Eomes or Bcl-6 by OVA-specific CD8<sup>+</sup> Te cells normalized to the MFI of endogenous CD8<sup>+</sup> T cells. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. At least two mice per group.



(a)



(b)

FIGURE 6: Generation of functional OVA-specific CD8<sup>+</sup> memory T cells following immunization with IL-6-deficient DCs. (a) Functionality of OVA-specific CD8<sup>+</sup> Tm cells at day 60 post-immunization. The overlays show production of the different effector molecules by OVA-specific T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) compared to endogenous T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>) following immunization with WT (top) or IL-6 KO (bottom) DCs. The percentage of cells producing the different effector molecules is indicated on each histogram. (b) Quantification of cytokine and granzyme B production by OVA-specific CD8<sup>+</sup> Tm cells. The percentage of cytokines and granzyme B producing OVA-specific Tm cells (top) and the amount produced (bottom) are shown at day 60 post-immunization. The MFI of cytokine and granzyme B production by CD8<sup>+</sup> Tm cells was normalized to the MFI of the recipient CD8<sup>+</sup> T cells (MFI ratio). The results are from two independent experiments.

CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> T cells or the endogenous source of IL-6 is sufficient to promote Bcl-6 expression in CD8<sup>+</sup> Te cells. The proper differentiation of effectors following vaccination with IL-6 KO DCs contrasts with the results obtained by others

where IL-6 induction by adjuvant was critical for cytotoxic T-cell differentiation [25]. One possible explanation is that vaccination with fully matured DCs bypassed the needs for IL-6. Altogether our results suggest that IL-6 production by

the DCs involved in the priming of naïve CD8<sup>+</sup> T cells is dispensable for the proper differentiation of CD8<sup>+</sup> Te cells.

Although CD8<sup>+</sup> Tm cells were generated following vaccination with IL-6-deficient DCs, it was important to investigate if the Tm cells generated were fully functional. As shown in Figure 6, OVA-specific CD8<sup>+</sup> Tm cells obtained with both WT and IL-6 KO DCs were similarly functional. They both produced similar amounts of IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  and granzyme B (Figure 6). These results show that IL-6 production by APCs during priming of naïve CD8<sup>+</sup> T cells is also dispensable for the generation of fully functional CD8<sup>+</sup> Tm cells.

Our results show that IL-6 production by DCs is dispensable for the generation of fully functional CD8<sup>+</sup> Tm cells. Furthermore, they also suggest that the lack of production of IL-6 by CD40-B cells is probably not the explanation for their inability to induce the formation of CD8<sup>+</sup> Tm cells. Further studies are required to understand why CD40-B-cell vaccination does not promote the generation of CD8<sup>+</sup> Tm cells. Possible explanations include differences in the site of priming, the level of costimulation, the interaction time with T cells, and the production of other soluble mediators such as IL-12 or type I IFNs. The ability of IL-6-deficient DCs to promote the generation of functional CD8<sup>+</sup> Tm cells indicates that other soluble factors (IL-12 and IL-23) produced by DCs are sufficient to induce the generation of CD8<sup>+</sup> Tm cells. Indeed, it was shown by others that vaccination with IL-12 and IL-23 deficient DCs abrogated CD8<sup>+</sup> Tm-cell development [44]. It is also possible that IL-6 plays a role during CD8<sup>+</sup> Tm-cell differentiation but that it does not have to be produced by the APCs involved in the T cell priming.

In conclusion, we show that the inability of CD40-B-cell vaccination to induce the formation of CD8<sup>+</sup> Tm cells is not due to their reduced production of IL-6. Similarly, vaccination with IL-6-deficient DCs did not impede their ability to promote the formation of functional CD8<sup>+</sup> Tm cells. Thus, IL-6 production by the APCs involved in the priming of naïve CD8<sup>+</sup> T cells is dispensable for the formation of CD8<sup>+</sup> Tm cells. Furthermore, our results also highlight the various role of IL-6 in different immunization protocol. Vaccination with DC does not rely on IL-6 for the full expansion and differentiation of CD8<sup>+</sup> Te cells while IL-6 is necessary when adjuvant is used.

## Abbreviations Used in This Paper

Ag:	Antigen
APC:	Antigen-presenting cell
CD40-B cell:	CD40-activated B cell
DC:	Dendritic cell
IFN:	Interferon
IL:	Interleukin
KO:	Knock-out
MPEC:	Memory precursor effector cell
NS:	Non-significant
OVA:	Ovalbumin
R:	Receptor
SEM:	Standard error of the mean
SLEC:	Short lived effector cell

Te cell:	Effector T cell
Tm cell:	Memory T cell
TNF:	Tumor necrosis factor
WT:	Wild-type.

## Acknowledgments

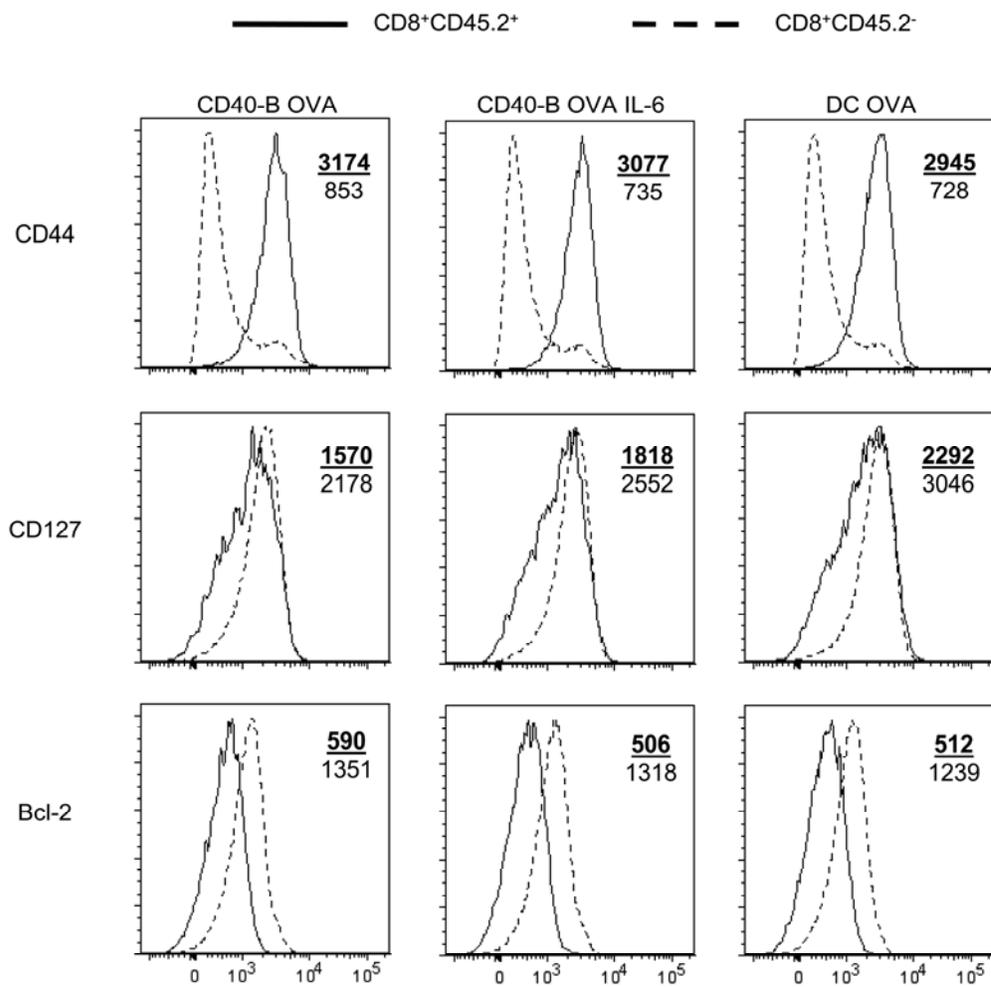
The authors thank all the members of the laboratory for helpful discussion. The authors acknowledge J. Yewdell for kindly providing the anti-K<sup>b</sup>-OVA antibody. The authors thank J. Dubeau and the animal care staff for mice husbandry. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-77545 and MOP-115139). M. Mathieu was supported by a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds de la Recherche du Québec-Santé. S. Boulet was supported by a CIHR postdoctoral fellowship.

## References

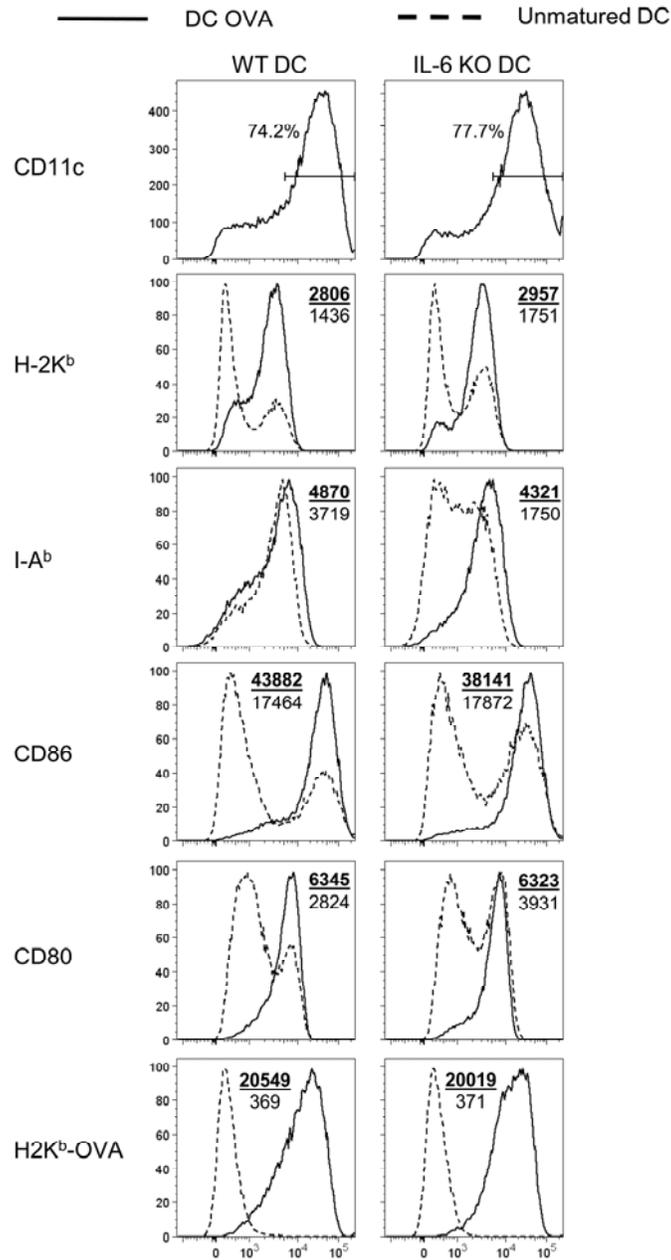
- [1] S. M. Kaech, J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh, and R. Ahmed, "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells," *Nature Immunology*, vol. 4, no. 12, pp. 1191–1198, 2003.
- [2] N. S. Joshi, W. Cui, A. Chandele et al., "Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8<sup>+</sup> T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor," *Immunity*, vol. 27, no. 2, pp. 281–295, 2007.
- [3] N. S. Joshi and S. M. Kaech, "Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 3, pp. 1309–1315, 2008.
- [4] S. Sarkar, V. Kalia, W. N. Haining, B. T. Konieczny, S. Subramaniam, and R. Ahmed, "Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 3, pp. 625–640, 2008.
- [5] K. M. Huster, V. Busch, M. Schiemann et al., "Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8<sup>+</sup> memory T cell subsets," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 15, pp. 5610–5615, 2004.
- [6] V. Kalia, S. Sarkar, S. Subramaniam, W. N. Haining, K. A. Smith, and R. Ahmed, "Prolonged interleukin-2R $\alpha$  expression on virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells favors terminal-effector differentiation in vivo," *Immunity*, vol. 32, no. 1, pp. 91–103, 2010.
- [7] V. P. Badovinac, K. A. Messingham, A. Jabbari, J. S. Haring, and J. T. Harty, "Accelerated CD8<sup>+</sup> T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination," *Nature Medicine*, vol. 11, no. 7, pp. 748–756, 2005.
- [8] M. H. Lacombe, M. P. Hardy, J. Rooney, and N. Labrecque, "IL-7 receptor expression levels do not identify CD8<sup>+</sup> memory T lymphocyte precursors following peptide immunization," *Journal of Immunology*, vol. 175, no. 7, pp. 4400–4407, 2005.
- [9] N. L. Pham, V. P. Badovinac, and J. T. Harty, "A default pathway of memory CD8 T cell differentiation after dendritic cell immunization is deflected by encounter with inflammatory cytokines during antigen-driven proliferation," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 4, pp. 2337–2348, 2009.

- [10] J. Leignadier and N. Labrecque, "Epitope density influences CD8<sup>+</sup> memory T cell differentiation," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 10, Article ID e13740, 2010.
- [11] M. Mathieu, N. Cotta-Grand, J. F. Daudelin, S. Boulet, R. Lapointe, and N. Labrecque, "CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naïve CD8 T cells to generate effector but not memory T cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 1, Article ID e30139, 2012.
- [12] F. Castellino and R. N. Germain, "Chemokine-guided CD4<sup>+</sup> T cell help enhances generation of IL-6/IL-7-high prememory CD8<sup>+</sup> T cells," *Journal of Immunology*, vol. 178, no. 2, pp. 778–787, 2007.
- [13] D. S. Ritchie, J. Yang, I. F. Hermans, and F. Ronchese, "B-lymphocytes activated by CD40 ligand induce an antigen-specific anti-tumour immune response by direct and indirect activation of CD8<sup>+</sup> T-cells," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 60, no. 6, pp. 543–551, 2004.
- [14] T. J. Vanden Bush, C. M. Buchta, J. Claudio, and G. A. Bishop, "Cutting edge: importance of IL-6 and cooperation between innate and adaptive immune receptors in cellular vaccination with B lymphocytes," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 8, pp. 4833–4837, 2009.
- [15] S. Guo, J. Xu, W. Denning, and Z. Hel, "Induction of protective cytotoxic T-cell responses by a B-cell-based cellular vaccine requires stable expression of antigen," *Gene Therapy*, vol. 16, no. 11, pp. 1300–1313, 2009.
- [16] T. Kishimoto, "IL-6: from its discovery to clinical applications," *International Immunology*, vol. 22, no. 5, pp. 347–352, 2010.
- [17] T. K. Teague, P. Marrack, J. W. Kappler, and A. T. Vella, "IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis," *Journal of Immunology*, vol. 158, no. 12, pp. 5791–5796, 1997.
- [18] M. Narimatsu, H. Maeda, S. Itoh et al., "Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 21, no. 19, pp. 6615–6625, 2001.
- [19] T. K. Teague, B. C. Schaefer, D. Hildeman et al., "Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 191, no. 6, pp. 915–926, 2000.
- [20] K. Takeda, T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto, and S. Akira, "Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific stat3-deficient mice," *Journal of Immunology*, vol. 161, no. 9, pp. 4652–4660, 1998.
- [21] R. D. Garman, K. A. Jacobs, S. C. Clark, and D. H. Raulet, "B-cell-stimulatory factor 2 ( $\beta$ 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 21, pp. 7629–7633, 1987.
- [22] R. D. Garman and D. H. Raulet, "Characterization of a novel murine T cell-activating factor," *Journal of Immunology*, vol. 138, no. 4, pp. 1121–1129, 1987.
- [23] H. Sepulveda, A. Cerwenka, T. Morgan, and R. W. Dutton, "CD28, IL-2-independent costimulatory pathways for CD8 T lymphocyte activation," *Journal of Immunology*, vol. 163, no. 3, pp. 1133–1142, 1999.
- [24] J. Gagnon, S. Ramanathan, C. Leblanc, A. Cloutier, P. P. McDonald, and S. Ilangumaran, "IL-6, in synergy with IL-7 or IL-15, stimulates TCR-independent proliferation and functional differentiation of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 12, pp. 7958–7968, 2008.
- [25] M. K. MacLeod, A. S. McKee, A. David et al., "Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 19, pp. 7914–7919, 2011.
- [26] K. A. Hogquist, S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone, "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection," *Cell*, vol. 76, no. 1, pp. 17–27, 1994.
- [27] M. Kopf, H. Baumann, G. Freer et al., "Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice," *Nature*, vol. 368, no. 6469, pp. 339–342, 1994.
- [28] M. Mathieu, N. Cotta-Grand, J. F. Daudelin, S. Boulet, R. Lapointe, and N. Labrecque, "CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naïve CD8<sup>+</sup> T cells to generate effector but not memory T cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 1, Article ID e30139, 2012.
- [29] A. M. Livingstone and M. Kühn, "Dendritic cells need T cell help to prime cytotoxic T cell responses to strong antigens," *European Journal of Immunology*, vol. 29, no. 9, pp. 2826–2834, 1999.
- [30] M. Mathieu and N. Labrecque, "Murine superficial lymph node surgery," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 21, no. 63, Article ID e3444, 2012.
- [31] A. Porgador, J. W. Yewdell, Y. Deng, J. R. Bennink, and R. N. Germain, "Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody," *Immunity*, vol. 6, no. 6, pp. 715–726, 1997.
- [32] V. Ostiguy, E. L. Allard, M. Marquis, J. Leignadier, and N. Labrecque, "IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 82, no. 3, pp. 645–656, 2007.
- [33] L. Haynes, S. M. Eaton, E. M. Burns, M. Rincon, and S. L. Swain, "Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo," *Journal of Immunology*, vol. 172, no. 9, pp. 5194–5199, 2004.
- [34] V. Singh, S. Jain, U. Gowthaman et al., "Co-administration of IL-1+IL-6+TNF- $\alpha$  with Mycobacterium tuberculosis infected macrophages vaccine induces better protective T cell memory than BCG," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 1, Article ID e16097, 2011.
- [35] A. Banerjee, S. M. Gordon, A. M. Intlekofer et al., "Cutting edge: the transcription factor eomesodermin enables CD8<sup>+</sup> T cells to compete for the memory cell niche," *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 9, pp. 4988–4992, 2010.
- [36] H. Ichii, A. Sakamoto, M. Hatano et al., "Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8<sup>+</sup> T cells," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 6, pp. 558–563, 2002.
- [37] H. Ichii, A. Sakamoto, Y. Kuroda, and T. Tokuhiwa, "Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8<sup>+</sup> T cells," *Journal of Immunology*, vol. 173, no. 2, pp. 883–891, 2004.
- [38] A. M. Intlekofer, N. Takemoto, C. Kao et al., "Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8<sup>+</sup> T cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 9, pp. 2015–2021, 2007.
- [39] A. M. Intlekofer, N. Takemoto, E. J. Wherry et al., "Effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin," *Nature Immunology*, vol. 6, pp. 1236–1244, 2005.

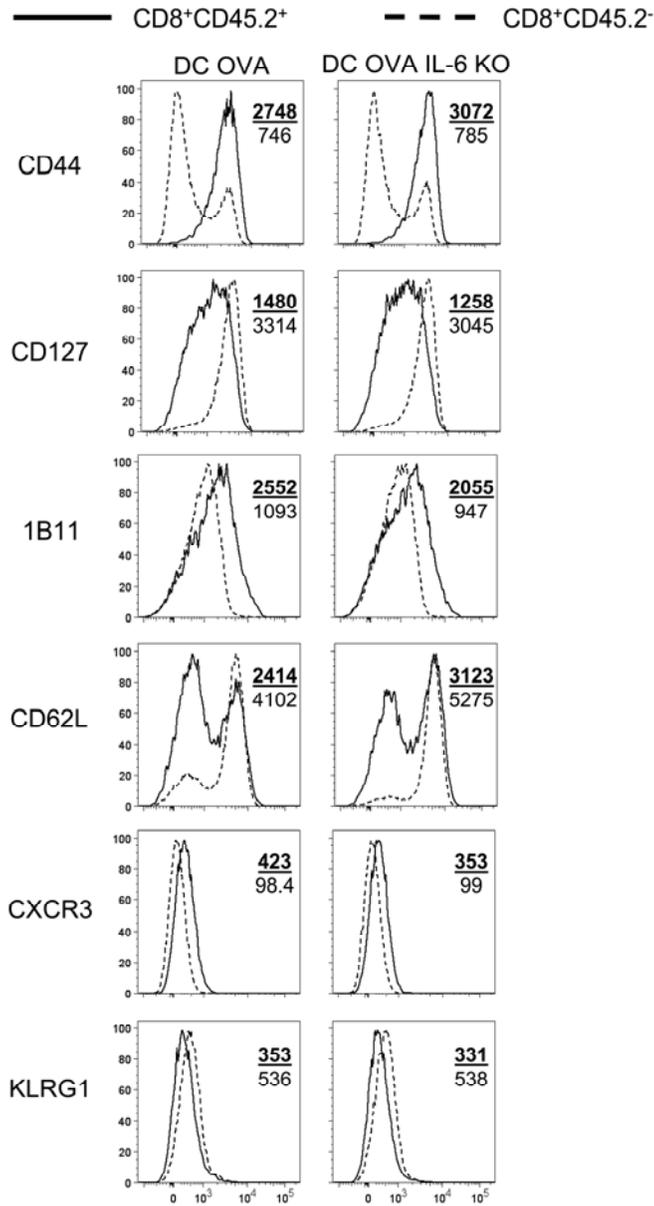
- [40] N. Takemoto, A. M. Intlekofer, J. T. Northrup, E. J. Wherry, and S. L. Reiner, "Cutting edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8<sup>+</sup> T cell differentiation," *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 11, pp. 7515–7519, 2006.
- [41] D. Eto, C. Lao, D. DiToro et al., "IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (T<sub>fh</sub>) differentiation," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 3, Article ID e17739, 2011.
- [42] J. A. Harker, G. M. Lewis, L. Mack, and E. I. Zuniga, "Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection," *Science*, vol. 334, no. 6057, pp. 825–829, 2011.
- [43] R. I. Nurieva, Y. Chung, G. J. Martinez et al., "Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells," *Science*, vol. 325, no. 5943, pp. 1001–1005, 2009.
- [44] C. J. Henry, J. M. Grayson, K. L. Brzoza-Lewis et al., "The roles of IL-12 and IL-23 in CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immunity against *Listeria monocytogenes*: insights from a DC vaccination model," *Cellular Immunology*, vol. 264, no. 1, pp. 23–31, 2010.



**Figure S1. Phenotype of the CD8<sup>+</sup> Te cells generated after CD40-B cell immunization with or without IL-6 supplementation.** Phenotype of effectors at d4 post-immunization with CD40-B cells with or without IL-6 (500 ng, i.p.). The representative overlay histogram shows expression of CD44, CD127 and Bcl-2 by endogenous T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>) and OVA-specific Te cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>). The MFI is shown on each overlays, the upper bold number indicates the MFI of OVA-specific effectors while the lower number is for the endogenous population. The results shown are representative of 3 independent experiments.

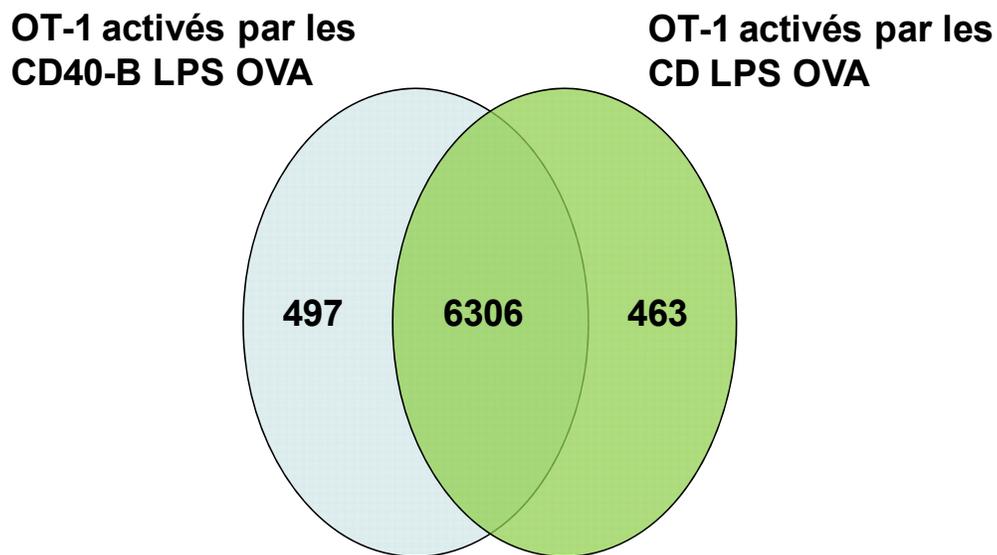


**Figure S2. Phenotype of WT and IL-6 KO DCs.** Percentage of CD11c<sup>+</sup> cells or MFI are indicated on each histogram. H-2K<sup>b</sup>, I-A<sup>b</sup>, CD86, CD80 and H2K<sup>b</sup>-OVA profiles are gated on CD11c<sup>+</sup> cells. The MFI is shown on each overlay, the upper bold number indicates the MFI of the LPS-matured DCs and the lower number is for unmaturing DC. The results shown are representative of two independent experiments.



**Figure S3. Phenotype of the CD8<sup>+</sup> Te cells generated following immunization with IL-6 sufficient and deficient DCs.** Phenotype of effectors at day 4 post-immunization with WT or IL-6 KO DCs. The representative overlay histogram shows expression of CD44, CD127, 1B11, CD62L, CXCR3 and KLRG1 by endogenous T cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>) and OVA-specific Te cells (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>) at day 4 post-immunization. The results shown are representative of 2 independent experiments.

## Annexe 5: L'activation des LT CD8<sup>+</sup> par les CD et les CD40-B *in vitro* induit l'expression de différents gènes



### Quelques voies différemment régulées:

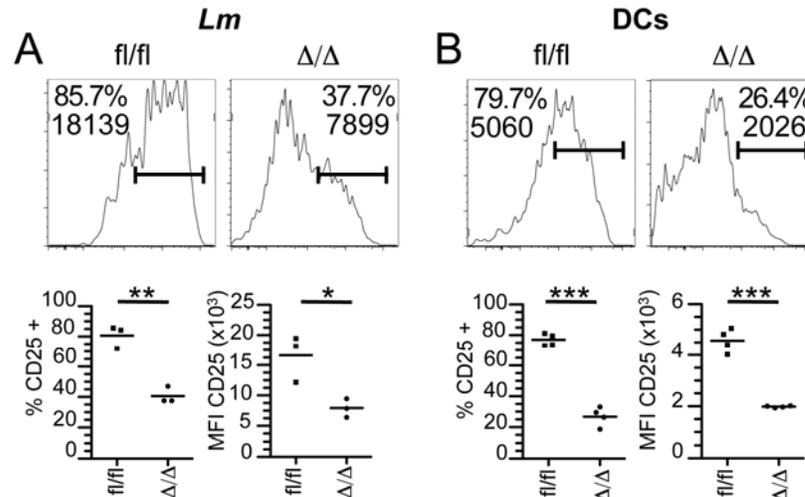
Signal de costimulation (CD28, CD27, OX40, 4-1BB)

↓ Signal RCT

Signal des récepteurs de l'IFN, du TNF et de l'IL-6

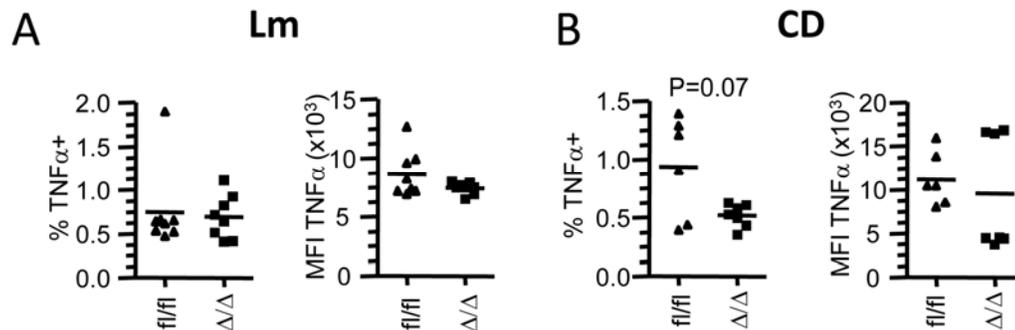
L'activation des LT CD8<sup>+</sup> par les CD et les CD40-B *in vitro* induit l'expression de différents gènes. Des LT CD8<sup>+</sup> OT-1 ont été activés durant 24h *in vitro* avec des CD40-B LPS OVA ou des CD LPS OVA (ratio 5 :1). Les LT OT-1 ont été triés, leurs ARN extraits, transcrits en ADNc puis hybridés à une puce Illumina mouse-ref8-v2.0. Un résumé des résultats de l'hybridation sur puce est présenté.

## Annexe 6 : La signalisation Notch est requise pour l'augmentation de l'expression de CD25 chez les LTe CD8<sup>+</sup>



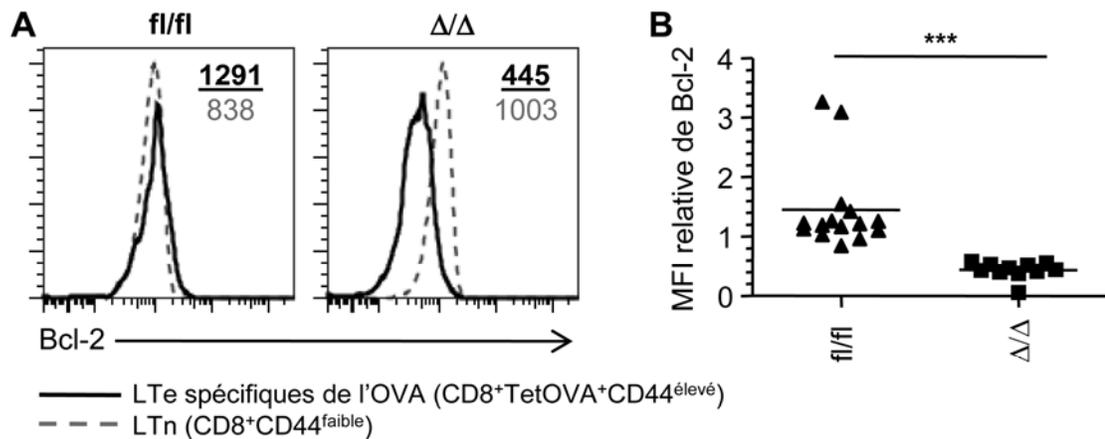
La signalisation Notch est requise pour l'augmentation de l'expression de CD25 chez les LTe CD8<sup>+</sup>. Des souris B6SJL (CD45.1<sup>+</sup>) ont été transférées avec 10<sup>4</sup> LT OT-1 (CD45.2<sup>+</sup>) exprimant les récepteurs Notch (fl/fl) ou non (Δ/Δ). Ensuite, les souris transférées ont été immunisées avec *Lm*-OVA (A) ou immunisées avec des CD-OVA (B). L'expression de CD25 sur les LT OT-1 a été déterminée 5 jours post-infection (A) ou 4 jours post-vaccination (B). Des histogrammes représentatifs montrent l'expression de CD25 sur les LT OT-1 exprimant les récepteurs Notch (fl/fl) ou les LT OT-1 n'exprimant pas les récepteurs Notch (Δ/Δ) (CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup>). Le pourcentage de LT OT-1 CD25<sup>+</sup> et leur MFI sont montrés sur chacun des histogrammes. Les graphiques montrent les compilations du pourcentage de LT OT-1 CD25<sup>+</sup> et de leur MFI pour chacune des souris analysées. Les données sont représentatives d'une expérience avec 3-4 souris par groupe. Statistiques : T-test. \* p≤0.05, \*\* p≤0.01, \*\*\* p≤0.001.

## Annexe 7 : Production similaire de TNF- $\alpha$ par les LTe suite à l'infection avec *Listeria* ou l'immunisation avec les CD



**Production similaire de TNF- $\alpha$  par les LTe suite à l'infection avec *Listeria* ou l'immunisation avec les CD.** Les souris exprimant les récepteurs Notch Notch (fl/fl) ou non ( $\Delta/\Delta$ ) ont été infectées avec *Lm*-OVA (A) ou immunisées avec les CD (B). La production de TNF- $\alpha$  a été mesurée 7 jours post-infection ou immunisation suivant une restimulation *in vitro* des splénocytes avec le peptide OVA. Les graphiques montrent les pourcentages (panneau de gauche) et les MFI (panneau de droite) des LTe produisant du TNF- $\alpha$  (CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>). Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes avec  $\geq 2$  souris par groupe.

## Annexe 8 : L'expression des récepteurs Notch est requise pour une expression élevée de Bcl-2 chez les LTm suite à une immunisation avec les CD



L'expression des récepteurs Notch est requise pour une expression élevée de Bcl-2 chez les LTm suite à une immunisation avec les CD. Des souris exprimant les récepteurs Notch (fl/fl) ou non (Δ/Δ) ont été immunisées avec des CD-OVA. L'expression de Bcl-2 a été mesurée chez les LTm au jour ≥45 post-immunisation. (A) Les histogrammes représentatives montrent l'expression de Bcl-2 par les LTm (CD8<sup>+</sup>TetOVA<sup>+</sup>CD44<sup>élevé</sup>) et les LTn (CD8<sup>+</sup>CD44<sup>faible</sup>). Sur chaque histogramme les MFI de Bcl-2 sont indiqués pour les LTm (nombre supérieur noir) et le LTn (nombre inférieur gris). (B) Le graphique montre la compilation de la MFI de Bcl-2 par les LTm normalisée par rapport à la MFI des LTn (MFI relative = MFI LTm/MFI LTn) pour chacune des souris analysées. Les données sont représentatives de 4 expériences avec 1-5 souris par groupe. Statistiques: T-Test. \*\*\* p≤0.001.