

Université de Montréal

**Rôles combinés des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 dans le
développement et le maintien des lymphocytes T CD8⁺ mémoires**

par

Cédric Mathieu

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Microbiologie et Immunologie

Décembre 2016

© Cédric Mathieu, 2016

Résumé

Suite à une infection, des lymphocytes T CD8⁺ naïfs (LTn CD8⁺) spécifiques d'un antigène du pathogène sont activés. Après, cette activation, ces lymphocytes se différencient en lymphocytes T effecteurs CD8⁺ (LTe CD8⁺) chargés d'éliminer le pathogène. Une fois que l'infection est résolue, la grande majorité des effecteurs meurent par apoptose et les survivants se différencient en lymphocytes T mémoires CD8⁺ (LTm CD8⁺). Ces derniers protégeront l'organisme à long terme contre une réinfection par le même pathogène. Il est ainsi primordial d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement et la maintenance des LTm CD8⁺.

Plusieurs études ont déjà montré que certaines cytokines de la famille γ_C (IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21) influençaient individuellement le développement des LTe et LTm CD8⁺. Cependant, nous pensons que ces cytokines ont un impact bien plus grand sur l'homéostasie des LTe et LTm CD8⁺ que la littérature actuelle le laisse entendre. En effet, nous émettons l'hypothèse que ces cytokines de la famille γ_C agissent en synergie entre elles afin de promouvoir le développement des LTe et LTm CD8⁺. Pour tester notre hypothèse, nous avons dans un premier temps étudié l'impact combiné des signaux IL-2 et IL-15 sur la génération des LTe et LTm CD8⁺ dans un modèle d'infection LCMV Armstrong. Ensuite, dans le même modèle expérimental, nous avons étudié l'effet d'une déficience en signaux IL-2, IL-15 et IL-21 sur le développement des LTe et LTm CD8⁺. Nos résultats montrent que ces trois cytokines collaborent afin de soutenir l'expansion et la différenciation des LTe CD8⁺. Plus précisément, l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21 sont essentielles pour l'homéostasie d'une population particulière de LTe CD8⁺ : les Short-Lived Effector Cells (SLECs). Nous avons également mis en évidence que ces trois cytokines sont toutes les trois requises afin de générer un nombre maximum de LTm CD8⁺. De plus, la différenciation et le maintien de la population effecteur mémoire (T_{EM}) sont particulièrement réduites en l'absence des signaux combinés de l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21.

Nos résultats mettent pour la première fois en lumière les rôles redondants et synergiques de trois cytokines dépendantes de la chaîne γ_c dans le développement et la maintenance des LTe et LTm CD8⁺.

Mots-clés : lymphocytes T CD8⁺, cytokines de la famille γ_c , synergie, redondance, différenciation, maintenance, infection secondaire, migration

Abstract

Over the course of an infection, antigenic signals trigger a specific CD8⁺ T cells (LTn CD8⁺) response. Upon antigen recognition, LTn CD8⁺ are activated and undergo a massive proliferation wave. This leads them to differentiate into effector cells (LTe CD8⁺) in charge of pathogen elimination.

While most effector T cells die after the infection is resolved, a small part of this population persists and differentiates into memory T cells (LTm CD8⁺). These cells provide long term protection to the organism against the initial infectious agent. It is thus crucial to have a better understanding of all mechanisms governing the development and the maintenance of LTm CD8⁺.

Several studies have already shown that some members of the γ_C -dependent cytokines family (IL-2, IL-7, IL-15 and IL-21) individually regulate LTe and LTm CD8⁺ development. However, we believe that these cytokines have a far greater impact on the homeostasis of LTe and LTm CD8⁺ than the current literature suggests. Indeed, we hypothesized that γ_C -dependant cytokines act in synergy to promote the development of LTe and LTm CD8⁺.

To assess their effect, we first studied the combined impact of IL-2 and IL-15 signals on the generation of LTe and LTm CD8⁺ during an LCMV Armstrong infection in mice. In this same experimental model, we also studied the effect of a deficiency in IL-2, IL-15 and IL-21 signals on the development of LTe and LTm CD8⁺. Our results show that these three cytokines cooperate to support the expansion and differentiation of LTe CD8⁺. More accurately, IL-2, IL-15 and IL-21 are essential for the homeostasis of a particular LTe CD8⁺ subset : Short-Lived Effector Cells (SLECs). We also demonstrated that all three cytokines are required to generate a maximal number of LTm CD8⁺. In addition, differentiation and maintenance of the memory effector population (T_{EM}) are substantially reduced in the combined absence of IL-2, IL-15 and IL-21 signals.

These results are the first to our knowledge to highlight redundant and synergistic functions of three γ_C -dependent cytokines as promoters of the development and maintenance of LTe and LTm CD8⁺.

Key words: CD8⁺ T lymphocytes, γ_c -dépendent cytokines, synergy, redundancy, differentiation, maintenance, secondary infection, migration

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xviii

<u>Chapitre 1 : INTRODUCTION</u>	1
1. Concepts généraux en Immunologie	1
1.1 Réponse Immunitaire.....	1
1.1.1 Réponse immunitaire innée.....	1
1.1.2 Réponse immunitaire adaptative.....	3
1.1.2.1 Lymphocytes B	4
1.1.2.2 Lymphocytes CD4 ⁺	4
1.1.2.3 Lymphocytes CD8 ⁺	6
1.2 Réponse immunitaire contre un pathogène intracellulaire	7
1.2.1 Virus LCMV ; souche Armstrong.....	8
1.2.2 Reconnaissance du pathogène et inflammation	9
1.2.3 Réponse LT CD8 ⁺ et élimination virale.....	12
2. Les cytokines dépendantes de la chaîne gamma (γ_c)	13
2.1 Cytokines dépendantes de la chaîne commune γ_c	13
2.2 Récepteurs aux cytokines γ_c et voies de signalisation	15
3. Réponse effectrice des lymphocytes CD8⁺	18
3.1 Expansion des lymphocytes CD8 ⁺	20
3.1.1 Signal 1 : Reconnaissance de l'antigène et signalisation.....	21

3.1.2 Signal 2 : Co-stimulation	23
3.1.2.1 Molécules de la superfamille des Immunoglobulines	24
3.1.2.2 Molécules de la famille des récepteurs au TNF	26
3.1.3 Signal 3 : Cytokines inflammatoires	27
3.1.3.1 IL-12	28
3.1.3.2 Interférons de type I	28
3.1.4 Aide CD4	29
3.2 Migration	33
3.3 Caractéristiques et fonctions des LT CD8 ⁺ effecteurs	35
3.3.1 Transition métabolique	36
3.3.2 Les différents types d'effecteurs	38
3.3.2.1 Inflammation	40
3.3.2.2 T-bet/Eomesodermin	41
3.3.2.3 Foxo1 /mTOR	42
3.3.2.4 Blimp-1/Bcl-6	43
3.3.2.5 Id2/Id3	45
3.3.3 Fonctions effectrices	47
3.3.3.1 Perforine/Granzymes	47
3.3.3.2 Récepteurs de mort	48
3.3.3.3 Cytokines effectrices	49
3.4 Contraction et apoptose	49
4. Cytokines γ_c dans le développement des LTe CD8⁺	52
4.1 IL-2	52
4.2 IL-15	55
4.3 IL-7	56
4.4 IL-21	57
4.5 Synergie et redondance	58
5. Lymphocytes T CD8⁺ mémoires	59
5.1 Maintenance et survie des lymphocytes T CD8 ⁺ mémoires	61
5.2 LT CD8 ⁺ mémoires et leurs fonctions	62
5.2.1 Effecteurs mémoires (T _{EM})	63

5.2.2 Mémoires centraux (T _{CM})	64
5.2.3 Résidents mémoires (T _{RM})	64
5.3 Facteurs de transcription	66
5.3.1 T-bet/Eomes	66
5.3.2 Foxo1/mTOR	67
5.3.3 Blimp-1/Bcl-6	69
5.3.4 Id2/Id3	70
5.4 Inflammation	71
6. Cytokines γ_c dans le développement des LTm CD8⁺	71
6.1 IL-2	72
6.2 IL-15	72
6.3 IL-7	73
6.4 IL-21	74
6.5 Synergie et redondance	75
7. Problématiques, Hypothèses et Objectifs	76
7.1 <u>Problématique 1</u> : Influences combinées des cytokines IL-2 et IL-15 sur la génération des réponses LT CD8 ⁺ antivirales primaires et secondaires	76
7.1.1 <u>Hypothèse</u> : L'IL-2 et l'IL-15 possèdent des fonctions synergiques et redondantes sur la réponse immune LT CD8 ⁺ antivirale	77
7.1.2 <u>Objectifs</u> : Evaluer les impacts de la déficience combinée en signaux IL-2 et IL-15 dépendants sur :	77
7.1.2.1 Le développement d'une réponse effectrice LT CD8 ⁺ primaire	
7.1.2.2 La génération et le maintien des LTm CD8 ⁺	
7.1.2.3 L'élaboration d'une réponse secondaire	
7.2 <u>Problématique 2</u> : Influence de l'IL-21 sur le développement des LTe et LTm CD8 ⁺ en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants	78
7.2.1 <u>Hypothèse</u> : Une combinaison des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 contrôle le développement des LTe et LTm CD8 ⁺	79
7.2.2 <u>Objectifs</u> : Evaluer les impacts d'une triple déficience en signaux IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants sur :	79
7.2.2.1 Le développement d'une réponse effectrice LT CD8 ⁺ primaire	

7.2.2.2 La génération des LTm CD8 ⁺	
7.3 <u>Problématique 3</u> : Impact des signaux IL2Rβ sur la migration des LTe CD8 ⁺ et sur le développement des T _{RM}	80
7.3.1 <u>Hypothèse</u> : l'IL-15 module le développement et la maintenance des T _{RM} des tissus intestinaux en régulant d'abord la migration de leurs progéniteurs mais également en assurant ensuite leur maintenance sur le long terme.....	81
7.3.2 <u>Objectif</u> : Caractériser l'impact des signaux IL2Rβ sur l'expression de marqueurs de migration intestinaux.....	81
<u>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</u>	82
1. Modèles murins.....	82
2. Virus, titres viraux et infection des souris	83
3. Traitement avec des anticorps bloquants	83
4. Isolement cellulaire.....	83
5. Induction des marqueurs de migration sur des LT CD8 ⁺ cultivés <i>in vitro</i>	85
6. Marquage cellulaire, analyse de cytométrie et tri cellulaire	85
7. Marquage intracellulaire et test de cytotoxicité <i>in vivo</i>	86
8. Extraction d'ARN et PCR quantitative.....	87
9. Analyse statistique	88
<u>Chapitre 3 : RESULTATS</u>	89
1. Influences combinées des cytokines IL-2 et IL-15 sur la génération des réponses LT CD8⁺ antivirales primaires et secondaires	89
<u>Mise en contexte</u>	89
1.1 Les signaux IL2Rβ dépendants supportent la prolifération des LTe CD8 ⁺ et soutiennent la différenciation des SLECs sans affecter leurs fonctions effectrices	90
1.1.1 La survie et la prolifération des effecteurs primaires sont réduites en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants	90
1.1.2 L'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15 limite la différenciation des SLECs.....	94
1.1.3 L'abrogation des signaux IL2Rβ n'influe pas sur les fonctions effectrices	101

1.2 L'IL-2 et l'IL-15 sont essentielles à la maintenance des LTm CD8 ⁺ de type effecteurs mémoires (T _{EM}).....	105
1.2.1 Les signaux IL2Rβ contrôlent la génération et le maintien des LTm CD8 ⁺	105
1.2.2 Les cytokines IL-2 et IL-15 sont requises pour la maintenance des T _{EM} mais pas pour celle des T _{CM}	109
1.3 La déficience de la chaîne IL2Rβ restreint l'expansion des SLECs secondaires sans limiter les fonctions des effecteurs secondaires	114
1.3.1 L'expansion des SLECs secondaires est réduite en absence des signaux IL-2 et IL-15	114
1.3.2 Les fonctions des effecteurs secondaires ne sont pas affectées par l'absence des signaux IL2Rβ	120
1.3.3 L'absence de signaux IL-2 et IL-15 lors du priming n'induit pas un « programming » lors de la réponse secondaire	123
2. Influence de l'IL-21 sur le développement des LTe et LTm CD8⁺ en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants.....	129
<u>Mise en contexte</u>	129
2.1 La triple déficience cytokinique (IL-2, IL-15 et IL-21) réduit drastiquement l'expansion des effecteurs primaires et leur différenciation en SLECs	130
2.1.1 Une combinaison de signaux cytokiniques IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants est requise à l'expansion et à la différenciation des effecteurs primaires	130
2.1.2 Une combinaison de signaux cytokiniques IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants régule l'expression optimale du Grz B	135
2.2 Les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 coopèrent à l'homéostasie des LTm CD8 ⁺ de type T _{EM}	137
3. Impact des signaux IL2Rβ sur la migration des LTe CD8⁺ et sur le développement des T_{RM}	141
<u>Mise en contexte</u>	141
3.1 L'expression des marqueurs de migration intestinaux sur les LTe CD8 ⁺ est transitoire et corrèle avec l'écotaxie des effecteurs vers les tissus intestinaux.....	142
3.2 Les signaux IL2Rβ contrôlent l'expression des marqueurs de migration intestinale	146

3.3 Les signaux IL-2 limitent l'expression des marqueurs de migration et de résidence intestinales	151
3.4 Les signaux IL2R β contrôlent l'expression des marqueurs de migration intestinale sur les EECs et les SLECs.....	155
3.5 L'absence de signaux IL2R β réduit le développement de lymphocytes résidents mémoires (T _{RM}).....	161
<u>Chapitre 4 : DISCUSSION</u>	163
<u>Préambule</u>	165
1. Réponse effectrice primaire	165
1.1 Expansion.....	165
1.2 Développement des SLECs et MPECs au sein des LTe CD8 ⁺	167
1.2.1 Expansion des SLECs et MPECs.....	168
1.2.2 Différenciation des SLECs et MPECs	169
1.2.3 Migration des effecteurs LT CD8 ⁺	171
2. Phase mémoire	175
2.1 Génération, maintenance et survie des LTm CD8 ⁺	175
2.2 Différenciation et maintenance des LTm CD8 ⁺	177
3. Réponse secondaire	180
3.1 Expansion des effecteurs secondaires.....	181
3.2 Différenciation des effecteurs secondaires	181
4. Fonctions effectrices des LTe CD8⁺ primaires et secondaires	182
5. Conclusions et perspectives	184
<u>Bibliographie</u>	i
<u>Annexe</u>	xxxiv

Liste des tableaux

Tableau 1: Les divers sous-types de LT CD4⁺ et les cytokines et facteur de transcription favorisant leur différenciation.

Tableau 2 : Niveaux d'expression des récepteurs aux cytokines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21 sur les LTn CD8⁺, les LTe CD8⁺ et les LTm CD8⁺.

Tableau 3 : Couples d'amorces utilisés lors des PCR quantitatives

Liste des figures

Figure 1 : Les différents TLRs

Figure 2 : Les voies de signalisation des TLRs

Figure 3 : Les cytokines de la famille γ_c et leurs récepteurs

Figure 4 : Les trois phases de la réponse immune LT CD8⁺

Figure 5 : Les trois signaux d'activation des LTn CD8⁺

Figure 6 : La signalisation du RCT

Figure 7 : L'aide CD4⁺

Figure 8 : Les voies métaboliques produisant de l'ATP

Figure 9 : Les différents sous-types de LTe CD8⁺

Figure 10 : Les facteurs de transcription orientant la différenciation des SLECs/MPECs

Figure 11 : Les voies d'apoptose extrinsèque et intrinsèque

Figure 12 : Les différents sous-types de LTm CD8⁺

Figure 13 : Les facteurs de transcription orientant la différenciation des sous-types de LTm CD8⁺

Figure 14 : Les signaux IL-2 et IL-15 combinés conditionnent la prolifération et la survie des LTe CD8⁺ primaires

Figure 15 : Les signaux IL-2 et IL-15 combinés conditionnent la différenciation des LTe CD8⁺ en SLECs

Figure 16 : L'absence de signaux IL2R β réduit la prolifération des SLECs

Figure 17 : L'absence de signaux IL2R β modifie l'expression de facteurs de transcription clés

Figure 18 : Les LTe CD8⁺ IL2R β déficients sont aptes à contrôler une infection malgré une production limitée de granzymes

Figure 19 : Les signaux IL-2 et IL-15 conditionnent la génération et la maintenance des LTm CD8⁺

Figure 20 : Les T_{EM} sont dépendants des signaux IL-2 et IL-15 pour leur différenciation

Figure 21 : Les signaux IL2R β contrôlent la maintenance des T_{EM}

Figure 22 : La déficience en signaux IL2R β restreint l'expansion des SLECs secondaires

Figure 23 : Les effecteurs secondaires IL2R β contrôlent parfaitement une infection

Figure 24 : Bloquer transitoirement les signaux CD122 durant l'infection primaire n'affecte ni le nombre ni la composition des LTm CD8⁺

Figure 25 : Bloquer les signaux CD122 durant l'infection secondaire limite l'expansion des SLECs secondaires

Figure 26 : Une combinaison des signaux IL-2, IL-15 et IL-21 contrôle l'expansion terminale des SLECs

Figure 27 : Les signaux IL-2, IL-15 et IL-21 régulent conjointement l'expression de Eomes et du Grz B

Figure 28 : Une combinaison des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 est à l'origine du développement des T_{EM}

Figure 29 : L'expression des marqueurs de migration intestinaux est transitoire et corrèle avec l'apparition des LTe CD8⁺ P14 dans la lamina propria

Figure 30 : Les signaux IL2R β régulent l'expression des marqueurs de migration intestinale

Figure 31 : Les signaux IL-2 limitent l'expression des marqueurs de migration intestinale sur les LTe CD8⁺

Figure 32 : Les signaux IL-2 limitent l'expression des marqueurs de migration intestinale sur les EECs et les SLECs

Figure 33 : Les signaux IL-2 et IL-15 conditionnent l'accumulation optimale des T_{RM} de la LP et en particulier des T_{RM} CD103⁻

Figure 34 : Schéma représentant l'impact combiné des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sur la génération de T_{EM} et T_{CM}

Figure 35 : Schéma représentant l'impact combiné des cytokines IL-2 et IL-15 sur la génération de T_{RM} CD103⁺ et CD103⁻.

Liste des abréviations

Ac : anticorps

ACAD : Activated Cell Autonomous Death

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Ag : antigène

AICD : Activated Induced-Cell Death

Akt : protéine kinase B

AP-1 : Activator Protein 1

APAF-1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

Bak : Bcl-2 homologous antagonist/ killer

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 : B-Cell lymphoma 2

Bcl-6 : B-Cell lymphoma 6

Bcl-X_L : B-Cell lymphoma extra large

BID : BH3 Interacting Domain death agonist

Bim : Bcl-2 Interacting Mediator of cell death

Blimp-1 : B-Lymphocyte Induced Maturation protein 1

CD : Cellules Dendritiques

cCD : Cellules Dendritiques conventionnelles

CDK6 : Cyclin Dependent Kinase 6

CDR : Complementary Determining Region

cFLIP : cellular caspases 8 (FLICE) like inhibitory protein

CFSE : Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMH I : CMH de classe I

CMH II : CMH de classe II

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CPT1a : Carnitine Palmitoyl Transférase 1a
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DD : Death Domain
DPEC : Double Positive Effector Cells
EEC : Early Effector Cells
Erk : Extracellular signal Regulated Kinases
FADD : Fas-associated DD
FADH2 : Flavin Adeninedinucleotide
FAS-L : Fas ligand
Foxo : Forkhead box O
FRC : Fibroblastic Reticular Cells
GATA-3 : GATA binding protein 3
GLUT-1 : récepteur au glucose 1
GP : Glycoprotéine
Grz : Granzyme
GVHD : Graft Versus Host Disease
HBV : Hepatitis B virus
HEV : High Endothelial Veinules
HSV : Herpes simplex virus
ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1
Id : Inhibitor of DNA binding
IE : Epithelium intestinal
IELs : Intra Epithelium Lymphocytes
IFN : Interférons
IFNAR : IFN α/β Receptor
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IPS-1 : IFN β Promoter Stimulator 1
IRF : IFN Regulatory Factor
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

JAK : Janus Kinase
KLRG1 : Killer cell Lectin-like Receptor G1
KLF-2 : Krüppel Like Factor 2
LAT : Linker for Activation T cell
LB : Lymphocytes B
Lck : Leukocyte specific protein tyrosine
LCMV: Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1
Lm : Listeria Monocytogenes
Lm-OVA : Listeria Monocytogenes exprimant OVA
Lm-GP₃₃ : Listeria Monocytogenes exprimant GP₃₃
LP : Lamina Propria
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocytes T
LTe : Lymphocytes T effecteurs
LTm : Lymphocytes T mémoires
LTn : Lymphocytes T naïfs
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MCMV : Mouse Cytomégalovirus
MDA-5 : Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MFI : Mean Fluorescence Intensity
MPEC : Memory Precursor Effector Cells
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cell
NF- κ B : Nuclear Factor kappa B
NK : Natural Killer
NK : Natural Killer T cell
NP : Nucleoprotein
OT-I : LT CD8⁺ spécifiques du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ de l'ovalbumine présenté par le H2-K^b

OVA : Ovalbumine
OXPHOS : phosphorylation oxydative
P14 : LT CD8⁺ spécifiques du peptide GP₃₃ présenté par le H2-D^b)
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
pCD : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes
pCMH : complexe peptide CMH
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD-1 : Programmed Death-1
PD-L : Programmed Death Ligands
PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase
PKC : Protein Kinase C
PLC γ : Phospholipase C γ
PRR : Patterns Recognition Receptors
PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RCB : Récepteurs Cellules B
RCT : Récepteurs Cellules T
RCT-pCMH : Complexe récepteurs cellules T et peptide CMH
RIG-I : Retinoic acid-Inducible Gene I
RLR : Retinoic acid-Inducible gene-Like Receptors
ROR γ t : Retinoid related orphean receptor γ t
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RSV : Respiratory Syncytial Virus
S1P : Sphingosine 1 Phosphate
S1P1 : Sphingosine 1 Phosphate Receptor 1
SHP1/2 : SH2-domain containing tyrosine phosphatase 1/2
SLEC : Short Lived Effector Cells
SLP76 : SH2 domain containing leukocyte protein 76kDa
SRC : Spare Respiratory Capacity
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
T-bet : T-box transcription factor

tBid : truncated BID
TCA : Tricarboxylic acid cycle ou Cycle de Krebs
T_{CM} : LTm CD8⁺ centraux
T_{EM} : LTm CD8⁺ effecteurs
TGFβ : Transforming Growth Factor β
T_{FH} : Lymphocytes T Follicular Helper
T_H : Lymphocytes T Helper
TLR : Toll Like Receptors
TNFα : Tumor Necrosis factor α
TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAF : Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor
TRAIL : TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAILR : TNF related apoptosis ligand receptor
Treg : Lymphocytes T régulateurs
T_{RM} : LTm CD8⁺ résidents
VSV : Vesicular Stomatitis Virus
VV : Vaccinia Virus
XSCID : déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X

Remerciements

Ma thèse touchant à sa fin, il est maintenant temps pour moi de remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce que ce doctorat soit une réussite. Cette thèse a été plus qu'une journée de laboratoire quotidienne pendant 5 ans, beaucoup plus. Cette thèse a également occupé mes nuits que ce soit en manipulant tard la nuit ou pendant mes pensées nocturnes au plus profond de mon sommeil. Cependant, je ne regretterai jamais cette expérience de vie qu'a été ma thèse, ces 5 dernières années ont été extrêmement enrichissantes à bien des niveaux. J'aimerais donc remercier tout d'abord le Dre Hélène Decaluwe pour m'avoir permis d'effectuer mon doctorat au sein de son laboratoire. Je lui suis reconnaissant pour la qualité des projets scientifiques sur lesquels elle m'a permis de m'aguerrir et de me développer en tant que scientifique complet. Elle a également su me transmettre son sens aigu de la précision et de la rigueur qui m'aura profondément marqué. Bien que nous n'étions pas toujours d'accord, nous avons toujours partagé la même passion et nous finissions toujours par nous comprendre et progresser ensemble. En ce sens, je la remercie pour sa patience envers l'étudiant aussi passionné que caractériel que je suis.

Je souhaite également remercier le Dr Alain Lamarre qui a fourni le virus LCMV Armstrong essentiel à la réalisation de l'intégralité de mes expériences. De plus, même si nous ne nous sommes pas rencontrés souvent, l'ensemble de ses retours sur mes résultats a toujours été d'une aide considérable. J'aimerais aussi grandement remercier le Dre Valérie Abadie dont la porte était toujours ouverte pour parler de migration et d'intestins murins. Dit comme ça, cela peut paraître bizarre mais sans son aide précieuse à m'apprendre la technique de dissection d'intestin, je n'aurais jamais pu réaliser ni même envisager la section 3 de ma partie Résultats. Enfin, je souhaite également remercier les Drs Fernando Alvarez et Nikolaus Heveker avec qui j'ai longuement parlé afin de mettre au point nombre de mes expériences.

L'ambiance au laboratoire n'aurait pas été la même sans l'apport de plusieurs de mes collègues. Evidemment, le premier d'entre eux est mon collègue de doctorat Jean-Christophe qui savait comment amener une atmosphère de travail agréable. Simplement en jouant le DJ

en mettant de la musique « d'ambiance » (comprenez métal, hard rock et cie..) ou de manière plus complexe en jouant des tours. Sara, notre très chère assistante de recherche, j'aimerais te remercier tout d'abord de ta bonne humeur et surtout de ta patience envers toutes les blagues et tours que Jean-Christophe et moi te faisons endurer de manière individuelle ou synergique. Tu es arrivée vers la fin de mon doctorat mais ton expertise technique et ton soutien lors d'expériences à quatre mains m'ont toujours été d'un grand soutien. Il est aussi important pour moi de remercier Tania Charpentier, un membre du laboratoire du Dr Alain Lamarre qui a souvent veillé tard pour injecter nos cellules à nos souris, sans oublier son importance cruciale dans la récolte des organes indispensables à la poursuite de mes expériences. J'aimerais également remercier Natacha Cotta-Grand, notre première associée de recherche qui m'a appris toutes les bases et les manières de travailler dans ce laboratoire. J'aimerais aussi adresser un petit clin d'œil aux stagiaires Eva et Moana qui même si elles n'étaient pas sous ma supervision, ont toujours écouté d'une oreille attentive lorsque je leur faisais part de l'avancement de mes projets de recherche.

Cette thèse n'aurait pas non plus pu être complète sans l'apport précieux du personnel de l'animalerie du Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine. Je pense bien évidemment à Véronique, Sonja et Denise. Ces trois drôles de dames ont toujours été d'une extrême gentillesse à mon égard et ont toujours fait en sorte que je puisse effectuer mes expériences avec des souris en parfait état. Je vous le promets, aucune souris n'a été maltraitée avec ces trois femmes là ! Merci encore à vous trois les filles ! J'aimerais aussi remercier Ines qui a passé tellement d'heures à trier le peu de cellules d'intérêt dans les suspensions cellulaires que je lui apportais. Finalement, j'aimerais remercier plusieurs personnes travaillant au Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine et qui m'ont apporté un soutien précieux à un moment ou un autre durant mon doctorat : Merci à Carolina, Sandy, Cristina, Nicolas, Thomas, Isabelle, Edith, Katie et Sébastien.

Enfin, j'aimerais remercier le Département de Microbiologie/Immunologie de l'Université de Montréal ainsi que la Fondation du CHU Sainte-Justine d'avoir reconnu en moi un scientifique prometteur en m'accordant plusieurs bourses de recherche.

Cette thèse n'aurait jamais pu être possible sans le soutien jour et nuit de ma chère Erika. Je lui dédie cette thèse car durant ces 5 dernières années, pas un jour, pas une nuit elle n'a cessé de me soutenir et de m'accompagner. Ce doctorat n'est pas le mien, c'est le notre. Je ne compte plus les longues soirées de relecture d'un texte qui était parfois trop lourd pour toi. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir accompagné et soutenu dans cette aventure. Je souhaite également fortement remercier ma chère mère qui a su, de l'autre côté de l'Atlantique, m'apporter un soutien toujours de grande qualité. Enfin, j'aimerais adresser un clin d'œil à trois amis proches qui ont toujours été là quand j'en avais besoin. Merci à Barbara, Charlotte et Thibaut.

Chapitre 1 : INTRODUCTION

1. Concepts généraux en Immunologie

Nous sommes continuellement entouré par des micro-organismes, dont beaucoup sont pathogènes. Il existe au moins quatre grandes catégories de micro-organismes responsables de maladies que sont les virus, les bactéries, les champignons et les parasites. Malgré des expositions constantes à ces pathogènes, un individu ne tombe que très rarement malade. Ceci s'explique par le fait que la plupart des être vivants disposent d'un système, dit système immunitaire, qui est chargé de les protéger, au niveau cellulaire et moléculaire contre tout type d'infection. L'immunologie est l'étude du fonctionnement de ce système immunitaire. Autrement dit, l'immunologie est une science où l'on tente de comprendre et de caractériser l'ensemble des mécanismes défendants l'organisme contre les divers pathogènes existants.

Lorsqu'un agent pathogène pénètre dans un organisme, il provoque une réaction appelée réponse immunitaire. Il est communément admis que cette réponse immunitaire est divisée en deux, la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. La réponse immunitaire innée aussi appelée immunité naturelle (ou innée), s'oppose immédiatement à une grande variété d'agents infectieux mais elle n'est ni persistante ni spécifique d'un pathogène particulier. A l'opposé, la réponse immunitaire adaptative ou immunité adaptative assure une protection à long terme contre toute réinfection par le même agent infectieux. Au cours de cette première section, nous détaillerons précisément les acteurs ainsi que les mécanismes impliqués au sein de ces deux réponses immunitaires.

1.1 Réponse immunitaire

1.1.1 Réponse Immunitaire innée

La réponse à un pathogène, qu'il soit intracellulaire ou non, débute toujours par la reconnaissance antigénique ou l'activation de la réponse immunitaire innée. Les micro-organismes (bactérie, virus ou parasite) expriment plusieurs motifs moléculaires extrêmement

conservés qui leurs sont propres et qui sont regroupés sous le terme PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Ces PAMPs sont reconnus par différentes catégories de PRR (*Patterns Recognition Receptors*). Il existe en effet plusieurs types de PRR classifiés selon leur localisation : (1) les PRR sécrétés tels que les collectines et les ficollines, molécules se liant aux pathogènes et initiant l'activation du complément, (2) les PRR transmembranaires tels que les TLRs (il en existe 13 chez la souris et 10 chez l'homme) (**Figure 1**) et les Lectines de type C, (3) les PRR cytosoliques tels que les RLRs (*Retinoic acid-Inducible gene-Like Receptors*) ou les NLRs (*Nod-Like Receptors*)¹. Les TLRs (*Toll Like Receptors*) et les Lectines de type C sont exprimés par les cellules immunitaires mais aussi par certaines cellules épithéliales situées aux probables sites d'entrées des pathogènes telles que les muqueuses. A contrario, les RLRs et les NLRs sont exprimés dans le cytoplasme de la majorité des cellules. Une fois le pathogène reconnu par les cellules de l'immunité innée, il y a induction de mécanismes de défenses tels que la phagocytose bactérienne, l'activation du complément et une réponse inflammatoire. Enfin, une fois activées par leurs récepteurs PRR, les cellules dendritiques immatures, qui font partie des cellules de l'immunité innée, sont capables d'activer à leur tour des lymphocytes naïfs. Ainsi, la réponse immunitaire adaptative est essentiellement déclenchée par une reconnaissance d'un pathogène par le système immunitaire inné.

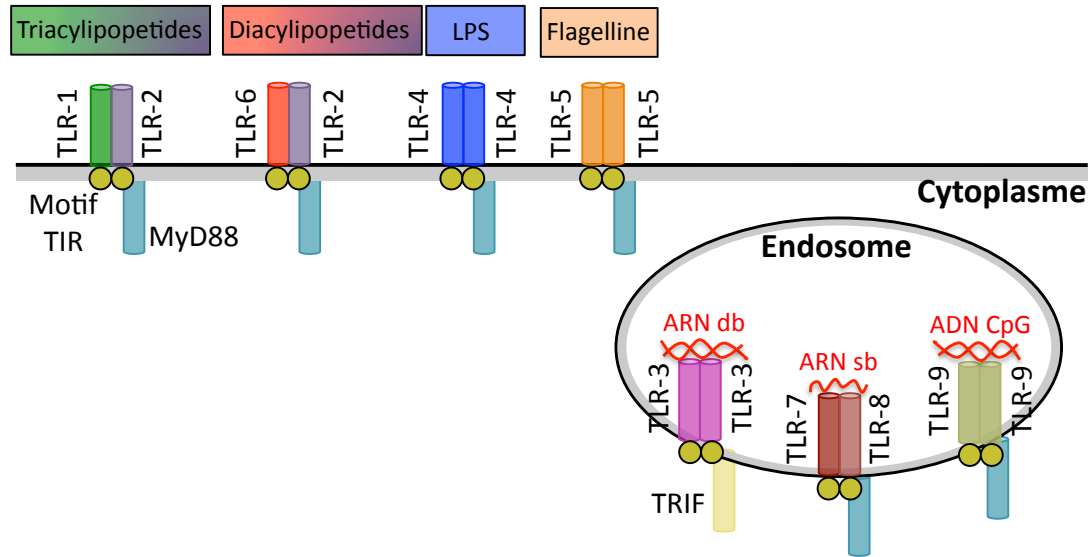


Figure 1 : Les différents TLRs. Représentation des différents TLRs présents à la surface ou dans le cytoplasme des cellules de l'immunité innée. Inspiré de².

1.1.2 Réponse Immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative induit une protection spécifique et à long terme contre un agent infectieux ou un antigène (Ag) étranger. Cette immunité adaptative se caractérise par deux facettes, une réponse humorale et une réponse cellulaire. Concrètement, ces deux réponses sont respectivement représentées par deux types cellulaires bien distincts, les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). En effet, les LB vont générer des anticorps spécifiques du pathogène et vont ainsi contribuer à la réponse humorale. Les LT vont plutôt médier une réponse cellulaire à un antigène. Les LT sont répartis en deux grandes familles selon le corécepteur qu'ils expriment. Ainsi, les LT $CD4^+$ sont définis par l'expression du corécepteur $CD4^+$ alors que les LT $CD8^+$ sont définis par l'expression du corécepteur $CD8^+$. Après la fin d'une réponse immunitaire, une faible proportion de LB et LT va persister et ces cellules persistantes vont se différencier en cellules mémoires vouées à protéger l'organisme dans le cadre d'une réinfection avec le même agent infectieux. Au cours de cette partie, nous discuterons des caractéristiques particulières de ces différentes populations lymphocytaires.

1.1.2.1 Lymphocytes B

Les LB se différencient dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur lymphoïde commun. La nomenclature des LB provient du diminutif de la bourse de Fabricius, organe où les lymphocytes se différencient chez les jeunes oiseaux. Chez les mammifères, les LB effectuent leur maturation dans la moelle osseuse (ou *Bone marrow*), la nomenclature fut donc conservée. Durant leur maturation, les LB acquièrent un récepteur à leur surface communément appelé récepteur de cellules B (RCB). Ces RCB possèdent chacun, grâce à des réarrangements géniques aléatoires, une spécificité antigénique qui leur est propre. Contrairement aux LT, les LB reconnaissent, via leur RCB, l'Ag sous sa forme native. Une fois l'Ag reconnu, le LB va internaliser le complexe Ag-RCB et va permettre la dégradation de l'Ag. Les peptides issus de la dégradation antigénique vont être présentés par le LB aux lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺). Ces derniers vont interagir avec les LB afin de former des centres germinatifs où les LB vont subir deux processus les conduisant à se développer en cellules sécrétrices d'anticorps (Ac) ou plasmocytes³. Ces deux processus sont l'hypermutation somatique (*somatic hypermutation*) et la commutation de classe (*class switch recombination*)^{4, 5}. Ces deux mécanismes permettent aux plasmocytes de sécréter des Ac de très forte affinité contre leur Ag spécifique. Il est important de noter qu'il existe plusieurs types d'Ac ou immunoglobulines (IgM, IgG, IgA et IgE) qui sont classifiés en fonction de leur capacité à se polymériser et leur localisation. Une fois la réponse humorale achevée, la plupart des plasmocytes vont mourir par apoptose mais certains d'entre eux vont perdurer et se maintenir en tant que plasmocytes mémoires. Ces derniers vont procurer une protection à long terme à l'organisme en assurant une réponse rapide en cas de réinfection⁵.

1.1.2.2 Lymphocytes T CD4⁺

Les LT CD4⁺ sont communément appelés LT *helper* (T_H) ou LT auxiliaires en raison de leur contribution à l'activation d'autres lymphocytes lors de l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Ces LT CD4⁺ reconnaissent les Ag qui leurs sont présentés par un complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Les LT CD4⁺ sont un groupe hétérogène de lymphocytes constitué de plusieurs sous-types présentant des fonctions diverses⁶. Les principaux sous-types de LT CD4⁺ caractérisés sont les T_H1, T_H2, T_H9, T_H17, T_{FH} (*follicular helper*) et Treg (régulateurs)⁶.

Suite à la reconnaissance par leur récepteur de cellules T (RCT) du complexe CMH II-Ag, les LT CD4⁺ naïfs vont s'activer et se différencier en l'un de ces sous-types en fonction des cytokines présentes⁷. Ainsi, l'exposition à une ou plusieurs cytokines va activer la voie de signalisation STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) par phosphorylation et conduire à l'expression d'un facteur de transcription maître favorisant la différenciation du LT CD4⁺ vers un de ses sous types (**Tableau 1**)⁷. Par exemple, la différenciation en T_{H1} est induite par la combinaison des cytokines IL-12 et l'IFN γ (interféron gamma). L'IL-12, après liaison avec son récepteur (IL-12R), va activer le facteur de transcription STAT4 qui va induire la transcription de l'IFN γ . Ce dernier, après avoir interagi avec son récepteur, va activer STAT1 qui va permettre à son tour l'activation du facteur de transcription T-bet (*T-box transcription factor*), élément majeur dans la différenciation des LT CD4⁺ activés en T_{H1}⁸. Pour la différenciation en T_{H2}, la cytokine IL-4 et les facteurs de transcriptions STAT6 et GATA-3 (*GATA binding protein 3*) qui sont impliqués^{9, 10}. Ce sont les cytokines IL-1, IL-2, IL-4, le TGF β (*Transforming Growth Factor β*) et le facteur de transcription IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*) qui contrôlent la différenciation des T_{H9}^{11, 12}. Le développement des T_{H17} nécessite une combinaison de TGF β et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 et la signalisation via STAT3 afin de recruter le facteur de transcription ROR γ t (*Retinoid related orphan receptor γ t*)¹³. Pour la différenciation des T_{FH}, ce sont les cytokines IL-6 et IL-21, STAT3 et Bcl-6 (*B-Cell Lymphoma 6*) qui sont impliqués^{14, 15}. Enfin, la différenciation en Treg requiert le TGF β , STAT5 et le facteur de transcription Foxp3 (*Factor forkhead Box P3*)¹⁶.

LT CD4 ⁺	Cytokines	Facteurs de transcription
T _H 1	IL-12, IFN γ	STAT4, T-bet
T _H 2	IL-4	STAT6, GATA-3
T _H 9	IL-1, IL-2, IL-4, TGF β	IRF4
T _H 17	IL-6, IL-23, TGF β	STAT4, ROR γ T
T _{FH}	IL-6, IL-21	STAT3, Bcl-6
T _{reg}	TGF β	STAT5, Foxp3

Tableau 1 : Les divers sous-types de LT CD4⁺ et les cytokines et facteur de transcription favorisant leur différenciation.

Ces divers sous-types de LT CD4⁺ présentent différentes fonctions. Les T_H1 sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN γ et TNF α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) afin de lutter contre des pathogènes intracellulaires¹⁷. Les T_H2 sont eux requis afin de soutenir la réponse humorale contre des parasites extracellulaires (helminthes) via la sécrétion des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13⁶. Ils soutiennent également la production de l'immunoglobuline E (IgE)¹⁸. Les T_H9 produisent la cytokine IL-9, cette dernière étant impliquée dans la pathogenèse de l'asthme, dans la commutation de classe en IgE et dans l'élimination des infections parasitaires^{6, 19}. Les T_H17 ont un rôle dans l'élimination des bactéries extracellulaires, des champignons en produisant les cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21 et de l'IL-22²⁰. Les T_H17 sont également impliqués dans les maladies chroniques inflammatoires et auto-immunes²⁰. Les T_{FH} sont eux essentiels à la régulation de la réponse effectrice et mémoire des LB^{21, 22}. Finalement, les Treg interviennent dans le maintien de l'homéostasie, de la tolérance périphérique et préviennent l'établissement d'auto-immunité²³.

1.1.2.3 Lymphocytes T CD8⁺

Les LT CD8⁺ reconnaissent les Ag présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par un complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). Ces cellules CD8⁺ sont essentielles à la protection de l'organisme contre les virus, les bactéries intracellulaires et les tumeurs²⁴. Les LT CD8⁺ se différencient en cellules cytotoxiques et disposent de divers mécanismes leur permettant d'éliminer leurs cibles²⁵. Premièrement, ils

sécrètent des molécules cytotoxiques (perforine, granzymes) qui entraîneront la lyse et la mort des cellules cibles. Deuxièmement, les LT CD8⁺ cytotoxiques peuvent induire l'apoptose via des récepteurs de morts. Troisièmement, ils sécrètent des cytokines effectrices (IFN γ , TNF α) qui provoqueront également la mort cellulaire des cellules ciblées. Nous expliquerons plus en détails le fonctionnement de ces fonctions cytotoxiques plus loin dans ce manuscrit. Au cours de cette thèse, nous étudierons le développement d'une réponse immune LT CD8⁺. Plus précisément, nous observerons la réponse de LT CD8⁺ spécifiques d'un antigène particulier du LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus) Armstrong (GP₃₃).

1.2 Réponse immunitaire contre un pathogène intracellulaire

Pour étudier le développement d'une réponse lymphocytaire T CD8⁺ dans un modèle murin, les chercheurs en immunologie disposent d'un vaste panel de pathogènes²⁶. Celui-ci comprend notamment des virus (LCMV, Respiratory Syncytial Virus (RSV), Vesicular Stomatitis Virus (VSV), Vaccinia Virus (VV), Herpes Simplex Virus (HSV), Hepatitis B Virus (HBV))^{27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35}, des bactéries intracellulaires (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis*)^{36, 37, 38, 39, 40} et des protozoaires (*Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanozoma cruzi*)^{41, 42, 43, 44}. Tous ces modèles infectieux offrent la possibilité d'étudier la différenciation des LT CD8⁺ effecteurs et mémoires selon divers paramètres. En effet, des composantes telles que la chronicité ou non de l'infection⁴⁵, l'aide CD4⁺⁴⁶, les molécules de costimulation et les signaux inflammatoires (IL-12, IFNs de type 1)^{35, 47, 48}, essentielles pour l'activation et le développement de la réponse LT CD8⁺, sont individuellement modulées par l'agent pathogène. Les impacts respectifs de ces composantes sur la prolifération, la différenciation et la survie des LT CD8⁺ effecteurs et mémoires seront détaillés plus en profondeur dans les sections 3 et 4 de l'introduction. L'ensemble de ces pathogènes génère une forte réponse cytotoxique des LT CD8⁺ ce qui permet également de caractériser la pluralité des mécanismes contribuant à l'élimination de l'agent infectieux²⁶.

Les parties suivantes vont détailler le pathogène, ses voies d'entrées dans les cellules, les PRR qui le reconnaissent, la réponse inflammatoire induite ainsi que les mécanismes d'élimination virale.

1.2.1 Virus LCMV ; souche Armstrong

Le LCMV est un virus enveloppé non cytopathique contenant deux segments d'ARN simple brin et appartenant au genre des *Arenavirus*^{49, 50}. Certaines souches de virus, Armstrong (ARM) et WE, induisent des infections aiguës alors que d'autres variants, LCMV Docile et LCMV Clone 13, persistent dans l'hôte murin, réservoir naturel^{51, 52}. La souche Armstrong est la forme originelle sous laquelle a été découverte ce virus en 1933 par Charles Armstrong. Ce virus a été isolé la première fois en 1933 chez une femme dont elle pensait qu'elle souffrait de l'encéphalite de St-Louis⁵³. Bien que l'hôte naturel du LCMV soit la souris voir le hamster, l'être humain peut également être infecté par transmission directe via un contact avec les fèces, l'urine ou la salive des rongeurs asymptomatiques ou non⁵⁴. Les morsures de rongeurs sont également des cas probables de transmission virale. Une infection à LCMV chez les adultes immunocompétents est en général asymptomatique ou limitée à un syndrome viral aspécifique⁵⁵. En revanche, une infection LCMV chez une femme enceinte peut engendrer de graves pathologies chez l'enfant telles qu'une hydrocéphalie, une chorioretinite et un retard mental⁵⁶. Un diagnostic d'infection congénitale à LCMV se traduit notamment par un taux de mortalité de 35% chez les nouveaux nés⁵⁷. Parmi les survivants, les deux tiers présentent des anomalies neurologiques chroniques telles qu'une microcéphalie, un retard mental, une paralysie cérébrale, des crises convulsives et une déficience visuelle^{57, 58}.

Chez la souris, la souche Armstrong du LCMV induit une infection aiguë avec une croissance virale rapide causant peu de dommages à l'hôte car le virus est non cytopathique^{50, 52}. Le pic d'expansion de ce virus se situe entre 3 et 4 jours post-infection et est présent dans différents compartiments murins (sérum, rate, cerveau, foie et rein)⁴⁵. Après 8 jours d'infection LCMV Armstrong, les charges virales ne sont plus détectables dans tous ces compartiments⁴⁵. La souche Armstrong, comme tous les virus LCMV, est composée de deux segments d'ARN simple brin. Le plus petit segment code pour les précurseurs de deux protéines virales, glycoprotéine (GP) et nucléoprotéine (NP), alors que le segment plus long code pour une polymérase d'ARN et une protéine de matrice⁵⁹. Le virus LCMV Armstrong infecte les macrophages, les lymphocytes, les cellules dendritiques et les cellules gliales^{60, 61}. Le virus pénètre dans les cellules via le récepteur cellulaire α -dystroglycan^{62, 63}, molécule transmembranaire reliée au cytosquelette⁶⁴.

1.2.2 Reconnaissance du pathogène et inflammation

Le LCMV Armstrong est reconnu par deux types de PRRs, les TLRs et les RLRs⁶⁵. Comme ce pathogène est un virus, il est reconnu par un TLR endosomal, le TLR7 qui lie spécifiquement les ARN simple brin. De façon intéressante, des souris déficientes pour le TLR7 (TLR7^{-/-}) sont tout à fait capables de résoudre une infection aiguë de LCMV Armstrong mais n'arrivent pas à éliminer une infection chronique de LCMV Clone 13⁶⁶. Cela démontre que la pluralité des PRRs reconnaissant le LCMV n'est pas suffisante pour compenser la perte du TLR7 et résoudre une infection chronique. Il a été récemment montré que le TLR2 pouvait reconnaître le LCMV Armstrong, probablement via la protéine d'enveloppe GP, dans un modèle d'infection *in vitro* d'astrocytes et de cellules microgliales⁶⁷. RIG-I (*Retinoic acid-Inducible Gene I*) et MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) sont des RLRs capables de lier des composantes du LCMV Armstrong et participent donc à la reconnaissance virale au même titre que le TLR7⁶⁸. D'autres virus, comme le RSV, le VSV et l'influenza, sont également reconnus par le TLR7⁶⁹. A contrario, d'autres pathogènes intracellulaires tels que les HSV et *Listeria monocytogenes* (*Lm*) sont reconnus par d'autres TLRs tels que le TLR9 et le TLR4⁷⁰.

L'infection intraveineuse (i.v) ou intrapéritonéale (i.p) d'une souris avec du LCMV Armstrong est toujours associée avec une rapide et forte production de cytokines inflammatoires et particulièrement d'interférons de type I (IFNs de type I)⁷¹. Cette production atteint son pic après 24 ou 48 heures selon la voie d'infection (24 heures pour i.v et 48 heures pour i.p) et décroît rapidement jusqu'à ne plus être détectable à jour 5 post-infection^{47, 71, 72, 73}. Il est intéressant de noter que contrairement au LCMV, la bactérie *Listeria monocytogenes* induit majoritairement une sécrétion d'IL-12 et d'IFN γ et non d'IFNs de type I comme cytokines inflammatoires^{35, 47, 71, 74, 75}. La présence d'IFNs de type I est de très courte durée pendant l'infection à LCMV Armstrong, cependant elle est essentielle pour limiter la réplication virale. En effet, des souris déficientes pour le récepteur aux IFNs de type I (souris IFNAR^{-/-} (IFN α/β Receptor)) infectées avec le LCMV Armstrong voient le virus persister alors que dans les souris contrôles, le virus est éliminé entre 7 et 10 jours post-infection⁷⁶. De

la même façon, neutraliser l'action des IFNs de type I par des anticorps bloquants a comme effet d'accroître la réplication virale⁷⁷.

La production d'IFNs de type I est dépendante de la reconnaissance du virus par les TLRs et les RLRs. En effet, le TLR7 induit via MyD88, molécule adaptatrice de tous les TLRs (hormis TLR3), l'activation des facteurs de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) et IRF7 (*IFN Regulatory Factor 7*), ceux-ci conduisant respectivement à la transcription des gènes codant pour des cytokines inflammatoires et les IFNs de type I⁶⁹ (**Figure 2**). Des souris génétiquement déficientes pour MyD88 ou pour les TLR7/9 présentent des taux d'IFNs de type I dans leur sérum sévèrement réduits par rapport aux souris contrôles⁶⁵. RIG-I et MDA-5 ont une signalisation dépendante de la même molécule IPS-I (*IFN β Promoter Stimulator 1*). Des souris déficientes en IPS-I ne peuvent produire d'IFNs de type I de manière optimale en réponse à une infection LCMV Armstrong^{65, 68}. Ces études démontrent que rapidement après la reconnaissance de virus par les différents PRRs spécifiques, de hauts taux d'IFNs de type I sont produits par des cellules de l'immunité innée afin d'enrayer la réplication virale.

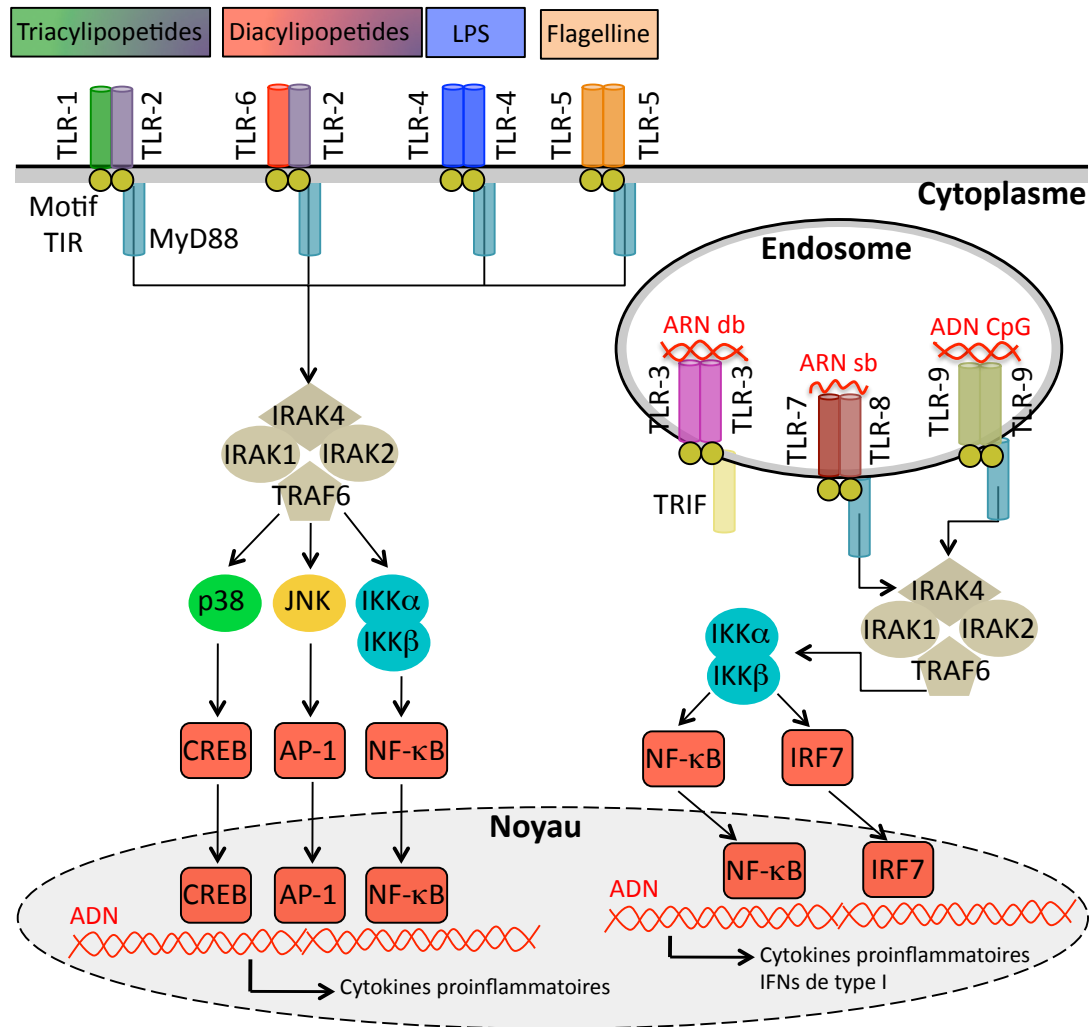


Figure 2 : Les voies de signalisation des TLRs. Représentation des voies de signalisation des TLRs conduisant à la transcription de gènes codant pour des cytokines inflammatoires. Inspiré de².

Lors d'une infection virale ce sont principalement les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pCD) qui produisent les IFNs de type I. En produisant ces cytokines inflammatoires, les pCD induisent leur maturation et celles des CD conventionnelles (cCD) de façon autocrine et paracrine^{78, 79}. Sur les cCD, cette maturation se traduit par une augmentation de l'expression des CMH de classe I et II et des molécules de co-stimulation à leur surface (B7.1, B7.2). De plus, l'expression de CCR7 est accrue, leur permettant ainsi de migrer dans les organes lymphoïdes et d'activer les LTn CD8⁺ spécifiques du pathogène^{80, 81}. Bien que les

pCD soient la source majeure de production d'IFNs de type I, ces cytokines sont toujours fortement sécrétées dans des souris infectées avec LCMV Armstrong et délétées en pCD⁸².

Les outils de reconnaissances des pathogènes ainsi que la réaction inflammatoire générée sont propres à l'agent infectieux. Dans le modèle LCMV Armstrong, les IFNs de type I agissent à au moins 3 niveaux : 1) limitation de la réplication virale, 2) augmentation de l'expression des CMH de classe I et II à la surface des cCD, 3) augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation sur les cCD.

1.2.3 Réponse LT CD8⁺ et élimination virale

Les LT CD8⁺ sont des éléments essentiels à la résolution d'une infection à LCMV Armstrong^{27, 29}. La cinétique d'une réponse LT CD8⁺ se divise en 3 phases clairement décrites à travers la littérature : 1) l'expansion, 2) la contraction et 3) la mémoire. Lors de la première phase, des cDC matures activent des LT CD8⁺ naïfs (LTn) en leur présentant leur Ag spécifique^{83, 84}. Suite à la reconnaissance du peptide spécifique, plusieurs mécanismes donc de la costimulation et des cytokines inflammatoires vont contribuer à l'activation complète des LTn CD8⁺. Nous parlerons de tous ces mécanismes plus précisément au cours de la section 3. A la suite de l'activation, une expansion clonale intense des LT CD8⁺ activés est générée et s'ensuit leur différenciation en LT CD8⁺ effecteurs (LTe) aussi appelé LT CD8⁺ cytotoxiques. Il existe différents sous-types de LTe CD8⁺ qui seront décrits dans la section 3 de l'introduction. En parallèle de cette expansion et de cette différenciation, les LTe CD8⁺ suivent un programme d'expression génique très précis les dotant d'un arsenal de mécanismes effecteurs leur permettant d'éliminer l'infection virale (granzymes, perforine, TNF, IFN γ , Fas)²⁵. Dans le cas du LCMV Armstrong, l'infection est résolue entre 7 et 10 jours post-infection. Il s'ensuit une phase de contraction où 90-95% des LTe CD8⁺ meurent par apoptose. Les LTe CD8⁺ restants vont devenir des LT CD8⁺ mémoires (LTm) conférant une protection immune spécifique à long terme. Différents sous-types de LTm CD8⁺ existent, ils seront développés dans la section 5 de l'introduction. Plusieurs acteurs tels que des cytokines (IL-12, IFNs de type I, cytokines de la famille γ_c), des facteurs de transcription (T-bet/Eomes, Bcl-

6/Blimp-1, Id2, Id3, Notch) ou des voies métaboliques (mTOR) influent isolément ou en synergie sur des étapes clés d'une réponse LT CD8⁺.

2. Les cytokines dépendantes de la chaîne commune gamma (γ_c)

Nous avons évoqué au cours de la section 1 que les IFNs de type I peuvent influencer directement ou indirectement la génération d'une réponse LT CD8⁺ efficace. De façon intéressante, certaines cytokines de la famille γ_c sont aussi très fortement impliquées dans le développement et le maintien des LTe (LT effecteurs) et LTm (LT mémoires) CD8⁺. De plus ces différentes molécules sont essentielles à la différenciation thymique des LTn CD8⁺ ainsi qu'à leur survie périphérique. Au cours de cette section, l'entièreté des membres de la famille γ_c , leurs récepteurs spécifiques, leurs voies de signalisation ainsi que les cellules sécrétant ces cytokines si particulières seront abordés en détails.

2.1 Cytokines dépendantes de la chaîne commune γ

Cette famille de cytokines regroupe plusieurs membres (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21) dont les récepteurs spécifiques sont tous composés d'au moins une même chaîne commune, la chaîne γ (aussi connu sous le nom de IL2R γ ou CD132)⁸⁵ (**Figure 3**). Ainsi ces différentes molécules ont toutes été regroupées sous la nomination cytokines de la famille γ_c . Les patients atteints d'immunodéficience combinée sévère liée à l'X (ou XSCID) ont une mutation sur le gène codant pour la chaîne γ . Il en résulte que ces patients n'ont pas de lymphocytes T ni de cellules Natural Killer (NK) et leurs lymphocytes B sont non fonctionnels⁸⁶. Il est toutefois intéressant de noter que les souris génétiquement déficientes pour CD132 présentent un phénotype plus sévère. En effet, en plus de ne pas avoir de LT et de NK, les souris $\gamma_c^{-/-}$ n'ont pas de LB⁸⁷. Ceci suggère que les signaux CD132 dépendants sont requis pour le développement des LB chez la souris mais pas chez l'homme. Plus précisément, le fait que les souris IL-7R $\alpha^{-/-}$ soient dépourvus de LB⁸⁸ alors que les patients déficients pour l'IL-7R α présentent un compte normal de LB⁸⁹, démontre la nécessité de l'IL-7 au développement des LB chez la souris. Cependant, bien qu'ils soient présents chez des patients XSCID, les lymphocytes B ont besoin des cytokines IL-4 et IL-21 afin d'être pleinement

fonctionnels. L'absence de développement de cellules T est reliée à un défaut en IL-7 qui a comme rôle d'assurer l'homéostasie et la survie des lymphocytes T naïfs et mémoires⁸⁹. Inversement une surexpression d'IL-7 via un transgène, dans un modèle murin, induit une augmentation de la taille du pool de lymphocytes T naïfs⁹⁰. L'absence de cellules NK est une conséquence de la déficience en IL-15, cytokine essentielle au développement et à la survie des NK chez l'homme⁹¹ mais aussi chez la souris⁹². En effet, ces deux cytokines sont très fortement impliquées dans la formation des centres germinatifs, la commutation isotypique et le développement en plasmocytes des lymphocytes B activés^{93, 94}. Toutes ces données démontrent que les cytokines de la famille γ_c ont des impacts majeurs sur des cellules de l'immunité innée comme sur des cellules de l'immunité adaptative, que ce soit chez l'homme ou chez la souris. Ainsi ces molécules sont considérées comme des acteurs clés de toute réponse immunitaire, humorale ou cellulaire. Au cours de cette thèse nous nous intéresserons particulièrement aux cytokines γ_c régulant les différents aspects d'une réponse LT CD8⁺. Parmi les six cytokines γ_c , quatre d'entre elles ; l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21 participent au développement et au maintien des LTn, LTe et LTm CD8⁺^{95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107}. Leurs rôles individuels ou combinés sur les LTe ou LTm CD8⁺ seront respectivement détaillés au cours des sections 4 et 6. L'IL-4 est requise pour le développement et les fonctions des LT CD4⁺ de type T_H2¹⁰⁸. L'IL-4 joue également un rôle important dans la commutation isotypique des Igs M en Igs E¹⁰⁹. L'IL-9 est produite par un sous-type de LT CD4⁺ activés (T_H9) et induit l'activation de cellules épithéliales, LB, éosinophiles et mastocytes^{11, 110}.

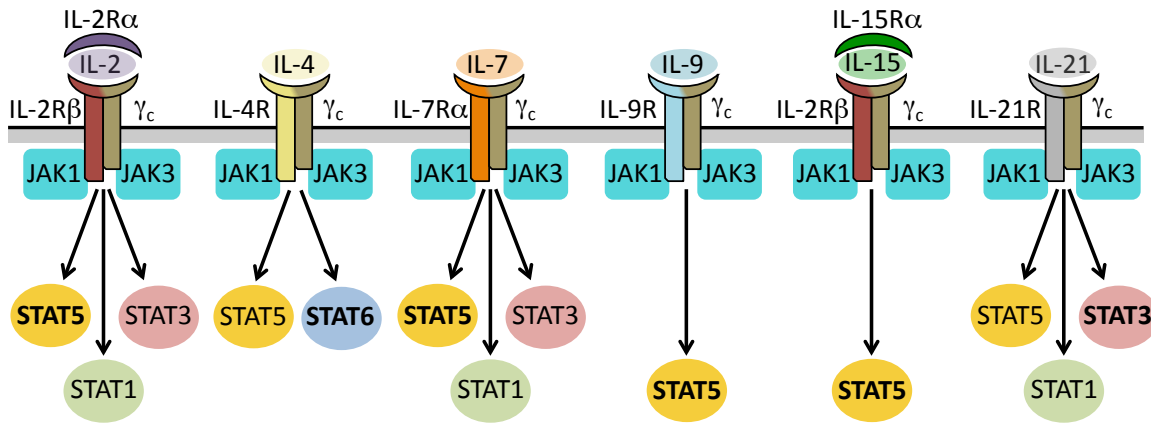


Figure 2 : Les cytokines de la famille γ_c et leurs récepteurs Représentation des cytokines de la famille γ_c , de leurs récepteurs et de leurs voies de signalisation. La molécule STAT majeure par laquelle chaque cytokine transmet son propre signal est indiquée en gras. Inspiré de⁸⁷.

2.2 Récepteurs aux cytokines γ_c et voies de signalisation

Les cytokines IL-4, IL-7, IL-9 et IL-21 ont des récepteurs dimériques alors que l'IL-2 et l'IL-15 ont des récepteurs trimériques (**Figure 3**). Tous les récepteurs cytokiniques ont en commun la même chaîne γ_c nécessaire à la signalisation intracellulaire. Les récepteurs dimériques sont composés de la chaîne γ_c mais aussi d'une chaîne α qui est propre à la cytokine¹¹¹. En ce qui concerne l'IL-2 et l'IL-15, leurs récepteurs spécifiques partagent également la même chaîne IL2R β (CD122) en plus du CD132. Comme les autres cytokines, l'IL-2 et l'IL-15 ont une chaîne α qui leur est propre, IL2R α (CD25) et IL15R α respectivement.

Tous les récepteurs, à l'exception du récepteur à l'IL-15, lient leur cytokine sous sa forme soluble. L'IL-15 est associée avec l'IL15R α à la surface des CD ou des monocytes. Le complexe IL-15/IL15R α est présenté en *trans* aux LT CD8⁺ murins où il va se lier aux autres chaînes du récepteur, CD122 et CD132¹¹². Cela indique que les signaux IL-15 requièrent une interaction directe entre les CD ou monocytes et les LT CD8⁺. L'IL-15 peut être également présenté en *cis* ou via des complexes solubles IL-15- IL15R α ^{113, 114}. Cependant, les LT CD8⁺ ne sont pas reconnus comme étant de gros producteurs d'IL-15¹¹⁵ donc la présentation de l'IL-

IL-15 aux LT ϵ CD8 $^+$ s'effectue majoritairement en *trans*. De plus, les réponses LT CD8 $^+$ des souris IL-15 $^{-/-}$ et IL15R $\alpha^{-/-}$ ne sont pas différentes confirmant ainsi que l'IL-15 requière l'intégralité de son récepteur trimérique afin que l'IL-15 soit correctement *trans* présentée aux LT CD8 $^+$ et pour qu'il y est ensuite intégration des signaux IL-15 dépendants^{116, 117}. Nous avons vu dans le paragraphe précédent que l'IL-15 possède un récepteur trimérique composé des chaînes IL15R α , IL2R β et γ . L'IL15R α lie sa cytokine avec une très forte affinité ($K_d=10^{-11}$)¹¹⁸ alors que l'hétérodimère IL2R β/γ lie l'IL-15 avec une affinité bien plus faible ($K_d=10^{-9}$)^{119, 120}. Malgré cela, le complexe IL2R β/γ est essentiel à la signalisation IL-15 dépendante^{119, 120}. En revanche, en absence de la chaîne IL15R α , l'IL-15 apparaît capable de signaler uniquement à travers le complexe IL2R β/γ ¹²⁰. Comme l'IL-15, l'IL-2 possède un récepteur trimérique et la liaison de cette cytokine aux trois chaînes (CD25, CD122 et CD132) est nécessaire à la formation d'un complexe de haute affinité indispensable à la transmission optimale des signaux IL-2 dépendants. En effet, l'IL-2 se lie d'abord à la chaîne IL2R α . Cette interaction permet les recrutements successifs des chaînes CD122 et CD132¹²¹. Cette structure quaternaire (IL-2-IL2R) est nécessaire afin d'optimiser la signalisation IL-2 dépendante. Cependant il a été montré que l'IL-2 peut se lier à un récepteur dimérique uniquement constitué des chaînes IL2R β et γ ¹²². L'absence de la chaîne IL2R α dans cette interaction a pour effet de limiter l'affinité de liaison de l'IL-2 pour son récepteur dimérique. En effet, la combinaison des trois chaînes du récepteur à l'IL-2 (CD25, CD122 et CD132) permet la liaison de cette cytokine avec une affinité maximale ($K_d=10^{-11}$)¹²³. De façon intéressante, des signaux IL-2 dépendants peuvent toujours être transmis et ce même en l'absence de CD25¹²⁴. Cependant, l'affinité de liaison de l'IL-2 au récepteur dimérique (CD122, CD132) est beaucoup plus faible ($K_d=10^{-9}$) que la liaison au récepteur trimérique¹²³.

Au cours de cette thèse, nous nous intéresserons particulièrement aux rôles des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sur la réponse immune LT CD8 $^+$ dans le cadre d'une infection LCMV Armstrong. Il est donc important ici de discuter de la cinétique d'expression des récepteurs des différentes cytokines de la famille γ_c influant sur les LT CD8 $^+$ (IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21) lors d'une réponse immune. Nous détaillerons donc ici l'expression des récepteurs de chacune de ces quatre cytokines sur les LTn, LT ϵ et LTm CD8 $^+$ (**Tableau 2**).

Les chaînes α des récepteurs à l'IL-7 et l'IL-15 sont constitutivement exprimées par les LTn CD8^{+87, 125}. La chaîne IL2R α est rapidement exprimée à la surface des LTe CD8⁺ suite à leur activation mais à tendance à fortement décroître avant le pic de la réponse immune (jour 7)^{87, 125}. Les niveaux d'expression de IL2R β augmentent après l'activation des LTn CD8⁺ et sont maintenus élevés tout au long de la réponse même lors du développement des LTm CD8^{+87, 125}. L'expression de IL7R α est fortement diminuée après l'activation lymphocytaire et commence à être réexprimée progressivement par certains types d'effecteurs au pic de la réponse immune LT CD8^{+87, 125}. L'expression de IL7R α est maximale sur les LTm CD8⁺. En ce qui concerne l'IL-21R, il est faiblement exprimé par les LTn CD8⁺ et augmente après l'activation lymphocytaire⁸⁷. L'expression de l'IL-21R sur les LTm CD8⁺ est considérée comme faible. Enfin, la chaîne CD132 est exprimée à des niveaux similaires sur les LTn, LTe et LTm CD8⁺.

Chaîne du récepteur	LTn CD8 ⁺	LTe CD8 ⁺	LTm CD8 ⁺
IL2R α (CD25)	Nul	Fort	Nul
IL2R β (CD122)	Faible	Fort	Fort
IL7R α (CD127)	Intermédiaire	Nul	Fort
IL15R α (CD215)	Faible	Fort	Fort
IL21R (CD360)	Faible	Fort	faible
γ_c (CD132)	Intermédiaire	Intermédiaire	Intermédiaire

Tableau 2 : Niveaux d'expression des récepteurs aux cytokines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21 sur les LTn CD8⁺, les LTe CD8⁺ et les LTm CD8⁺. Les niveaux d'expression sont classés en quatre catégories, nul, faible, intermédiaire et fort. Inspiré de⁸⁷.

Les voies de signalisation des cytokines γ_c sont multiples. Majoritairement, les cytokines γ_c signalisent à travers les molécules JAK1-3/STAT⁸⁷ (**Figure 3**). En ce qui concerne la molécule STAT, plusieurs cytokines usent de STAT5 (IL-2, IL-7, IL-9, IL-15) alors que l'IL-4 utilisent préférentiellement de STAT6 et l'IL-21 transmet son signal via STAT3⁸⁷. Cependant, bien que les STAT utilisées diffèrent selon la cytokine, la voie de

signalisation induite suite au signal cytokinique est similaire^{126, 127}. Par exemple, à la suite de la liaison de l'IL-2 à son récepteur, il y a hétérodimérisation du complexe IL2R β et IL2R γ . Ce phénomène va permettre l'activation des kinases JAK1 et JAK3 qui vont phosphoryler les facteurs de transcription STAT3 et STAT5. Ces derniers vont alors former des complexes homo ou hétérotrimériques via les domaines protéiques SH2 (*Src Homology 2*). Ces complexes néoconstitués vont ensuite entrer dans le noyau, se lier à l'ADN et induire des programmes de transcription. Une même cytokine de la famille γ_c peut signaler via différentes molécules de signalisation¹²⁸. Par exemple, l'IL-2 peut transmettre son signal en utilisant les voies JAK1-3/STAT5, PI3K/Akt et MAPK^{111, 128}. Le fait que ces molécules γ_c peuvent signaler à travers plusieurs voies renforce l'idée que ces cytokines occupent une place primordiale dans la régulation des réponses immunes. De plus, les cytokines γ_c , à cause de chaînes de récepteurs et de voies de signalisation communes, peuvent avoir des fonctions redondantes et ou synergiques sur le développement des LT CD8⁺ effecteurs et mémoires.

Dans les sections suivantes, je m'attarderai plus précisément sur les interactions et les processus qui régulent le développement optimal d'une réponse LT CD8⁺.

3. Réponse effectrice des lymphocytes LT CD8⁺

La réponse effectrice des LT CD8⁺ à un pathogène intracellulaire est un processus extrêmement structuré et ordonné constitué de trois phases bien distinctes : 1) l'expansion, 2) la contraction et 3) la mémoire (**Figure 4**).

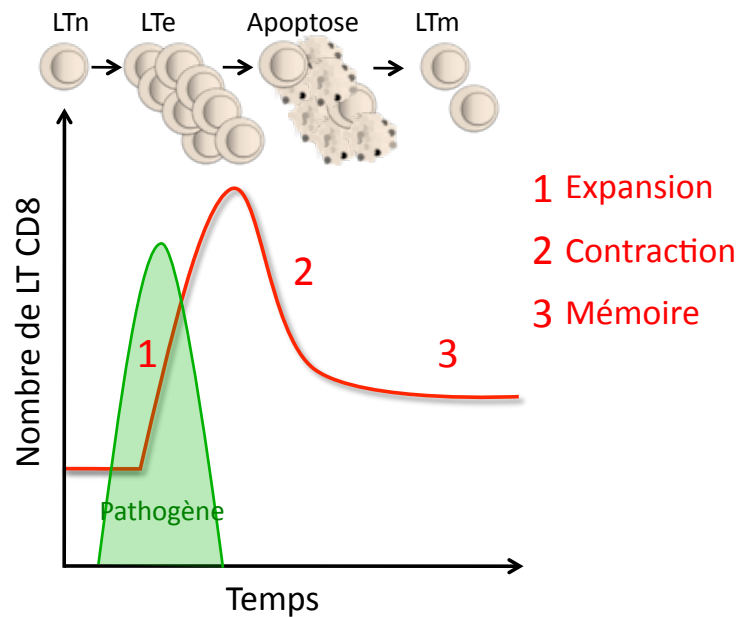


Figure 4 : Les trois phases de la réponse immune LT CD8⁺. Représentation des trois phases de la réponse immune LT CD8⁺. Suite à son activation, le LTn CD8⁺ va suivre un programme de différenciation qui se caractérise par trois phases : l'expansion (1), la contraction (2) et la mémoire (3). La courbe en vert indique la courbe d'expansion du pathogène dans le cadre d'une infection aiguë. Inspiré de¹²⁹

Premièrement, la phase d'expansion correspond à l'activation puis à la prolifération des LTn CD8⁺ suite à la reconnaissance de leur Ag spécifique sur une CPA et en particulier sur des cCD matures au sein des organes lymphoïdes secondaires. Les LT CD8⁺ activés vont ensuite proliférer de façon massive (entre 15 et 20 divisions)^{27, 29, 130}. En parallèle à ces phénomènes d'activation et d'expansion, les LT CD8⁺ activés vont se différencier en LTe CD8⁺ aussi appelé lymphocytes T cytotoxiques. Il existe au moins quatre types de LTe CD8⁺ ; les EECs (*Early Effectors Cells*), les SLECs (*Short-Lived Effector Cells*), les MPECs (*Memory Precursor Effector Cells*) et les DPECs (*Double Positive Effector Cells*). Ces populations effectrices possèdent des fonctions différentes qui seront détaillées en profondeur au cours de cette section. Parallèlement à leur différenciation, les LTe CD8⁺ acquièrent des fonctions effectrices leur permettant d'éliminer l'infection (Granzymes, Perforine, TNF α , IFN γ , Fas)²⁵.

Deuxièmement, une fois le pathogène éliminé et l'infection résolue, l'immense majorité des LTe vont mourir par apoptose. En effet, il est estimé qu'entre 90 et 95% de LTe CD8⁺ meurent lors de la phase de contraction qui dure plus ou moins 7 jours après la fin de l'infection¹³¹.

Troisièmement, les LTe CD8⁺ ayant survécu à la contraction vont se développer en LTm CD8⁺. Ces LTm CD8⁺ vont assurer une protection à long terme contre leur pathogène spécifique. De plus, ils possèdent des capacités d'autorenouvellement et de survie supérieure à celle des LTn CD8⁺. Finalement, ces LTm CD8⁺ sont également hétérogènes en terme de fonctions que les LTe CD8⁺. Nous détaillerons en profondeur la génération et la pluralité des ces LTm CD8⁺ dans la section 5.

3.1 Expansion des lymphocytes T CD8⁺

Cette phase commence par l'activation des LTn CD8⁺ par des cCD matures. Afin que les LTn CD8⁺ soient pleinement activés et s'engagent sur la voie de différenciation des LTe CD8⁺, les cCD matures doivent fournir 3 signaux essentiels. Le premier signal (**Signal 1**) correspond à l'interaction du RCT avec un complexe peptide-CMH I. Le corécepteur CD8 est impliqué dans l'interaction et permet de continuer à propager le signal d'activation. Cependant, cette interaction RCT avec le complexe peptide-CMH I n'est pas suffisante pour stimuler la prolifération et la différenciation de la cellule T naïve en cellule T effectrice. Ainsi, l'activation complète des LTn CD8⁺ requière deux autres signaux supplémentaires. Le second signal (**Signal 2**) correspond à l'intégration de signaux de costimulation donnés par molécules telles que CD28. Finalement, le troisième signal (**Signal 3**) est conféré par des cytokines inflammatoires (IL-12, IFN de type I) qui vont assurer la prolifération et la survie mais aussi orienter la différenciation des LTe (**Figure 5**).

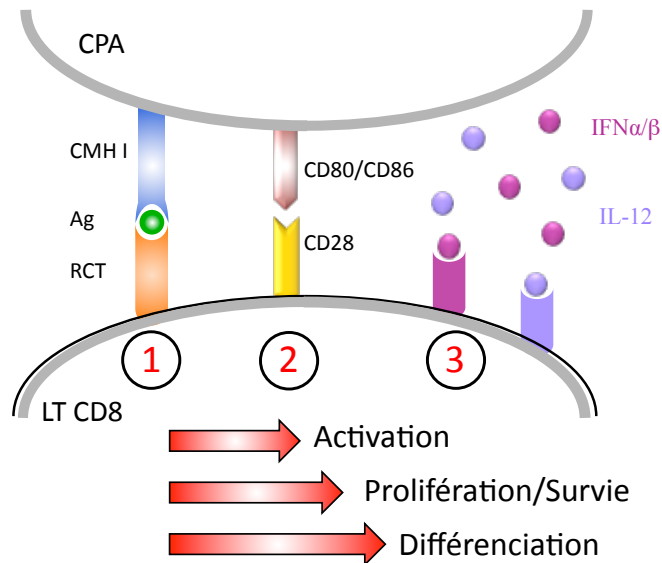


Figure 5 : Les trois signaux d'activation des LTn CD8⁺

3.1.1 Signal 1 : Reconnaissance de l'antigène et signalisation

Le RCT des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est un hétérodimère composé de deux chaînes polypeptidiques glycosylées (α et β) appartenant à la super famille des Immunoglobulines et reliées entre elles par un pont disulfure. La portion extracellulaire de chaque chaîne consiste en deux domaines ; une région constante et une région variable¹³². Ces parties variables contiennent chacune au moins trois domaines hypervariables ou CDR (*Complementary Determining Region*). Les parties variables des chaînes α et β possèdent trois CDR (CDR1, CDR2 et CDR3)¹³³. Ces CDR servent à la reconnaissance du complexe CMH-peptide (pCMH). CDR1 et CDR2 reconnaissent préférentiellement le CMH alors que le CDR3 se lie au peptide antigénique¹³⁴.

Les chaînes α et β du RCT sont aussi associées au complexe CD3 invariable qui inclue les hétérodimères CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ et l'homodimère CD3 ζ . Ce complexe CD3 est nécessaire à la signalisation du RCT car ce dernier est composé d'un très court domaine intracellulaire. Les sous-unités CD3 possèdent plusieurs éléments intracytoplasmiques nommés ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*). La phosphorylation de ces motifs ITAMs est à la base de la signalisation générée par l'interaction RCT-pCMH. Finalement, des co-récepteurs, CD4 ou CD8, selon les lymphocytes, s'associent au complexe

RCT/CD3 afin de stabiliser l'interaction RCT-pCMH. En effet, il a été montré que les corécepteurs CD4 et CD8 se lient respectivement au site invariable des CMH de classe II et I¹³⁵.

Après la reconnaissance du complexe pCMH par le RCT, la tyrosine kinase Lck va phosphoryler les motifs ITAMs des chaînes CD3. Ensuite la kinase ZAP-70 va être recrutée et va propager le signal d'activation via les molécules adaptatrices LAT (*linker for activation T cell*) et SLP76 (*SH2 domain containing leukocyte protein 76kDa*). LAT va interagir avec la phospholipase C γ (PLC γ) et induire une augmentation de l'influx calcique intracellulaire. SLP76 va recruter des GTPases de la famille Rho et engendrer une réorganisation du cytosquelette¹³⁶. La PLC γ va également activer la voie de la protéine kinase C (PKC) ainsi que la voie des Ras/MAPK. L'ensemble de cette cascade de signalisation va *in fine* conduire à l'expression des facteurs de transcription NF- κ B, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cell*) et AP-1 (*Activator Protein 1*). Ces derniers sont des facteurs clés dans l'initiation du programme génétique contrôlant la différenciation des LTe CD8⁺¹³⁶ (**Figure 6**).

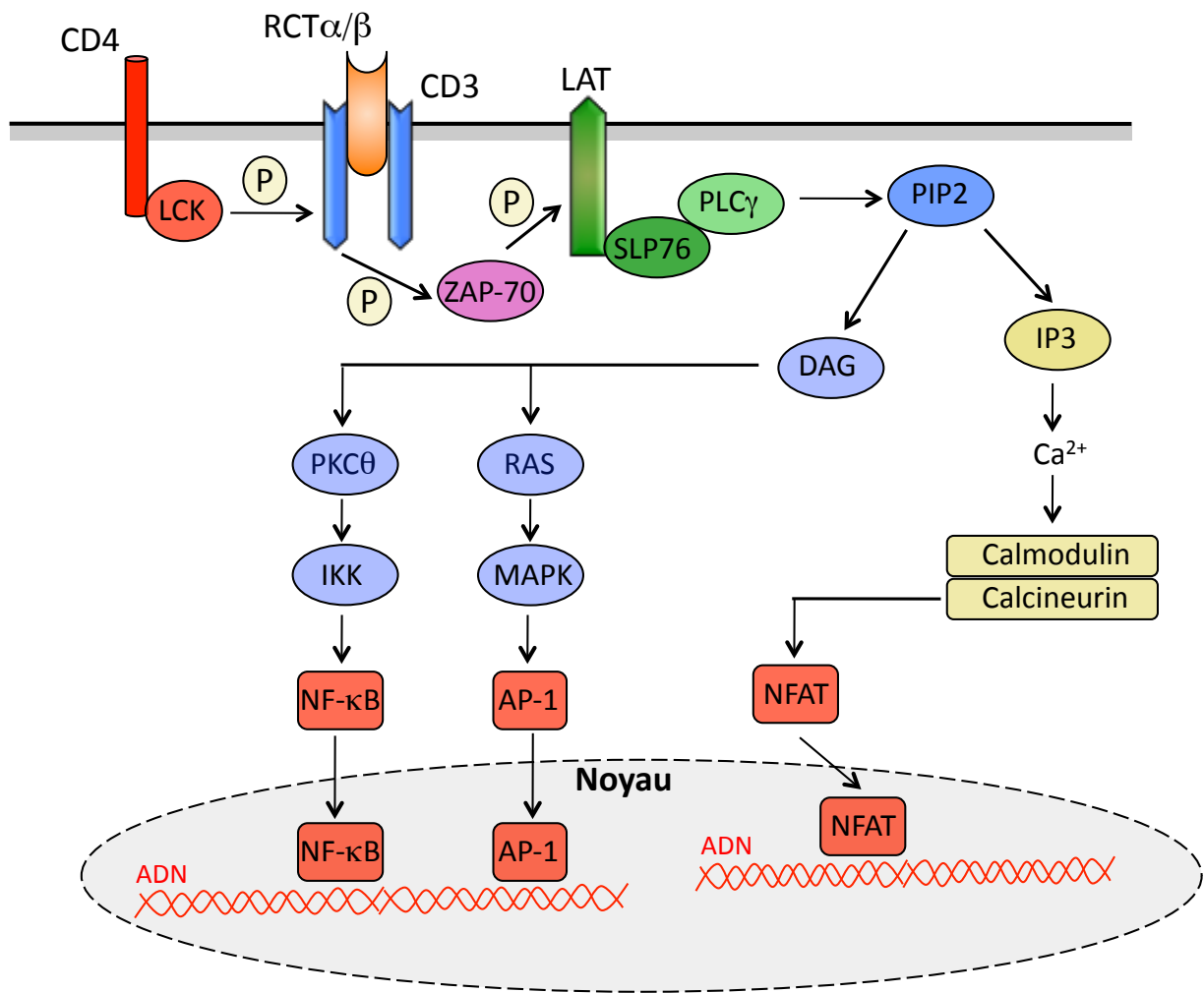


Figure 6 : La signalisation du RCT. Représentation de la signalisation induite par le RCT et qui conduit à la relocalisation nucléaire des facteurs de transcription NF- κ B, AP-1 et NFAT. Inspiré de¹³⁷.

3.1.2 Signal 2 : Co-stimulation

Comme décrit plus haut, un LTn CD8⁺ naïf requière trois signaux bien précis afin que son activation soit complète. Nous avons vu dans la section ci-dessus que le premier signal est conféré par la ligandion du RCT à son complexe pCMH I spécifique. Le second signal est donné par des molécules de costimulation qui vont induire la prolifération, la production de cytokines et la survie du LT CD8⁺ récemment activé. En l'absence de costimulation, les signaux provenant du complexe RCT-pCMH I ne sont pas suffisants pour générer une activation

complète du LTn CD8⁺. Dans ce cas, le LT CD8⁺ rentre en état d'anergie¹³⁸. Il existe deux catégories de molécules de costimulation : les membres de la super famille des Igs et les membres de la famille du récepteur au TNF (TNFR : *Tumor Necrosis Factor Receptor*). La totalité de ces molécules ne confèrent pas de signaux coactivateurs en amplifiant la signalisation procurée par le complexe RCT-pCMH I^{139, 140}. En effet, certaines d'entre elles délivrent des signaux inhibiteurs diminuant l'activation du LT CD8⁺¹⁴¹. C'est la chronologie d'apparition des signaux activateurs ou inhibiteurs qui va décider si le LT CD8⁺ activé va proliférer et se différencier en LTe ou non.

3.1.2.1 Molécules de la superfamille des Immunoglobulines

Les membres de la superfamille des Igs comprennent des éléments activateurs et inhibiteurs. Au cours de cette section, je décrirais plusieurs molécules (CD28, CTLA-4, PD-1), leurs ligands, leurs signalisations ainsi que leurs impacts sur l'activation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs.

Le récepteur CD28 fut la première protéine de costimulation identifiée¹³⁸. CD28 est exprimé de manière constitutive à la surface de toutes les cellules T naïves et ses ligands costimulateurs sont B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86). Ces derniers sont présents à la surface des CPA matures telles que les cCD. Après l'interaction avec les molécules B7, les tyrosines du domaine cytoplasmique de CD28 sont phosphorylées ce qui permet le recrutement et l'activation de la PI3 kinase (PI3K). Celle-ci va recruter et activer la kinase Akt qui va favoriser la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB¹⁴². Une fois dans le noyau, NF-κB va induire la transcription de molécules de survie telles que Bcl-X_L. En parallèle, les signaux CD28 dépendants vont, toujours via PI3K/Akt, promouvoir la production des facteurs de transcription NFAT et AP-1. Ces derniers vont accroître la transcription du gène codant pour l'IL-2 et également stabiliser l'ARN messager (ARNm) de cette cytokine^{139, 143}. Finalement, CD28 accroît l'absorption du glucose afin de soutenir la synthèse moléculaire associée à la différenciation en LTe¹⁴⁴. Ainsi la molécule CD28 soutient l'activation des LTn CD8⁺ en induisant l'expression de gènes avec diverses fonctions : prolifération, survie et modifications métaboliques.

La nécessité de signaux médiés par CD28 dans le développement d'une réponse effectrice et mémoire a souvent été débattue. En effet, selon les modèles infectieux, la réponse effectrice CD8⁺ de souris CD28^{-/-} ou CD80^{-/-} CD86^{-/-} n'est pas affectée de la même façon^{145, 146, 147, 148, 149, 150}. Par exemple, dans le cadre d'infection Influenza, VSV ou *Lm*, l'expansion des effecteurs ainsi que leurs fonctions cytotoxiques sont fortement réduites^{145, 146, 147, 149}. En revanche, lorsque des souris CD28^{-/-} ou CD80^{-/-} CD86^{-/-} sont infectées avec du LCMV Armstrong, l'expansion clonale des LT CD8⁺ endogènes spécifiques de différents épitopes ne présente aucune différence par rapport à celle des LT CD8⁺ contrôles^{145, 148}. De plus, la cytotoxicité, dans ce modèle précis, ne semble pas dépendre des signaux CD28 car l'infection virale est éliminée aussi efficacement¹⁴⁵. Il est intéressant de noter que plus les signaux RCT sont faibles et de courtes durées plus la signalisation CD28 dépendante a un impact majeur¹⁴⁵. Ainsi l'influence des signaux CD28 dépendants sur l'expansion et le développement des LT CD8⁺ est fonction du pathogène.

CD28 n'est pas la seule molécule à interagir avec CD80 et CD86. CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, CD152) est le pendant inhibiteur de CD28. En effet, CTLA-4 est un corécepteur inhibiteur capable de se lier avec B7-1 et B7-2¹⁵¹. Il y a donc compétition entre CD28 et CTLA-4 pour se lier aux ligands cités plus haut. Cependant l'interaction de CTLA-4 avec CD80/CD86 est favorisée car CD28 possède une affinité plus faible pour leurs ligands communs^{140, 152}. CTLA-4 va donc inhiber la progression des signaux d'activation en entrant en compétition avec CD28. L'expression de CTLA-4 va également engendrer l'endocytose de CD28 le rendant indisponible à la surface des LT CD8⁺¹⁵³. Finalement, l'expression de CTLA-4 va entraîner une cascade signalétique conduisant à la limitation des signaux RCT via une déphosphorylation des molécules CD3¹⁵⁴. En l'absence de CTLA-4, les souris infectées présentent une hyperprolifération et de l'autoimmunité. CTLA-4 a donc un rôle prépondérant dans le contrôle des réponses CD8⁺¹⁵⁵.

PD-1 (*Programmed death-1* ; CD279) est un autre membre de la superfamille des Igs. Cette molécule est un récepteur inhibiteur de la signalisation des LT. PD-1 est exprimé à la surface de différentes cellules activées telles que les LT, les LB, les *Natural Killer* (NK) et les monocytes. PD-1 possède deux ligands ; PD-L1 (CD274) et PD-L2 (CD273)¹⁵⁶. Alors que

PD-L1 est exprimé constitutivement sur les LT, les LB, les cCD, les macrophages et sur des cellules hématopoïétiques, l'expression de PD-L2 est induite sur les cCD activées, les macrophages et les monocytes^{141, 157}. PD-1 propage son signal inhibiteur en recrutant les phosphatases SHP1 et SHP2 (*SH2-domain containing tyrosine phosphatase 1 et 2*) qui vont déphosphoryler les molécules effectrices CD3 ζ et ZAP-70 de la signalisation du RCT^{141, 158}. De plus PD-1 limite l'activité de CD28 en bloquant ses effets sur le métabolisme du glucose et sur les protéines de survie comme Bcl-X_L¹⁴¹.

3.1.2.2 Molécules de la famille des récepteurs au TNF

Les membres de la famille des TNFR présentent un « *Death Domain* » (DD) qui les distingue des autres molécules costimulatrices. Ce DD permet le recrutement des protéines adaptatrices TRAF (*Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor*). Ces éléments vont activer différentes voies de signalisation (NF- κ B, NFAT, AP-1 et Erk) permettant l'amplification des signaux RCT et l'expression de molécules anti-apoptotiques. Au cours de cette section, j'aborderais l'impact de certaines de ces protéines sur l'activation des LT CD8⁺ (OX40, 4-1BB, CD40, CD27).

OX40 (CD134) a été premièrement identifié en 1987 sur des cellules LT CD4 de rat¹⁵⁹ mais est également présent chez les LT CD8⁺. L'expression d'OX40 n'est pas constitutive mais elle est induite lors de l'activation¹⁶⁰. Son ligand, OX40L est exprimé par les CD, les LB et les macrophages. Une étude *in vitro* a montré que OX40 régule, en synergie avec CD28, l'expression des molécules anti-apoptotique Bcl-X_L et Bcl-2 sur des LT CD4¹⁶¹. Le pic d'expression *in vivo* de OX40 est situé entre 2 et 3 jours post-immunisation ou post-infection. L'impact de OX40 sur le développement des LTe et LTm CD8⁺ varie selon le degré de virulence de l'infection^{162, 163}. En effet, des souris OX40^{-/-} infectées avec des souches très virulentes de VV présentent une génération moindre de LTe CD8⁺ endogènes par rapport aux souris contrôles^{162, 163}. De plus, ces derniers sécrètent moins d'IFN γ et de TNF α ¹⁶³. Finalement, le nombre de LTm CD8⁺ généré est plus faible¹⁶³.

L'expression du récepteur 4-1BB (CD137) est induite et maintenue lorsque les LT CD4⁺ ou CD8⁺ sont activés^{164, 165}. Cette expression n'est pas maintenue très longtemps cependant¹⁶⁶. La molécule 4-1BB est également présente à la surface des NK et *regulatory CD4⁺ T cells* (Treg). Le ligand, 4-1BBL est exprimé par les CD activées, les macrophages et les cellules B¹⁶⁷.

4-1BB a un impact majeur sur la réponse immunitaire CD8⁺ et ce dans plusieurs modèles expérimentaux. En effet, l'utilisation de souris 4-1BB^{-/-} ou 4-1BBL^{-/-} a démontré que le nombre de LTe CD8⁺ généré était fortement réduit en réponse à des infections LCMV¹⁶⁸ et Influenza¹⁶⁹. Cette réduction du nombre de LTe CD8⁺ est conjuguée à une production moindre d'IFN γ sans pour autant atténuer les fonctions cytolytiques^{168, 170}. 4-1BB est également impliqué dans la génération et la survie des LTm CD8⁺. Une administration précoce (Jour 0 à 5 post-infection avec MCMV) d'un anticorps bloquant anti 4-1BBL conduit à une réduction du nombre de LTm CD8⁺ généré¹⁷¹. De plus, 4-1BB est un médiateur induit par l'IL-15 pour assurer la survie des LTm CD8⁺ après la résolution d'une infection Influenza¹⁷². Finalement, dans ce même modèle infectieux, la réponse secondaire des LTm CD8⁺ 4-1BBL^{-/-} est moins forte que celle des LTm CD8⁺ contrôles^{173, 174}.

3.1.3 Signal 3 : Cytokines inflammatoires

Le troisième et dernier signal requis pour l'activation complète d'un LTn CD8⁺ est fourni par des cytokines inflammatoires. Pour les réponses LT CD8⁺, ce sont l'IL-12 et les IFNs de type I qui ont été principalement décrits comme responsables du signal 3^{35, 48} (**Figure 5**). Ces cytokines vont avoir un impact direct sur les LT CD8⁺ en assurant la prolifération, leur survie, leur différenciation et finalement l'acquisition de fonctions effectrices^{35, 47, 48, 175, 176, 177, 178, 179}. L'IL-12 et les IFNs de type I ne sont pas produits de manière homogène et similaire dans tous les contextes infectieux^{35, 48}. Par exemple, des infections VSV et VV induisent une sécrétion moindre d'IFNs de type I en comparaison d'une infection LCMV⁴⁸ alors qu'une infection *Lm* génère majoritairement de l'IL-12^{35, 47, 74}. Les rôles individuels de l'IL-12 et des IFNs de type I sur le devenir des LTe CD8⁺ seront précisément détaillés au cours de cette section.

3.1.3.1 IL-12

L'IL-12 est une cytokine proinflammatoire produite par les CD, les macrophages et les LB suite à la reconnaissance d'un pathogène¹⁸⁰. L'IL-12 est composée de la chaîne α ou p35 et de la chaîne β ou p40. Les LT activés induisent rapidement après leur activation l'expression du récepteur IL-12R et peuvent ainsi intégrer les signaux IL-12¹⁸¹. Plusieurs études ont montré que l'IL-12 supportait l'expansion des LTe CD8⁺ en soutenant la prolifération et la survie de ces derniers^{35, 179, 182, 183}. En effet, des souris p35^{-/-} présentent un nombre d'effecteurs LT CD8⁺ plus faible à J7 dans la rate après une infection *Lm*-OVA que les souris contrôles¹⁷⁹. Il a également été montré dans un modèle de transfert adoptif que l'expansion de LT CD8⁺ P14 IL-12R^{-/-} (P14 : LT CD8⁺ spécifiques du peptide GP₃₃ présenté par le H2-D^b) était significativement réduite en comparaison aux LT CD8⁺ P14 contrôles en réponse à une infection *Lm*-GP33³⁵. L'IL-12 participe aussi à l'acquisition des fonctions effectrices des LTe CD8⁺¹⁷⁸. En effet, l'IL-12 favorise la production d'IFN γ lors d'une infection à *Toxoplasma gondii*¹⁸⁴. Plus précisément, il a été prouvé que l'IL-12 induit l'expression de T-bet *in vitro* et *in vivo*^{74, 185}, T-bet étant un facteur de transcription favorisant l'expression des gènes codant pour l'IFN γ et le granzyme B^{74, 186, 187}, deux molécules effectrices des LTe CD8⁺.

3.1.3.2 Interférons de type I

Les IFNs de type I, reconnus pour leur activité antivirale, sont tous regroupés dans une seule famille comprenant 14 membres : 13 IFN α et l'IFN β . Le récepteur pour tout ces IFNs de type I est le récepteur IFNAR composé de deux sous-unités, IFNAR-1 et 2. Suite à la liaison d'un IFN de type I à ce récepteur, ce dernier va s'activer et induire une cascade de signalisation passant par les kinases JAK-1 et Tyk-2 qui vont phosphoryler STAT1 et STAT2. Ces deux molécules vont alors se dimériser et se relocaliser dans le noyau en compagnie d'IRF9 (*IFN Regulatory Factor 9*). Il va s'en suivre la transcription de gènes cibles des IFNs de type I¹⁸⁸. Nous avons déjà vu plus dans différents agents infectieux, dont le LCMV Armstrong, induisent une sécrétion d'IFNs de type I³⁵. Après une infection LCMV Armstrong, la survie et donc l'expansion des LTe CD8⁺ IFNAR^{-/-} est fortement réduite par rapport à celle de leur contrôle lors d'une phase primaire d'infection.^{47, 176} De plus, bien que la sécrétion de

cytokines soit préservée, les niveaux de Grz B et l'élimination du virus par les LTe CD8⁺ sont clairement compromises en l'absence d'IFNs de type I⁴⁸. Enfin, il a été récemment prouvé *in vivo* que l'IL-12 et/ou les IFNs de type I supporte l'expansion des LTe CD8⁺ en soutenant l'expression à leur surface de CD25, récepteur de haute affinité pour l'IL-2¹⁷⁷. Ces données suggèrent une redondance dans la capacité de ces deux types cytokiniques à activer les LT CD8⁺.

3.1.4 Aide CD4

Nous avons vu au cours de la section 1 que les LT CD4⁺ représentaient des populations diverses aptes à réguler les réponses immunes. L'aide précise fournie par les LT CD4⁺ aux LT CD8⁺ varie selon la stimulation antigénique, l'inflammation, les cellules étudiées (LTe CD8⁺, LTm CD8⁺ ou LTe CD8⁺ secondaires). Nous allons donc au cours de cette partie détailler l'ensemble de ces composantes et décrire en quoi elles affectent l'aide CD4⁺.

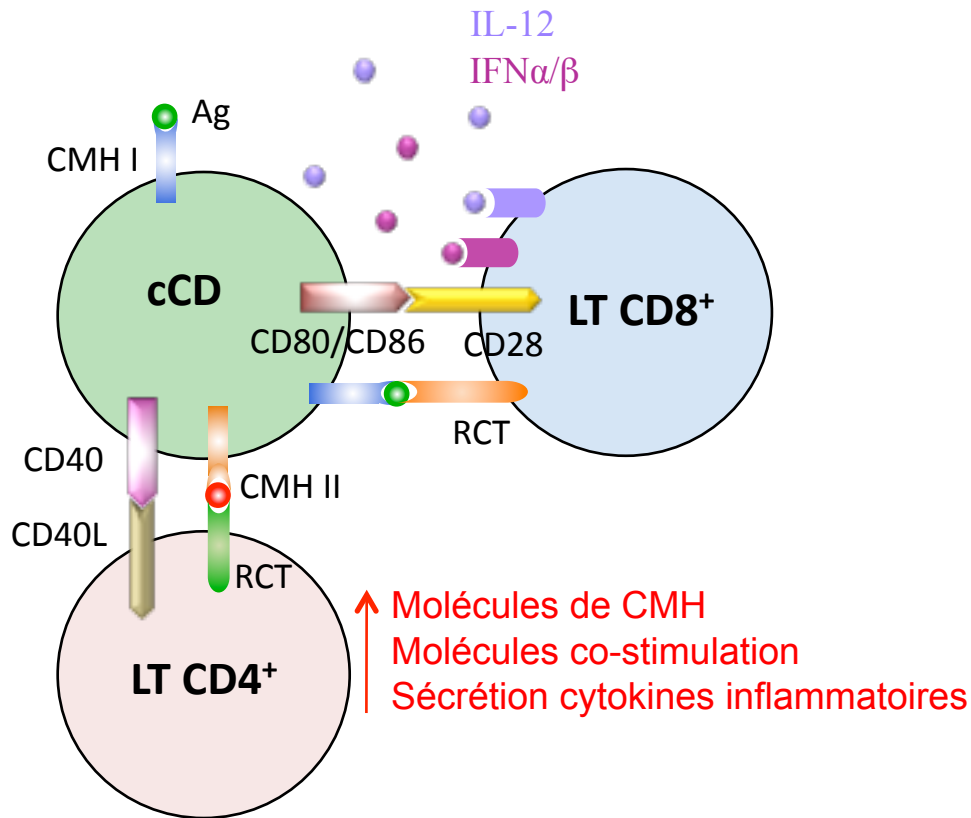


Figure 7 : L'aide CD4⁺. Les LT CD4⁺ vont fournir une aide indirecte à l'activation des LTn CD8⁺. La liaison du CD40L du LT CD4⁺ au CD40 de la cCD va induire l'augmentation des molécules de CMH, de co-stimulation et la sécrétion de cytokines inflammatoires par la cCD ce qui va favoriser l'activation du LTn CD8⁺.

L'aide CD4⁺ consiste premièrement en un support de la maturation des CPA, majoritairement des cCD, qui présenteront l'Ag aux LTn CD8⁺¹⁸⁹. En ce sens, à la suite de la reconnaissance de son Ag spécifique, un LT CD4⁺ va générer une interaction entre sa molécule CD40L et le CD40 exprimé par la cCD. Cette liaison va se traduire par une augmentation des molécules de CMH et de co-stimulation à la surface des cCD ainsi que par une sécrétion de cytokines inflammatoires nécessaires à l'activation complète des LTn CD8⁺ comme décrit plus haut^{190, 191}. Fait intéressant, la maturation des cCD via cette interaction CD40-CD40L peut être simulée en utilisant un anticorps agoniste de CD40 qui aura exactement le même effet^{190, 191}. L'aide donnée par les LT CD4⁺ aux LTn CD8⁺ est donc une aide indirecte avec les CPA comme intermédiaire (**Figure 7**). Par ailleurs, il a été montré que

les LT CD4⁺ pouvaient fournir de l'aide aux LTn CD8⁺ en présence de CPA déficientes en CD40¹⁹². Ce phénomène s'explique par le fait que les LTn CD8⁺ sont capables d'exprimer CD40 à leur surface. Ainsi, dans ce système, les LT CD4⁺ aident les LTn CD8⁺ par un contact direct entre CD40-CD40L et en présence d'une CPA assurant la présentation antigénique¹⁹². Ce modèle d'aide CD4⁺ est cependant très peu observé et n'est donc pour l'instant relevant qu'avec des antigènes cellulaires (exemple : Ag histocompatibilité Y des cellules de souris mâles)^{192, 193, 194, 195}. Donc, le modèle d'aide CD4⁺ qui fait référence dans la majorité des réponses immunes T CD8⁺ est celui où les LT CD4⁺ fournissent une aide indirecte en induisant la maturation des cCD.

L'aide CD4⁺ va se traduire de différentes manières selon que l'on regarde les LTe CD8⁺, les LTm CD8⁺ ou les LTe CD8⁺ générés après une réponse secondaire (LTe CD8⁺ secondaires). Premièrement, suite à une immunisation, l'aide CD4⁺ est absolument requise à l'induction d'une réponse CD8⁺ primaire robuste en termes de nombre de cellules mais également en ce qui concerne leur fonctionnalité^{189, 190, 191}. En revanche, la nécessité de l'aide CD4⁺ pour établir une réponse T CD8⁺ primaire efficace dans le cadre d'infection est beaucoup plus nuancée^{46, 149, 196, 197, 198}. Plusieurs études ont notamment démontré que certains agents infectieux induisaient une augmentation de molécules de co-stimulation (CD40L, CD86) sur les CPA à travers la reconnaissance du pathogène par les PRRs et généraient ainsi une réponse primaire CD4⁺ indépendante^{199, 200}. Par exemple, le virus Influenza augmente l'expression de CD40L sur les CPA activées et permet ainsi une activation des LTn CD8⁺ indépendante des LT CD4⁺¹⁹⁹. Au contraire, HSV, virus où la réponse LT CD8⁺ est LT CD4 dépendante, n'induit pas l'expression de CD40L sur des CD¹⁹⁹. Il a alors été émis l'hypothèse que l'aide CD4⁺ était requise uniquement dans le contexte d'infection inapte à induire CD40L sur les cCD¹⁹⁹. Cependant, cette théorie est contredite par le fait que des LT CD8⁺ déficients pour CD40 sont tout à fait capables de monter une réponse primaire normale à la suite d'infection Influenza, LCMV ou *Lm*^{193, 195}. D'autres facteurs sont donc impliqués dans le développement de réponses primaires LT CD8⁺ indépendantes d'aide CD4⁺. Par la suite, il a été montré que les IFNs de type I, en plus d'induire la maturation des cCD activées^{75, 78, 79}, agissaient également sur les LT CD8⁺ activés en augmentant l'expression de CD25 et la production d'IL-2²⁰⁰. Ainsi, les infections qui induisent une forte production d'IFNs de type I

comme le LCMV s'affranchissent d'une aide CD4⁺ pour l'établissement d'une réponse LT CD8⁺ primaire⁴⁶. A l'opposé, les infections, telles que VV ou *Lm*, peuvent requérir une aide des LT CD4⁺. Finalement, il ne faut pas non plus occulter le fait que des facteurs expérimentaux comme la voie d'inoculation du pathogène, la virulence des variants viraux (LCMV Armstrong ou Clone 13) ou le transfert de cellules transgéniques avant l'infection peuvent également moduler l'importance d'une aide CD4⁺.

En ce qui concerne les LTm CD8⁺, il est apparu que l'aide CD4⁺ contribuait au maintien des cellules LT CD8⁺ mémoires. En effet, des LTm CD8⁺, générés avec une infection LCMV Armstrong, voient leur nombre se réduire au cours du temps lorsqu'ils sont transférés dans des souris CMH II déficientes (CMH II^{-/-})²⁰¹. La même équipe a également démontré ces résultats dans un modèle d'infection par *Lm*, prouvant la nécessité de l'aide CD4⁺ dans divers modèles expérimentaux^{46, 202}. L'absence de l'aide CD4⁺ est associée à une diminution de l'expression de CD127 sur les LTm CD8⁺, molécule clé dans la survie des LTm CD8⁺^{201, 203}. Il est intéressant de noter que des LTe CD8⁺ générés en absence d'aide CD4⁺ expriment de haut niveau de T-bet²⁰⁴. Sachant que T-bet diminue l'expression de CD127 à la surface des LTe CD8⁺²⁰⁴, il est envisageable de penser que l'aide CD4⁺ contribuerait à réduire l'expression de T-bet afin de promouvoir l'augmentation de CD127 à la surface des LTm CD8. Il a également été montré que l'aide CD4⁺ contrôlait la capacité des LTm CD8⁺ à générer une réponse secondaire optimale. En effet, une restimulation de LTm CD8⁺ obtenus après infection de souris CMH II^{-/-} démontre un défaut d'expansion lors de la réponse secondaire²⁰². L'absence d'aide CD4⁺ lors de l'infection primaire conduit à une augmentation de l'expression du récepteur d'apoptose TRAIL (*TNF related apoptosis ligand*) sur les LTm CD8⁺²⁰⁵. Cette surexpression de TRAIL résulte en une mort massive des effecteurs secondaires issus des LTm CD8⁺ après une réinfection²⁰⁵. Inversement, des LTm CD8⁺ déficients en TRAIL développent une réponse secondaire adéquate même en absence d'aide des LT CD4⁺^{205, 206}. Cependant, des études plus récentes ont démontré que la déficience en TRAIL ne faisait que retarder et non supprimer l'effet délétère de l'absence d'aide CD4⁺ sur les réponses CD8⁺ secondaires^{206, 207}. Ainsi, la surexpression de TRAIL sur les LTm CD8⁺ à elle seule ne peut expliquer le défaut d'expansion des LTe CD8⁺ secondaires lors d'une restimulation.

3.2 Migration

Les LTn CD8⁺ ne peuvent recirculer en dehors des organes lymphoïdes secondaires, du sang et de la lymphe²⁰⁸. Cependant, la plupart des infections sont initiées en dehors des organes lymphoïdes secondaires²⁰⁹. Ainsi, une fois activés dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT CD8⁺ doivent migrer vers les tissus inflammés. La circulation des LT CD8⁺ à travers l'organisme est régulée par les sélectines, les récepteurs aux chimiokines et les intégrines^{210, 211}. Ces trois familles moléculaires sont essentielles à un processus précis conduisant à l'extravasation et à la migration des LT CD8⁺. Premièrement, les sélectines permettent l'adhésion et le « roulement » (rolling) des LT CD8⁺ sur l'endothélium vasculaire. Deuxièmement, les récepteurs aux chimiokines vont induire l'activation des intégrines ce qui va précipiter l'arrêt ferme des LT CD8⁺ sur l'endothélium vasculaire et conduire à leur sortie de l'endothélium vasculaire (diapédèse). Une fois à l'extérieur du vaisseau sanguin, les LT CD8⁺ migrent en remontant un gradient de chimiokines. Les LTn, LTe et LTm CD8⁺ présentent tous un profil d'expression de marqueurs de migration distinct. Ces différences permettent de caractériser la localisation, la maintenance et les fonctions des divers LT CD8⁺²¹¹. Nous allons détailler au cours de cette partie ces distinctions et expliquer leur impact sur l'homéostasie des LT CD8⁺.

Les LTn CD8⁺ expriment à leur surface trois marqueurs de migration principaux, L-selectin (CD62L), CCR7 et LFA-1²¹². Ces trois marqueurs permettent la maintenance et la circulation des LTn CD8⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires. CD62L se lie aux adressins périphériques des HEV (*High Endothelial Venules*). CCR7 de son côté interagit avec ses ligands CCL19 et CCL21. Finalement, l'intégrine LFA-1, en se liant à ICAM-1, va permettre l'adhésion terminale des LTn CD8⁺ aux HEV. Plus précisément, la mobilité et donc la localisation dans les organes lymphoïdes des LTn CD8⁺ dépend essentiellement de la liaison de CCR7 à ses ligands CCL19 ou CCL21²¹³. Ces deux chimiokines étant produites par des cellules endothéliales et des FRC (*Fibroblastic Reticular Cells*)²¹⁴.

Après la stimulation RCT suite à une infection, l'expression de CCR7 et de CD62L à la surface des LTn CD8⁺ est maintenue transitoirement afin de d'activer pleinement les

lymphocytes naïfs. En parallèle, les LT CD8⁺ expriment le marqueur d'activation CD69 qui a comme fonction, entre autres, d'inhiber l'expression de S1P1 molécule essentielle à la sortie des LTn CD8⁺ des organes lymphoïdes secondaires^{215, 216}. Ainsi, l'expression de CCR7, CD62L et CD69 permet aux LT CD8⁺ de compléter leur activation. Une fois l'activation complétée, les LTe CD8⁺ vont éteindre l'expression de CD62L et CCR7 pour sortir des organes lymphoïdes et migrer vers des tissus inflammés. Cette dernière s'effectue via l'expression de marqueurs de migration tels que CXCR3, CCR5 ou CCR2^{217, 218}. Il est également intéressant de noter que certains marqueurs induisent la migration spécifiquement vers un tissu particulier. Par exemple l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et du récepteur de chimiokines CCR9 conduit à une migration vers les tissus intestinaux suite à une infection LCMV Armstrong^{219, 220}. Les récepteurs aux chimiokines CCR4 et CCR10 induisent la migration vers la peau²²¹.

En ce qui concerne les LTm CD8⁺, il a été montré que les mémoires centraux expriment CD62L et CCR7 afin de se relocaliser dans les organes lymphoïdes²¹¹. A l'opposé, les effecteurs mémoires n'expriment pas ses deux marqueurs et se localisent préférentiellement dans les organes non lymphoïdes tels que le foie, les poumons ou le rein²¹¹. Enfin, les résidents mémoires sont des cellules qui restent assignées à résidence du ou des tissus où elles sont et qui ne recirculent pas²²². Nous développerons plus en détails les caractéristiques de ces différents LTm CD8⁺ au cours de la section 5. L'équipe de Von Andrian a montré dans un modèle d'infection LCMV Armstrong que les LTm CD8⁺ des ganglions expriment fortement CXCR3 par rapport aux LTn CD8⁺, ce qui a pour effet d'induire une migration rapide vers les zones où sont colocalisés les CPA et les macrophages producteurs de CXCL9/CXCL10²²³. Dans la même étude, des LTm CD8⁺ déficients pour CXCR3 contrôlent moins efficacement une infection secondaire que les LTm CD8⁺ CXCR3 compétents alors que les deux types cellulaires sont aussi capables de sécréter *in vitro* de l'IFN γ . Ces données sur CXCR3 prouvent qu'une migration rapide vers les CPA est essentielle pour pouvoir rapidement contrôler une réinfection.

L'ensemble de ces informations montre que la régulation de l'expression des marqueurs de migration est un élément majeur dans le développement à la fois des LTe CD8⁺ mais également des LTm CD8⁺. Peu d'études ont mis en lumière l'impact des cytokines de la famille γ_c sur l'expression des marqueurs de migration cruciaux dans le développement des LTe et LTm CD8⁺. Nous nous attarderons au cours de la section 3 de la partie résultats à éclaircir ce sujet.

3.3 Caractéristiques et fonctions des LT CD8⁺ effecteurs

Une fois correctement activé, le LT CD8⁺ va subir de profondes modifications le conduisant à un statut d'effecteur. Premièrement, le LT CD8⁺ va acquérir un phénotype spécifique des LTe CD8⁺. Il va diminuer voir éteindre l'expression de marqueurs de LTn CD8⁺ tels que CD62L, CCR7 et CD127. En parallèle, l'expression de CD28, CD69, Ly6C, CD11a, CD44, CD25, CXCR3, CCR5, CD27, CD43 et KLRG1 va progressivement s'accroître. Ces changements phénotypiques caractérisent la transition d'un état naïf à un état effecteur lors d'une réponse lymphocytaire CD8⁺ à un pathogène ou à une immunisation^{224, 225, 226}. Deuxièmement, le LT CD8⁺ activé va acquérir un métabolisme énergétique spécifique des LTe CD8⁺^{137, 227}. Troisièmement, ce LT CD8⁺ activé va massivement proliférer afin de générer un contingent d'effecteurs considérable. La capacité à s'expandre de façon intense suite à un stimulus est propre aux cellules immunes et en particulier aux lymphocytes. Un LT CD8⁺ activé peut subir entre 15 et 20 rondes de divisions cellulaires^{27, 29, 228}. Ainsi, au pic de la réponse, la quantité de LTe CD8⁺ peut représenter 10⁴ à 10⁵ fois le nombre de précurseurs naïfs initiaux^{27, 29, 228}. Quatrièmement, le LT CD8⁺ va intégrer divers signaux qui réguleront sa différenciation en SLECs ou en MPECs^{229, 230}. Ces deux populations émergent d'un progéniteur commun, la population EEC, mais elles ont cependant des caractéristiques bien distinctes^{230, 231}. Finalement, le LT CD8⁺ va acquérir des fonctions effectrices telles que la sécrétion de cytokines (IL-2, TNF α , IFN γ) et la cytolysse qui vont lui permettre d'éliminer ses cellules cibles^{25, 232, 233}. L'ensemble de ces modifications est consécutif à l'expression d'un panel de gènes spécifiques d'une transition de l'état naïf à l'état effecteur chez le LT CD8⁺. En effet, des analyses de signature géniques ont mis en évidence qu'environ 4000 gènes sont différemment exprimés entre un LTn et un LTe²²⁵. Au cours de cette section, nous

développerons chacune des spécificités des LTe CD8⁺ et détaillerons les molécules impliquées dans ces dernières.

3.3.1 Transition métabolique

Depuis quelques années plusieurs études ont exploré l'impact du métabolisme énergétique sur la réponse immune CD8^{+137, 227, 234, 235}. La production d'Adénosine Triphosphate (ATP) est essentielle afin de fournir l'énergie requise aux fonctions cellulaires de toutes cellules, quiescentes ou activées. Cette ATP peut être générée par deux voies métaboliques bien distinctes : la glycolyse et la phosphorylation oxydative (OXPHOS). La glycolyse induit la conversion du glucose en pyruvate dans le cytosol et pendant cette réaction deux molécules d'ATP sont synthétisées. L'OXPHOS comprend deux réactions et se déroule dans la mitochondrie. Premièrement, le cycle de Krebs (TCA) va générer des cofacteurs réduits tels que NADH et FADH₂ à partir de la dégradation de pyruvate. Deuxièmement, NADH et FADH₂ vont fournir des électrons à une chaîne de transport d'électrons ou chaîne respiratoire engendrant une cascade de réactions résultant en une production nette de 34 molécules d'ATP. La glycolyse et l'OXPHOS ne sont pas exclusifs et peuvent fonctionner ensemble. En effet, le pyruvate produit lors de la glycolyse peut-être transformé en acétyl-CoA et celui-ci entrer dans le TCA afin de générer du NADH et du FADH₂, indispensables à l'OXPHOS.

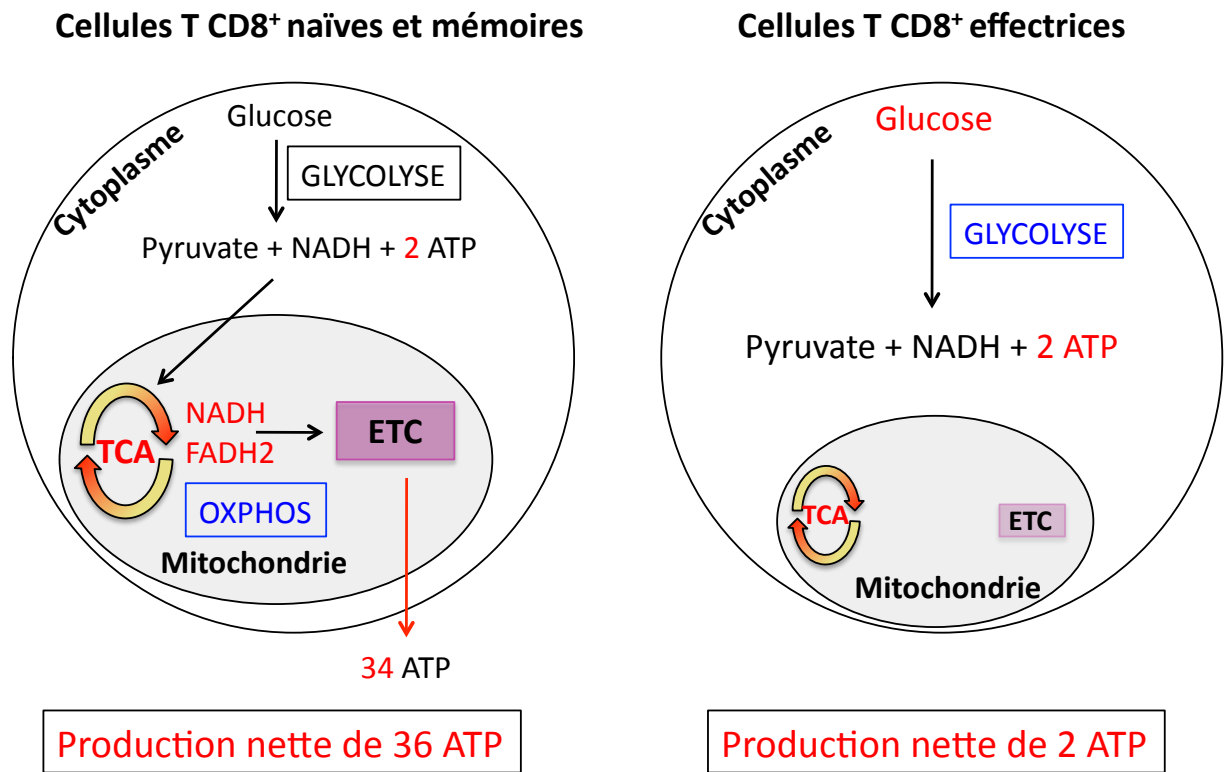


Figure 8 : Les voies métaboliques produisant de l'ATP.

Les L_{Tn} CD8⁺ et les L_{Tm} utilisent l'OXPHOS afin de produire leur ATP alors que L_{Te} CD8⁺ ont recours à la glycolyse (**Figure 8**)^{137, 227, 236}. Cette utilisation de la glycolyse comme source d'ATP a été initialement décrite dans des cellules cancéreuses par Otto Warburg et est dorénavant décrit comme le « Warburg effect »²³⁷. Cette transition métabolique du L_T CD8⁺ est secondaire à la réception des signaux activateurs fournis par le RCT et CD28^{144, 238}. Afin de soutenir une prolifération intense ainsi qu'une synthèse très accrue de protéines effectrices, le L_{Te} CD8⁺ requière une quantité importante d'énergie et donc d'ATP. Il est donc paradoxal que les cellules activées usent de la glycolyse, métabolisme peu efficace dans la production d'ATP, par rapport à l'OXPHOS. Une explication pourrait être le fait que la glycolyse, contrairement à l'OXPHOS, permet la génération de molécules requises dans la synthèse des acides aminés, des acides nucléiques et des lipides²³⁹. Il est intéressant de noter que tous ces éléments sont cruciaux dans le développement d'une prolifération optimale²³⁹. Par ailleurs, afin de maximiser la production d'ATP par la glycolyse, les signaux TCR et

CD28 augmentent l'expression du récepteur au glucose (GLUT-1) à la surface du LTe^{144, 238}. Un apport limité en glucose résulte *in vitro* en une prolifération altérée et des fonctions effectrices restreintes^{240, 241}. Une étude récente a cependant démontré dans un modèle d'étude de stimulation *in vitro* de LT CD4⁺ que la glycolyse n'était pas forcément indispensable à la prolifération des lymphocytes mais qu'elle est plutôt requise pour la traduction des ARNm codant pour l'IL-2 et l'IFN γ ²⁴². Parallèlement, il a été montré qu'une inhibition de la glycolyse chez les LT CD8⁺ conduisait à une réduction de la production de molécules effectrices (IFN γ , Granzyme B et Perforine)^{240, 243, 244, 245}. L'ensemble de ces données indique que le métabolisme représente un facteur clé afin de pleinement supporter la prolifération et l'acquisition des fonctions effectrices des LTe CD8⁺.

3.3.2 Les différents types d'effecteurs

La population de LTe CD8⁺ générée après la phase d'activation et d'expansion ne représente pas une population uniforme. Il existe en effet au moins quatre sous-types de LTe CD8⁺ qui sont définis par des expressions distinctes de CD127 et de KLRG1 (*Killer cell Lectin-like Receptor subfamily G member 1*)^{185, 225} (**Figure 9**). La première population est nommée EEC et se caractérise phénotypiquement comme n'exprimant que peu ou pas CD127 et KLRG1 (CD127^{faible} KLRG1^{faible})²³¹. Cette population est détectable généralement 3 jours après le début de la réponse LT CD8⁺ et ce dans plusieurs types d'infections (LCMV, VSV ou *Lm*)^{225, 231}. Les EECs sont considérés comme des cellules progénitrices aptes à générer deux autres populations effectrices ; les SLECs (CD127^{faible} KLRG1^{élevé}) et les MPECs (CD127^{élevé} KLRG1^{faible})²³¹. En effet, des EECs OT-I (LT CD8⁺ spécifiques du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ de l'ovalbumine présenté par le H2-K^b) triés 5 jours après une infection VSV-OVA et transférés dans des souris « match-infected » sont capables de se différencier à la fois en SLECs mais aussi en MPECs²³¹. Par chronologie, KLRG1 est plus rapidement exprimé que CD127 sur les LTe CD8⁺ ainsi les SLECs sont plus rapidement détectables que les MPECs. Ces derniers commencent à être observables au pic de la réponse LT CD8⁺ lorsque CD127 commence à être réexprimé^{230, 231}. Finalement, une quatrième population nommée DPECs (CD127^{élevé} KLRG1^{élevé}) est également présente lors de la phase effectrice mais ses origines et ses fonctions n'ont été que très peu étudiées.

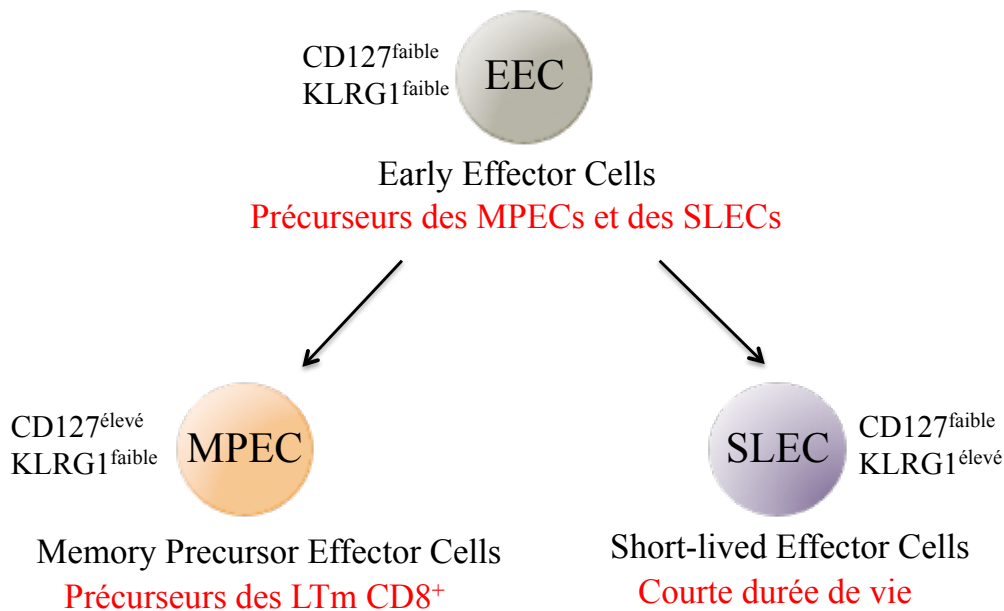


Figure 9 : Les différents sous-types de LTe CD8⁺. Représentation des différents sous-types de LTe CD8⁺.

Les SLECs et les MPECs constituent deux populations de LTe CD8⁺ majeures et dont le développement et les fonctions ont été particulièrement décryptés à travers différents modèles expérimentaux (**Figure 9**)^{97, 185, 225, 230, 231}. L'équipe d'Ahmed a démontré que des niveaux d'expression hétérogènes de KLRG1 permettent de distinguer précocement les précurseurs des SLECs et des MPECs²²⁵. En effet, 4 jours après une infection LCMV Armstrong, des LTe KLRG1^{élevé} transférés dans des souris « match-infected » se différencient en SLECs et subissent finalement une apoptose massive. En parallèle, le transfert adoptif de LTe KLRG1^{faible} se traduit par une génération majoritaire de MPECs qui eux survivent à long terme. Ces résultats font écho à une étude de 2003, toujours par le laboratoire de Ahmed, où 8 jours après une infection avec LCMV Armstrong, des LTe CD127^{élevé} triés et transférés dans des souris « match-infected » ont généré un réservoir de LTm CD8⁺ aptes à répondre à une infection secondaire²³⁰. Ces données ont également été confirmées dans d'autres modèles expérimentaux tels que *Lm* et VSV^{231, 246}. Ainsi, les SLECs, comme leur nom l'indique, sont des cellules avec une durée de vie restreinte et destinées à mourir alors que les MPECs sont

des précurseurs des futurs LTm CD8⁺. Fait intéressant, bien que ces deux populations effectrices aient un devenir bien distinct, leurs fonctions effectrices sont identiques. En effet, les MPECs sont tout aussi capables de sécréter du Granzyme B (Grz B), la perforine et des cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α) que les SLECs¹⁸⁵. Les MPECs semblent cependant produire plus d'IL-2 que les SLECs en réponse à une stimulation *ex vivo*²²⁵.

Comprendre comment un LTe CD8⁺ est amené à se différencier en SLEC ou en MPEC est d'un intérêt capital compte tenu du destin respectif de ces deux types cellulaires. Durant la dernière décennie, plusieurs études ont mis en lumière le fait qu'un LTe CD8 était sous l'influence de multiples molécules avant de s'orienter vers SLEC ou MPEC. En effet, différents acteurs tels que des cytokines ou des facteurs de transcription contrôlent le développement des SLECs et/ou des MPECs. Nous détaillerons ci-dessous l'ensemble des participants ayant leur mot à dire dans le choix de différenciation des LTe CD8⁺.

3.3.2.1 Inflammation

Nous avons déjà vu plus haut que les cytokines inflammatoires constituaient le signal 3 d'activation des LTn CD8⁺. Elles ont notamment pour rôles de soutenir la prolifération des LTe CD8⁺ et leur survie mais facilitent aussi l'acquisition des fonctions effectrices. En parallèle, plusieurs études ont démontré que l'environnement inflammatoire associé à divers stimuli antigéniques influait sur la différenciation SLEC/MPEC^{35, 74, 185, 198, 231, 247, 248}. Toutes ces études ont prouvé que les cytokines inflammatoires (IL-12, IFNs de type I) tendent à promouvoir le développement des effecteurs KLRG1^{élevé} ou plus précisément des SLECs. En effet, l'IL-12 est un élément essentiel au développement optimal d'une population CD62L^{faible} KLRG1^{élevé} au pic de la réponse après une infection avec *Toxoplasma gondii*¹⁸⁴. Des expériences faites avec *Lm* ou VSV généralisent le fait que l'IL-12 induise la différenciation en SLECs des LTe CD8⁺ dans différents modèles infectieux^{35, 247}. De plus, l'ajout d'IL-12 lors d'immunisations avec des CD favorise la génération de SLECs au pic de la réponse²⁴⁹. Les IFNs de type I sont également capables d'induire le développement des SLECs^{35, 198}. Des LTe CD8⁺ IFNAR^{-/-} présentent une proportion de SLECs moindre par rapport aux LTe CD8 contrôles dans le cadre d'infection LCMV et VSV^{35, 198}. En accord avec l'ensemble de ces résultats, des LTe CD8⁺ déficients pour les signalisations IL-12 ou IFNs de type I dépendantes

présentent rapidement des caractéristiques des LTm CD8⁺ telles qu'une réexpression précoce des marqueurs CD127 et CD62L mais aussi une sécrétion accrue d'IL-2^{35, 74, 179, 198}. Toutes ces données prouvent, encore une fois, que l'IL-12 et les IFNs de type I présentent une redondance certaine dans leur capacité à orienter une réponse effectrice CD8⁺.

Fait intéressant, l'inflammation générée par le pathogène n'est pas le seul facteur spécifique de l'agent infectieux qui favorise la génération des SLECs. Un contact prolongé avec l'antigène oriente le LTe CD8⁺ vers une différenciation SLEC²²⁵. De la même manière, limiter la stimulation antigénique favorise le développement des MPECs. L'ensemble de ces composantes suggère que chaque modèle expérimental va présenter un patron qui lui est spécifique au niveau des proportions de SLECs et de MPECs. Par exemple, une infection VSV favorise la différenciation des MPECs alors qu'une infection *Lm* semble plutôt faciliter la génération des SLECs²⁴⁸. Par ailleurs, dans le cadre d'une infection à LCMV Armstrong, à J7 pi, le pourcentage de SLECs générés est plus élevé que dans n'importe quel autre modèle infectieux. Ceci témoigne d'une quantité importante de signaux favorisant la différenciation des SLECs dans un modèle LCMV Armstrong (IFNs de type I, cytokines de la famille γ_c).

3.3.2.2 T-bet/Eomesodermin

Ces deux facteurs de transcription appartiennent à la famille des facteurs de transcription T-box. T-bet est codé par le gène *Tbx21* alors qu'Eomesodermin (Eomes) est transcrit à partir du gène *Eomes*. T-bet est exprimé par les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ alors qu'Eomes est uniquement exprimé par les LT CD8⁺ activés. L'expression de T-bet est rapidement induite par les signaux RCT, l'IL-12 et les IFNs de type I^{74, 178, 185, 186, 198}. Eomes lui est induit plus tardivement lors de la réponse immune et ce de manière RUNX3 dépendante^{186, 250}.

T-bet et Eomes sont connus pour avoir de multiples fonctions dans le développement d'une réponse LT CD8⁺. T-bet et Eomes participent notamment à l'acquisition de l'arsenal effecteur permettant aux LTe CD8⁺ d'éliminer leurs cellules cibles. T-bet est requis pour la transcription de gènes codant pour l'IFN γ et Grz B^{74, 186, 187}. Eomes peut se substituer à T-bet

pour induire l'expression de ces deux molécules mais régule également la production de perforines^{179, 186, 250}. Du fait de la temporalité dans leur expression respective, T-bet et Eomes semblent donc complémentaires dans le soutien à l'acquisition des fonctions effectrices. Cependant, ces deux facteurs de transcription sont également fonctionnellement redondants. En effet, des LTe CD8⁺ déficients soit en T-bet soit en Eomes voient leurs fonctions effectrices très faiblement altérées^{187, 251}. En revanche, une délétion combinée de T-bet et Eomes résulte en un défaut majeur de production d'IFN γ , de Grz B et de perforine²⁵². En effet, au cours d'une infection LCMV, ce phénotype conduit à une cytotoxicité fortement réduite des LTe CD8⁺ et est associé à une production aberrante d'IL-17²⁵².

T-bet est aussi défini comme facteur de transcription apte à influencer la différenciation des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺. Sur les LT CD4⁺, T-bet est connu pour favoriser le développement des LT CD4⁺ Th1²⁵³. Sur les LT CD8⁺, T-bet est associé à la génération des SLECs. Phénotypiquement parlant, T-bet induit l'expression de KLRG1 sur les LTe CD8⁺¹⁸⁵. De la même manière, l'induction de KLRG1 sur des cellules NK est T-bet dépendante²⁵⁴. En parallèle, T-bet est également capable de réprimer l'expression de CD127 à la surface des LTe CD8⁺ suite à une infection LCMV²⁰⁴. Ainsi, T-bet apparaît comme essentiel et suffisant à la différenciation des SLECs et à l'inhibition du phénotype MPECs¹⁸⁵. Contrairement à T-bet, Eomes est plus exprimé dans les MPECs que dans les SLECs^{74, 185, 255}. Ainsi, la balance d'expression de ces deux facteurs de transcription au sein d'un même LTe CD8⁺ va définir le développement de cet effecteur en SLEC ou en MPEC^{255, 256}. Nous avons vu précédemment que les signaux inflammatoires favorisaient la différenciation des SLECs par rapport aux MPECs. Ceci s'explique par le fait qu'*in vitro* et *in vivo* l'IL-12 et les IFNs de type I induisent l'expression de T-bet^{74, 185, 198}. De plus, il a aussi été prouvé que l'IL-12 inhibe l'expression d'Eomes⁷⁴. En conclusion, les signaux inflammatoires orientent la différenciation des LTe CD8⁺ en SLECs en modifiant la balance d'expression de T-bet et Eomes en faveur de T-bet.

3.3.2.3 Foxo1/mTOR

Foxo1 est un membre de la classe O de la famille des facteurs de transcription Forkhead box^{257, 258, 259}. Il existe trois autres membres de cette classe O ; Foxo3, Foxo4 et Foxo6^{257, 258}. Foxo1 est le principal à avoir un impact sur la réponse immune T CD8⁺ même si

une déficience en Foxo3 résulte en une apoptose réduite et une accumulation des MPECs durant une infection LCMV Armstrong²⁶⁰. Plusieurs études ont montré qu'une déficience en Foxo1 n'affectait ni l'expansion ni les fonctions cytotoxiques des LTe CD8⁺ au cours d'infections primaires avec *Lm*-OVA ou LCMV Armstrong^{261, 262, 263}.

Plusieurs études ont montré qu'une déficience génétique en Foxo1 conduit à une augmentation de la proportion des SLECs^{261, 262, 263}. Ces études, ayant été effectuées dans des modèles infectieux *Lm* et LCMV Armstrong, montrent qu'en absence de Foxo1, la proportion de cellules CD127⁺ et CD62L⁺ est réduite au pic de la réponse immune et même lors de la phase contraction^{261, 262, 263}. Ces résultats s'expliquent notamment par le fait que Foxo1 contrôle l'expression de CD127 et CD62L, deux marqueurs spécifiques des précurseurs mémoires²¹². Ainsi, Foxo1 est un facteur de transcription qui semble être fortement exprimé chez les MPECs et plutôt inhibé dans les SLECs²⁶¹.

3.3.2.4 Blimp-1/Bcl-6

Blimp-1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*) et Bcl-6 sont deux répresseurs transcriptionnels avec des fonctions antagonistes sur le destin des LTe CD8⁺²⁶⁴. Originellement, ces deux facteurs de transcription ont été identifiés dans les LB puis diverses études ont démontré que Blimp-1 et Bcl-6 étaient également impliqués dans les réponses immunes lymphocytaire T²⁶⁴. Blimp-1 est codé par le gène *Prdm1* qui est fortement transcrit par les LTe CD8⁺ à la suite des signaux cytokiniques IL-2, IL-12 et IL-21^{250, 265, 266, 267, 268}. L'expression de Blimp-1 est maximale chez les LTe CD8⁺ et diminue fortement une fois que la réponse immune est achevée²⁶⁹. A l'opposé, la transcription de Bcl-6 est induite suite à l'activation des LTe CD8⁺ et augmente chez les LTm CD8⁺²⁷⁰.

Tout comme T-bet et Eomes, Blimp-1 et Bcl-6 sont capables d'agir sur les fonctions effectrices des LTe CD8⁺. Premièrement, les LTe CD8⁺ Blimp-1^{-/-} sont limités dans leur capacité à migrer vers les poumons dans le cadre d'une infection à Influenza. En effet, les LTe CD8⁺ Blimp-1^{-/-} spécifiques de Influenza maintiennent une expression élevée des ARNm codant pour CCR7 mais n'augmentent pas la quantité d'ARNm codant pour CCR5, ce dernier étant requis pour la migration vers les poumons²⁷¹. A cause de cette incapacité à migrer vers

les sites infectieux, l'élimination complète du pathogène est fortement altérée²⁷¹. Deuxièmement, Blimp-1 a été montré comme augmentant la production de cytokines effectrices (IFN γ , TNF α) et de molécules cytotoxiques (Grz B, perforine) dans des modèles d'infections (LCMV, Influenza)^{269, 271, 272} mais également dans des modèles d'immunisation avec des CD²⁷³. Troisièmement, Bcl-6, contrairement à T-bet, Eomes et Blimp-1, a été montré comme apte à restreindre l'expression du Grz B au sein de LTe CD8⁺ *in vitro*²⁷⁴. Quatrièmement, à travers des travaux sur des LT CD4⁺, il a été prouvé que Bcl-6 pouvait interagir avec T-bet^{275, 276}. Cette interaction entre Bcl-6 et T-bet pourrait avoir deux effets bien distincts. D'un côté, Bcl-6 pourrait réprimer l'expression des gènes cibles de T-bet et de l'autre T-bet pourrait bloquer le site de liaison de Bcl-6 avec l'ADN et ainsi limiter le nombre de gènes réprimés par Bcl-6.

Au sein des LTe CD8⁺, Blimp-1 est plus exprimé chez les SLECs que chez les MPECs²⁶⁹. Ce fait a conduit à penser que Blimp-1 faisait partie des composantes induisant la différenciation des SLECs. Cette hypothèse a été confirmée dans des modèles infectieux (LCMV, Influenza) et non infectieux (immunisation de CD) où des LTe CD8 Blimp-1^{-/-} voyaient leur développement en SLECs fortement réduits au pic de la réponse^{267, 269, 271, 273, 277}. A l'opposé, la déficience en Blimp-1 résulte en une augmentation importante de la proportion de MPECs parmi les LTe CD8⁺. Afin de promouvoir la différenciation en SLECs, Blimp-1 réprime la transcription de gènes spécifiques aux précurseurs mémoires tels que CD27²⁷⁷. Blimp-1 influence également le devenir des LTe CD8⁺ en modifiant l'expression d'autres facteurs de transcription tel que Bcl-6 bien sûr mais également T-bet et Eomes^{269, 271}. En ce qui concerne Bcl-6, son expression est plus importante chez les MPECs^{269, 270}. Il n'a pas été clairement prouvé que Bcl-6 favorise le développement des progéniteurs mémoires. Cependant, il a été montré qu'une surexpression de Bcl-6 induit une augmentation de nombre de LTm CD8⁺ alors qu'une déficience conduit à une réduction massive de ces mêmes LTm CD8⁺^{278, 279}. Il est donc légitime de penser que Bcl-6 est un élément de plus à considérer en tant qu'acteur dans la génération des MPECs. De plus, le fait que Bcl-6 soit capable de réprimer la transcription de *Prdm1*, gène codant pour Blimp-1, supporte cette idée²⁶⁴.

3.3.2.5 Id2/Id3

Inhibitor of DNA binding 2 (Id2) et *Inhibitor of DNA binding 3* (Id3) sont une autre paire de facteurs de transcription impliquée dans le développement des LTe CD8⁺. Comme Blimp-1 et Bcl-6, ces molécules sont des répresseurs transcriptionnels. Id2 et Id3 opèrent notamment en inhibant la liaison à l'ADN des facteurs de transcription que sont les protéines E^{269, 280, 281}. L'expression d'Id2 et Id3 augmente suite à l'activation des LTe CD8⁺ mais leurs actions respectives n'interviennent pas au même moment de la réponse. Id2 supporte la survie des LTe lors de la transition de l'état naïf à l'état activé en augmentant l'expression de molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2²⁸². En effet, suite à une infection à *Lm*, des LTe CD8⁺ Id2^{-/-} présentent une expansion réduite au pic de la réponse principalement due à un défaut de survie²⁸². Id3 quant à lui soutient la survie des LTe CD8⁺ lors de la transition de la phase effectrice vers la phase mémoire^{280, 281}. Par exemple, une déficience en Id3 ne modifie pas le nombre de LTe CD8⁺ au pic d'une réponse à VV mais conduit à un contingent de LTm CD8⁺ généré fortement réduit²⁸⁰. En parallèle, une surexpression d'Id3 soutient la survie d'effecteurs qui devraient normalement mourir lors de la phase de contraction^{280, 281}.

Id2 et Id3 sont également impliqués dans la différenciation en SLEC ou en MPEC des LTe CD8⁺. Id2 apparaît comme nécessaire au développement des SLEC suite à une infection avec *Lm*²⁸¹. A l'opposé, Id3 est requis pour la génération des précurseurs des LTm CD8^{280, 281}. Par exemple, au pic de réponses immunes à VSV ou *Lm*, une forte expression d'Id3 permet de distinguer les cellules en voie d'acquies un phénotype MPEC²⁸¹. Comme T-bet/Eomes ou Blimp/Bcl-6, Id2 et Id3 sont exprimés à la fois dans les SLECs et les MPECs et c'est donc le ratio d'expression Id2/Id3 qui va orienter la différenciation du LTe CD8⁺ vers l'un ou l'autre sous-type d'effecteurs. Ce ratio est en faveur d'Id2 pour les SLECs et est en faveur d'Id3 chez les MPECs^{280, 281, 282}.

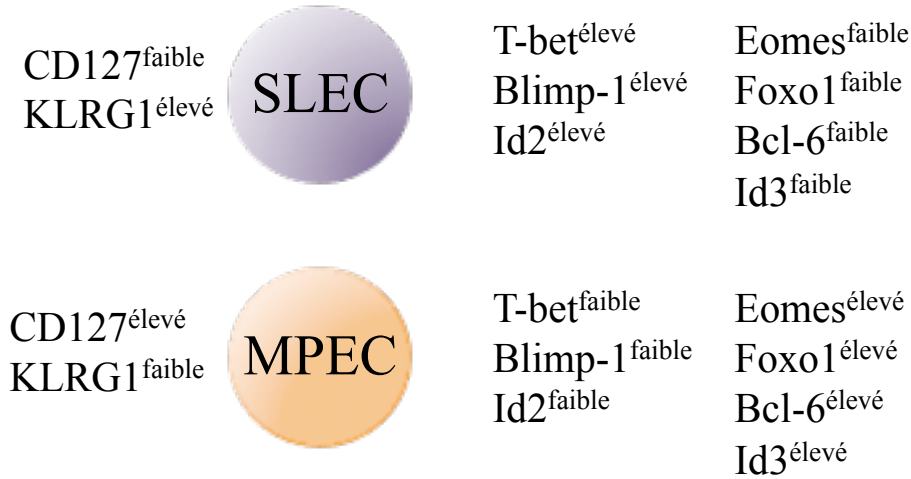


Figure 10 : Les facteurs de transcription orientant la différenciation des SLECs/MPECs.

Expression relative des facteurs de transcription par les SLECs et MPECs

Nous avons vu dans cette partie plusieurs paires de facteurs de transcription impliquées dans le choix de différenciation des LTe CD8⁺ en SLECs ou en MPECs (**Figure 10**). Au sein de ces paires, un facteur de transcription semblait plutôt favoriser le développement des SLECs alors que l'autre tendait à promouvoir la génération des MPECs. Un tel mimétisme suggère des fonctions redondantes et/ou compensatoires. Par exemple, une étude récente montre que le défaut de différenciation en SLECs résultant d'une déficience en Blimp-1 peut être relativement compensé par une surexpression de T-bet²⁶⁷. De plus, l'ensemble de ces facteurs de transcription ne peut être enfermé dans une vision binaire où chaque paire agirait indépendamment des autres. En effet, il existe de nombreuses interactions entre ces binômes transcriptionnels. Blimp-1 est capable de modifier l'expression de T-bet, d'Eomes mais aussi d'Id3^{269, 271, 280}. Bcl-6 peut interagir avec T-bet^{275, 276} alors que Foxo1 peut promouvoir l'expression d'Eomes en inhibant les fonctions de T-bet^{256, 283}. Ainsi, le LTe CD8⁺ est soumis et doit intégrer de multiples combinaisons de signaux influant sur son devenir. Finalement, cette liste de facteurs de transcription contrôlant la génération des SLECs et des MPECs n'est pas exhaustive et d'autres acteurs peuvent encore rajouter à la complexité du réseau moléculaire gouvernant ce choix de différenciation.

3.3.3 Fonctions effectrices

La majorité des virus et certaines bactéries se multiplient dans le cytoplasme des cellules infectées. Bien que sensibles aux anticorps avant leur entrée dans les cellules, une fois à l'intérieur, ces pathogènes deviennent inaccessibles aux anticorps et ne peuvent être éliminés que par la destruction des cellules infectées. Cette tâche incombe aux LTe CD8⁺ aussi appelés lymphocytes cytotoxiques. Dans le but d'induire l'apoptose des cellules cibles, les LTe CD8⁺ disposent d'un arsenal de fonctions effectrices²⁵. Premièrement, ils peuvent sécréter des molécules cytotoxiques (perforine, granzymes). Deuxièmement, ils peuvent provoquer l'apoptose via des récepteurs de mort (FAS, TNFR, TRAILR). Troisièmement, ils induisent la mort cellulaire en sécrétant des cytokines effectrices (IFN γ , TNF α). Au cours de cette partie, nous détaillerons plus précisément les mécanismes impliqués dans les activités cytotoxiques des LTe CD8⁺.

3.3.3.1 Perforine/Granzymes

La voie principale d'action d'une cellule T effectrice est la libération de granules cytotoxiques. Ces granules cytotoxiques sont libérées par exocytose au niveau de l'interface entre la cellule infectée et le LTe CD8⁺²⁸⁴. Ces granules sont principalement constituées de perforines et granzymes. Chacune de ces deux molécules a un impact précis sur l'efficacité de la cytotoxicité des lymphocytes. Premièrement, la perforine, qui est présente sous forme de monomère dans les granules, une fois libérée par exocytose, va se polymériser à la surface de la cellule cible afin de former un pore cylindrique^{284, 285, 286}. La création de tels pores va permettre l'entrée des granzymes dans le cytosol de la cellule infectée mais va également générer un gradient calcique conduisant à l'apoptose²⁸⁵. Cependant, certaines études contredisent ce phénomène en suggérant que les pores sont trop petits pour favoriser l'entrée de molécules comme les granzymes^{287, 288}. En parallèle, les granzymes sont capables de pénétrer dans les cellules cibles en se liant à des ligands extracellulaires (mannose-6-phosphate) ou via des endosomes fusionnant avec la membrane cellulaire²⁸⁹. Dans ce dernier cas, le couple granzyme/perforine est internalisé par endocytose et va pouvoir *in fine* induire la mort cellulaire^{290, 291}. Les granzymes sont des molécules appartenant à la famille des sérines protéases qui conduisent à l'apoptose de façon caspase dépendante ou indépendante. Parmi ces granzymes, deux sont principalement reconnus et particulièrement décrits à travers la

littérature, le granzyme A et le granzyme B. Ces deux protéases induisent indépendamment, mais en synergie, l'apoptose des cellules cibles²⁹². Le granzyme A entraîne la mort cellulaire de manière caspase indépendante en clivant l'ADN simple brin²⁹³. De son côté, le Grz B clive ces substrats après les résidus d'acide aspartique. Il s'ensuit une activation de la caspase 3 conduisant à une fragmentation de l'ADN. Cependant, la principale voie par laquelle le granzyme B induit l'apoptose est une voie indépendante des caspases. Pour ce faire, le granzyme B clive la protéine BID (*BH3 interaction domain death agonist*) ce qui aura comme effet de disloquer la membrane mitochondriale et d'entraîner le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme^{294, 295}. Ce phénomène conduisant également à l'apoptose sera détaillé plus loin dans cette section. Il est ici important de noter que sans le duo perforine/granzyme, les LTe CD8⁺ sont incapables d'éliminer une infection LCMV Armstrong, ce qui n'est pas le cas pour une infection *Listeria*²⁵.

3.3.3.2 Récepteurs de mort

Les LTe CD8⁺ peuvent également utiliser les récepteurs de mort pour induire l'apoptose des cellules cibles. Cette voie est complémentaire à celle des granules cytotoxiques et son utilisation est dépendante des caractéristiques de l'infection (localisation, type de l'agent pathogène, chronicité ou non). Par exemple, dans le cas du LCMV Armstrong et des infections *Listeria*, l'apoptose des cellules infectées, induite par les LTe CD8⁺, peut-être médiée sans l'aide des récepteurs de mort²⁵. Il est intéressant de noter que ce mécanisme d'induction de la mort cellulaire est partagé avec les LT CD4⁺. Ceci est cohérent avec le fait que l'apoptose par activation des récepteurs de mort est également un des mécanismes impliqués dans la phase de contraction qui régule l'homéostasie lymphocytaire. Cette voie d'apoptose met majoritairement en jeu trois membres de la superfamille des récepteurs au TNF : Fas (CD95), TRAILR (*TNF related apoptosis ligand receptor*) et TNFRI^{296, 297}. L'activation de ces récepteurs par leur ligand spécifique (CD95L, TRAIL et TNF) va conduire à l'apoptose via la caspase 8. Les mécanismes intracellulaires précis impliqués dans cette mort cellulaire seront détaillés plus loin dans cette section.

3.3.3.3 Cytokines effectrices

Les LTe CD8⁺ sont également de gros producteurs de cytokines²⁵. En effet, en plus de l'IL-2, qu'ils sécrètent dans le cadre d'actions autocrines ou paracrines, les LTe CD8⁺ libèrent aussi des cytokines effectrices, IFN γ et TNF α . Ces deux cytokines possèdent des rôles multiples et peuvent agir en synergie. En ce qui concerne l'IFN γ , il inhibe directement la réplication virale en activant des kinases et des déaminases qui vont limiter la synthèse de virus. De plus, l'IFN γ augmente l'expression des molécules de CMH I et de CMH II favorisant ainsi la reconnaissance des cellules infectées par les LTe CD8⁺. Finalement, l'IFN γ active aussi les macrophages et les recrute dans les foyers infectieux en tant que cellules phagocytiques et comme cellules présentatrices d'antigène²⁹⁸. Il est intéressant de noter que l'IFN γ n'est pas indispensable pour l'élimination du LCMV Armstrong ni pour les infections de type *Listeria* mais est requis pour les réponses à des infections chroniques de LCMV²⁵. Le TNF α agit en synergie avec l'IFN γ pour activer les macrophages²⁹⁸. De plus, le TNF α augmente l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales afin de favoriser le recrutement de cellules de l'immunité innée sur les sites infectieux. Finalement, le TNF α induit, via son récepteur TNFR1, une voie d'apoptose dépendante des caspases. Comme pour l'IFN γ , le TNF α n'apparaît pas comme étant indispensable durant les infections à LCMV Armstrong²⁵.

3.4 Contraction et apoptose

A la suite de l'élimination complète de l'antigène, la grande majorité (90%) des LTe CD8⁺ spécifiques vont massivement mourir par apoptose durant la phase de contraction. Ce déclin de la population effectrice est à la fois intense mais aussi rapide car il s'effectue dans un délai d'une à deux semaines. En parallèle, 5 à 10% des LTe CD8⁺ survivent à cette phase de contraction et vont constituer un réservoir de LTm CD8⁺ spécifiques de l'antigène rencontré. L'apoptose des LTe CD8⁺ s'effectue essentiellement via deux voies bien distinctes : une voie extrinsèque et une voie intrinsèque²⁹⁷. Ces deux voies de mort programmée vont être détaillées au cours de cette partie et ne sont mutuellement pas exclusives.

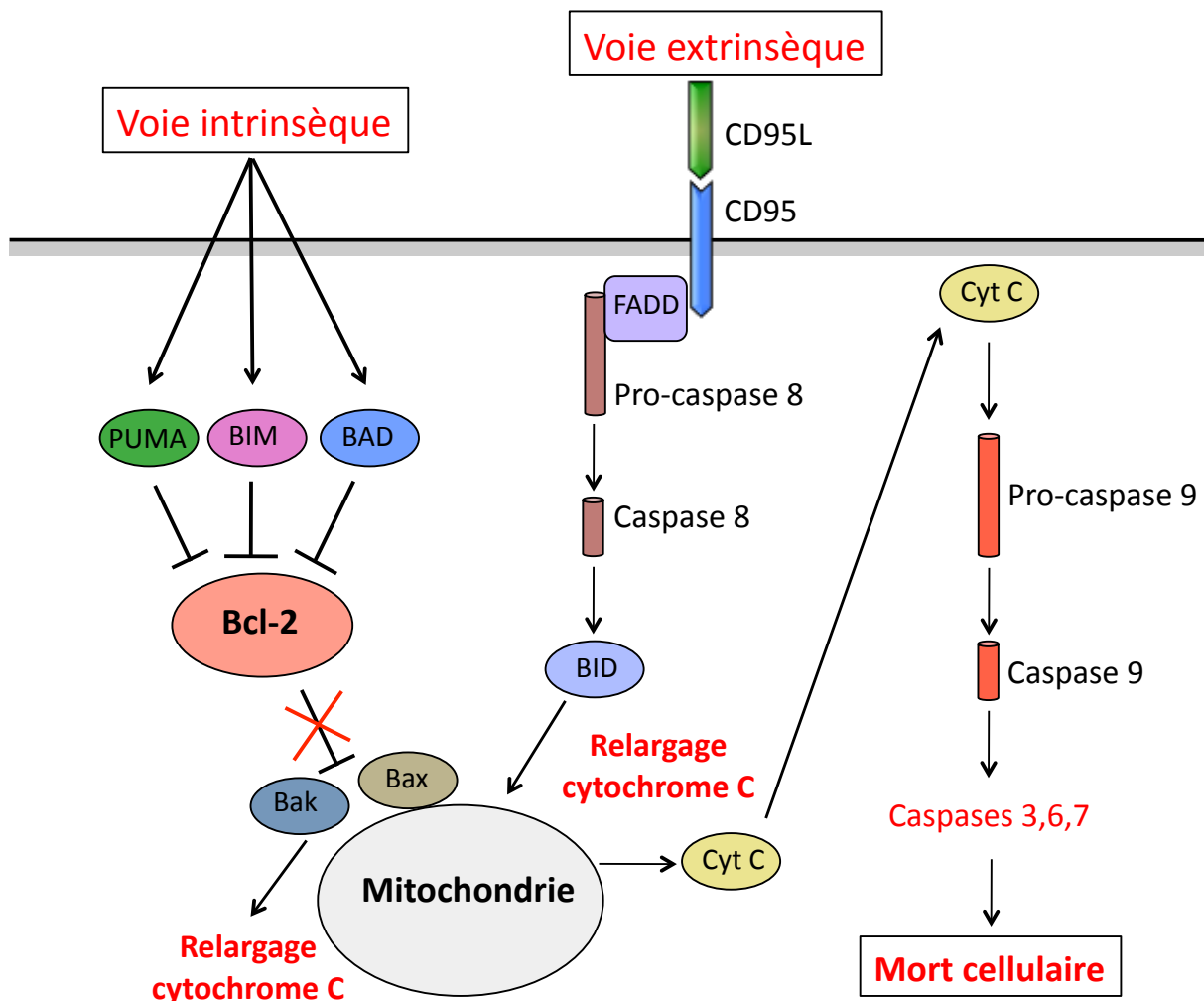


Figure 11 : Voies d'apoptose intrinsèque et extrinsèque. Inspiré de²⁹⁹.

La voie extrinsèque débute par l'activation des récepteurs de mort via des ligands extracellulaires (**Figure 11**). Ces récepteurs d'apoptose activés sont des membres de la grande famille des récepteurs au TNF mais se distinguent par la présence d'un domaine de mort (*death domain*, DD) dans leur partie cytoplasmique. Parmi ces récepteurs Fas (CD95), TRAIL et TNFR sont les plus connus. Fas et son ligand FasL (CD95) sont largement exprimés et pas seulement par les cellules du système immunitaire. Cette voie extrinsèque débute par la liaison de Fas sur la cellule qui va mourir à FasL, ce qui entraîne la trimérisation du récepteur. Les DD de Fas vont recruter la protéine adaptatrice FADD (*Fas-Associated DD*). Cette interaction va permettre le recrutement des pro-caspases initiateuses 8 et 10. Ces molécules sont des

protéases qui se définissent par la présence d'une cystéine au niveau de leur site d'activation. La forte concentration des pro-caspases 8 et 10 va permettre un autoclivage et par la même une autoactivation. Une fois activées, les caspases 8 et 10 vont induire l'apoptose en activant les caspases effectrices 3, 6 et 7 qui se situent en aval. Les caspases 8 et 10 peuvent également induire l'apoptose en clivant les protéines de la famille Bcl-2 telle que BID (*BH3 interaction domain death agonist*) pour former un BID tronqué (tBID : *truncated BID*). Ce tBID va induire le relargage du cytochrome c de la mitochondrie au cytoplasme conduisant à la formation de l'apoptosome. Ce dernier va activer la pro-caspase 9 en la clivant qui elle-même clivera finalement les caspases effectrices 3, 6 et 7³⁰⁰. Cette mort programmée dépendante des caspases va notamment se traduire par une rupture du cycle cellulaire, l'abolition des mécanismes de réparation de l'ADN, la destruction des composants structuraux et l'expression de signaux entraînant la phagocytose.

La voie intrinsèque est déclenchée lorsque la cellule est soumise à un stress généré par un manque de signaux de survie ou des stimuli nocifs (**Figure 11**). Cette voie d'apoptose est passive car elle n'implique pas les récepteurs de morts et est également appelée ACAD (*Activated Cell Autonomous Death*). L'étape critique est le relargage, par les mitochondries, du cytochrome c, qui va déclencher *in fine* l'activation des caspases²⁹⁹. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome c lie APAF-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) dont il induit l'oligomérisation conduisant à la formation de l'apoptosome. Ce dernier va recruter et activer la pro-caspase 9 qui recrutera les caspases effectrices 3, 6 et 7. Cette libération du cytochrome c est contrôlée par les ratios cellulaires des molécules anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L) et pro-apoptotiques (Bim, PUMA)³⁰¹. Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) et PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) se lient à Bcl-2 et Bcl-X_L au niveau de la membrane mitochondriale, réduisant l'inhibition de Bax (*Bcl-2 associated X protein*) et Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*), facteurs majeurs dans la libération du cytochrome c dans le cytoplasme³⁰². L'absence de signaux de survie, notamment cytokiniques, restreint l'expression de Bcl-2 et Bcl-X_L tandis qu'en parallèle l'expression de Bim et PUMA augmente³⁰³.

Un autre mécanisme d'apoptose est l'AICD (*Activation Induced Cell Death*). Cette mort cellulaire est consécutive d'une restimulation des LTe CD8⁺ via leur RCT en absence de

signaux de costimulation. Ce terme d'AICD a été défini par le groupe de Green en montrant que des hybridomes T et des thymocytes mourraient par apoptose suite à une stimulation par leur RCT³⁰⁴. Ce mécanisme d'apoptose a été par la suite démontré comme impliquant Fas, TRAIL et TNFR²⁹⁷. Il a également été montré qu'une stimulation RCT augmentait l'expression de Bim³⁰⁵.

Que ce soit pendant la phase d'expansion ou même durant la phase de contraction, les mécanismes d'apoptose doivent être régulés afin de conserver une population effectrice apte à devenir mémoire. L'expression de la protéine cFLIP (*cellular caspase-8 (FLICE) like inhibitory protein*), molécule inhibant l'activation des caspases 8 et 10, va permettre de limiter l'apoptose via FAS^{306, 307}. Une augmentation de l'expression des molécules anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L) va stabiliser la mitochondrie³⁰⁸.

4. Cytokines γ_c dans le développement des LTe CD8⁺

Nous avons vu au cours de la section 2 que les cytokines dépendantes de la chaîne γ_c possèdent des rôles majeurs dans le développement complet des réponses humorales⁹⁴ et cellulaires¹⁰⁷. Certaines de ces cytokines (IL-7, IL-2, IL-15 et IL-21) ont des impacts plus ou moins prépondérants sur la réponse immune des LT CD8⁺ à l'encontre d'un pathogène intracellulaire^{98, 102, 265, 309, 310}. Au cours de cette section, nous allons détailler rigoureusement les impacts individuels et combinés des cytokines IL-7, IL-2, IL-15 et IL-21 sur l'établissement d'une réponse effectrice T CD8⁺ optimale. Nous décrirons également l'implication de ces quatre cytokines sur les voies entraînant la différenciation en SLEC ou en MPEC. L'influence de ces mêmes cytokines sur le développement et l'homéostasie des LTm CD8⁺ sera discutée dans la section 6.

4.1 IL-2

L'IL-2 est une cytokine qui a été identifiée la première fois en 1976 comme facteur de croissance de cellules T *in vitro*³¹¹. Les souris génétiquement déficientes en IL-2, en CD25 ou en CD122 développent systématiquement une forte autoimmunité notamment dûe à l'absence

des LT CD4⁺ régulateurs (LTreg CD4⁺)³¹². Des études sur des LTreg CD4⁺ ont prouvé que l'IL-2 était essentielle à leur développement thymique mais également à leur survie et à leur maintien en périphérie^{313, 314, 315}. De plus, l'IL-2 soutien un fort taux d'expression de Foxp3, facteur de transcription clé dans l'induction des capacités régulatrices des LTreg CD4⁺^{313, 316}.

L'IL-2 est majoritairement sécrétée par les LT CD4⁺ activés mais également par des LT CD8⁺ activés, des NK, des NKT (*Natural Killer T cell*) et même par des CD^{95, 312, 317, 318, 319}. La production d'IL-2 par les lymphocytes T est induite rapidement mais de manière transitoire après l'activation^{320, 321}. Cette production transitoire d'IL-2, en plus des signaux RCT et des cytokines inflammatoires (IL-12, IFNs de type I), stimule l'expression de CD25 à la surface des LT activés ce qui va augmenter l'affinité de l'IL-2 pour son récepteur^{177, 312, 322, 323}. A la suite de la liaison au récepteur hétérotrimérique (CD25, CD122, CD132), le complexe IL-2-IL-2R est rapidement internalisé et l'IL-2, CD122 et CD132 sont rapidement dégradés alors que CD25 peut être rapidement recyclé à la surface cellulaire³¹². CD122 et CD132 sont les éléments de signalisation qui vont induire l'activation de plusieurs voies : JAK1-3/STAT5, PI3K/Akt, MAPK^{111, 128}.

In vitro l'IL-2 provoque une prolifération massive des LT CD8⁺ et est à l'origine du développement des fonctions effectrices telles que la sécrétion d'IFN γ et la production de molécules cytotoxiques (Grz B, perforine)^{96, 250, 324}. L'impact *in vivo* de l'IL-2 sur la génération et le développement des LTe CD8⁺ est bien plus minime. En effet, dans différents modèles infectieux, l'IL-2 ou son récepteur CD25 ont été démontrés comme nécessaires à l'expansion optimale des LTe CD8⁺ au pic de la réponse immunitaire^{203, 322, 325, 326, 327}. Cependant, même si elle est atténuée, l'expansion des LTe CD8⁺ s'effectue toujours en l'absence de signaux IL-2 dépendants. Par exemple, dans le cadre d'une infection avec LCMV Armstrong, l'expansion primaire des LTe CD8⁺ endogènes est trois fois moins importante dans la rate des souris IL-2^{-/-} par rapport aux souris contrôles et ce, au pic de la réponse (Jour 7)³²⁵. Des résultats similaires ont été rapportés dans des études portant sur des LT CD8⁺ CD25^{-/-} (IL-2R α ^{-/-}) dans le cadre d'infection avec LCMV, *Lm* ou VV^{203, 327}. Ces données suggèrent que l'IL-2 n'a qu'un rôle de soutien dans l'expansion primaire des LTe CD8⁺. En réalité, l'IL-2 est

plutôt requise pour supporter la prolifération des LTe CD8⁺ dans les tissus non lymphoïdes^{326, 328}. Par ailleurs, les signaux IL-2 contribuent à augmenter *in vivo* la quantité des molécules cytotoxiques telles que Grz A, Grz B et perforine en favorisant la transcription de leurs gènes codant lors d'infection LCMV^{97, 250, 265}. Cependant, contrairement aux études *in vitro*, les signaux IL-2 ne semblent pas requis à la production d'IFN γ ^{97, 250}. Comme pour l'expansion des LTe CD8⁺, l'IL-2 ne fait qu'amplifier les fonctions cytotoxiques des LTe CD8⁺.

L'expression de CD25 n'est pas uniforme à la surface de tout les LT CD8⁺ activés à 3,5 jours après une infection LCMV²⁶⁵. Cette hétérogénéité va définir la différenciation effectrice des LT CD8⁺ activés. En effet, les lymphocytes qui possèdent une forte expression de CD25 vont préférentiellement acquérir à J5 pi un phénotype similaire à celui des SLECs (KLRG1, Blimp-1, T-bet). A l'opposé, les LT CD8⁺ activés avec une faible expression de CD25 vont présenter une expression de gènes à J3,5 pi associable à une survie à long terme (CD62L, CD127). Ainsi, les signaux IL-2 constitueraient un facteur majeur dans la génération des SLECs. Cette donnée est confirmée par les pourcentages réduits de SLECs ou de LTe CD8 KLRG1^{élevé} au pic de la réponse dans des souris CD25^{-/-} infectées avec LCMV, VV ou *Lm*^{97, 250, 327}. L'IL-2 favorise cette différenciation en SLECs en régulant la plupart des facteurs de transcription impliqués dans le développement SLEC/MPEC. Par exemple, l'IL-2 induit l'expression de Blimp-1^{250, 265, 273}, molécule bien connue dans la génération des SLECs^{264, 269, 270, 271}. Blimp-1 va notamment agir en inhibant l'expression de Bcl-6^{250, 264}. Sachant que ce dernier est plus exprimé dans les MPECs que dans les SLECs^{264, 269, 270}, son inhibition favorise donc la différenciation en SLECs. L'IL-2 va également soutenir une forte expression de T-bet *in vitro* et *in vivo*^{250, 265}, celle-ci étant essentielle au développement optimal des SLECs dans des infections aiguës^{74, 185, 250, 253}. Finalement, l'IL-2 via sa signalisation PI3K/Akt va induire l'activation du complexe mTOR qui va inhiber Foxo1, inducteur de CD127, marqueur des MPECs²¹². Un traitement à la rapamycin, inhibiteur direct de mTOR, pendant une infection LCMV résulte en une diminution de l'expression de KLRG1, marqueur phénotypique des SLECs²³⁴. Le complexe mTOR activé par l'IL-2 peut aussi favoriser la différenciation des SLECs en induisant l'expression de T-bet^{253, 256}. Finalement, il a été montré *in vitro* que l'IL-2 augmentait l'expression d'Id2 LT CD8⁺ OT-I activés tout en réprimant l'expression d'Id3²⁸¹.

Même si cela n'a pas été prouvé *in vivo*, il est possible que l'IL-2 oriente le ratio d'expression Id2/Id3 en faveur d'Id2 afin de favoriser la génération des SLECs.

4.2 IL-15

La forme soluble de l'IL-15 est sécrétée par des cCD activées et des macrophages en réponse à des signaux TLR ou des IFNs^{329, 330}. Il est toutefois important de noter que la majeure partie de cette cytokine n'est pas dans une forme soluble mais est complexée à son récepteur IL-15R α à la surface des cCD^{87, 111}. Contrairement aux souris IL-2^{-/-} et CD25^{-/-}, les souris IL-15^{-/-} et IL-15R α ^{-/-} ne développent pas d'autoimmunité et possèdent un contingent normal de LTreg CD4^{+331, 332}. Cependant, elles présentent une forte réduction du nombre thymique et périphérique de cellules NK, NKT et de lymphocytes de l'épithélium intraintestinal^{116, 117}. De plus, ces souris présentent également une forte diminution en LTm CD8⁺³³³. Comme discuté dans la section 2, cette cytokine est liée à son récepteur IL-15R α et est présentée en *trans* à la surface des LT CD8⁺ chez la souris où il y aura liaison avec CD122 et CD132. Tout comme l'IL-2, l'IL-15 va signaler via JAK1-3/STAT5 et PI3K/Akt^{334, 335, 336}. Chez l'homme, il n'est pas tout à fait certain que l'IL-15 doive être *trans* présentée pour que les LT CD8⁺ s'activent et prolifèrent³³⁷. En effet, il a été montré, *in vitro*, que des cellules humaines CD8⁺ primaires, contrairement à des LT CD8⁺ murins, étaient capables de répondre à des signaux IL-15 sans que cette dernière leur ait été *trans* présentée³³⁷.

In vitro, l'IL-15, comme l'IL-2, est un facteur de croissance pour les cellules T CD8⁺³³⁸. L'IL-15 n'induit cependant pas un taux de synthèse protéique aussi élevé que l'IL-2 ce qui fait que l'IL-15 n'est pas un facteur de croissance aussi performant *in vitro* que l'IL-2³³⁸. L'importance de l'IL-15 *in vivo* sur la réponse effectrice LT CD8⁺ semble dépendre de l'infection. En effet, des souris IL-15^{-/-} ou IL-15R α ^{-/-} présentent une expansion des LTe CD8⁺ comparable aux souris contrôles dans des infections LCMV ou *Lm*^{105, 106, 333}. De plus, dans ces mêmes modèles infectieux, les productions de cytokines (IFN γ , TNF α) et de Grz B ne semblent pas affectées par l'absence de signaux IL-15^{105, 106, 333}. En revanche, dans un modèle d'infection VSV, l'IL-15 est essentielle à la prolifération tardive des LTe CD8⁺³³⁹. Finalement, dans un contexte de vaccination via des cCD chargées avec un peptide immunogène, l'IL-15

est nécessaire à l'expansion des LTe CD8⁺ ainsi qu'à l'acquisition de leurs fonctions cytotoxiques¹⁰⁴.

Il a récemment été montré dans un modèle de transfert adoptif de LTn CD8⁺ P14, 8 jours après une infection LCMV, que la proportion de SLECs était plus faible dans une souris IL-15^{-/-} par rapport à une souris contrôle⁹⁷. A travers la littérature, il n'a cependant pas été démontré que l'IL-15 induisait la différenciation en SLEC. L'IL-15 semble plutôt favoriser la survie des SLECs^{102, 340}. En effet, des injections d'IL-15 au moment de la phase de contraction à des souris infectées avec *Lm* permettent le maintien du nombre de SLECs présents à la fin de la phase d'expansion¹⁰². Cette survie accrue s'explique notamment par le fait qu'IL-15 induit l'expression de Bcl-2 sur les LTe CD8⁺ au moment de la contraction³⁴⁰. Il ne faut pas exclure un rôle de l'IL-15 dans la différenciation des SLECs. En effet, l'IL-15 signale comme l'IL-2 via la voie PI3K/Akt^{334, 336} et pourrait donc également activer le complexe mTOR qui est, entre autres, un facteur important de la différenciation des SLECs. Qui plus est, l'IL-15 a été montré *in vitro* comme facteur induisant l'expression de T-bet, molécule connue pour induire le développement des SLECs³⁴¹.

4.3 IL-7

L'IL-7 est une cytokine dépendante de la chaîne γ_c sécrétée par les cellules stromales et les cellules épithéliales⁸⁷. Le récepteur à l'IL-7 est hétérodimérique et composé d'une chaîne IL-7R α (CD127) et de la chaîne γ_c . L'IL-7 transmet majoritairement ses signaux via JAK1-3/STAT5 mais est également capable de signaler à travers PI3K/Akt dans certains cas^{342, 343}.

Tôt après l'activation, l'expression de CD127 à la surface des LT CD8⁺ diminue¹²⁵. Ceci suggère donc que l'IL-7 n'a pas d'impact sur l'expansion et le développement des LTe CD8⁺ lors d'une réponse primaire. Cela a été confirmé à travers de nombreuses études et dans différents modèles infectieux (LCMV, VSV, *Lm*) où des souris IL-7R α ^{-/-} présentaient une réponse effectrice en terme d'expansion et de fonctions à celle des souris contrôles^{246, 309, 344, 345}.

Nous avons vu dans la section 3 que la réexpression de CD127 est une caractéristique des MPECs²³⁰. Puisque les signaux IL-7 sont associés aux MPECs, cellules destinées à survivre à long terme, il serait logique de penser qu'une surexpression d'IL-7 permettrait aux cellules KLRG1^{élevé} de subsister après la contraction. Or, même en induisant une expression constitutive de CD127, la contraction des LTe CD8⁺ n'est pas diminuée après une infection *Lm*³⁴⁶. Ceci s'explique notamment par le fait que l'IL-7 ne régule pas la survie des populations KLRG1^{élevé}¹⁰², rôle réservé à l'IL-15 comme décrit plus haut. A l'opposé, il a été montré que l'IL-7 régule la survie des MPECs lors de la phase de contraction dans un modèle d'infection LCMV Armstrong¹⁰¹.

4.4 IL-21

L'IL-21 est majoritairement produite par les LT CD4⁺ activés mais aussi par les NKT^{347, 348}. Comme décrit dans la section 2, le récepteur à l'IL-21 est un récepteur hétérodimérique constitué d'une chaîne IL-21R α (CD360) et de la chaîne γ_c . L'IL-21 signale et transmet ses signaux via JAK1-3/STAT3⁸⁷ mais peut également signaler via PI3K/Akt³⁴⁹. Cette cytokine a été démontrée, entre autres, comme étant nécessaire au développement et aux fonctions des LT CD4⁺ Th17. L'IL-21 joue également un rôle majeur dans le développement des LT CD4⁺ Tfh et dans la production d'anticorps par les LB¹²⁶.

Des études *in vitro* ont montré que l'IL-21 agit en synergie avec l'IL-15 afin de promouvoir la prolifération des LT CD8⁺^{99, 348}. En parallèle, l'IL-21 augmente aussi la production d'IFN γ et les fonctions cytotoxiques³⁴⁸. *In vivo*, le rôle de l'IL-21 dépend du contexte infectieux. En réponse à une infection aiguë à LCMV, les souris IL-21^{-/-} ou IL-21R^{-/-} montrent une réponse LT CD8⁺ similaire en termes d'expansion et de fonction effectrices à celle des souris contrôles^{98, 350}. En revanche, des études utilisant VV comme agent pathogène ont prouvé que les LTe CD8⁺ IL-21R^{-/-} proliféraient moins et avaient des fonctions cytotoxiques réduites^{99, 351, 352}. Le rôle de l'IL-21 est bien plus majeur dans le cadre d'infection chronique à LCMV clone 13, où cette cytokine limite l'épuisement des LTe CD8⁺³⁵⁰. D'autres travaux montrent l'IL-21 comme un facteur améliorant l'expansion et la survie des LTe CD8⁺ dans des modèles tumoraux^{99, 353}.

Il n'a pas été montré à travers de la littérature que l'IL-21 puisse influencer sur la différenciation en SLEC ou en MPEC. Cependant, dans les LB et les LT CD4⁺, l'IL-21 favorise l'expression de Bcl-6²⁶⁴. Il a également été montré, *in vitro*, que l'IL-21 est capable d'induire l'expression de Blimp-1 dans des LB, des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺²⁶⁶. De plus, l'IL-21 est également capable de réprimer *in vitro* l'expression d'Eomes dans des LT CD4⁺ Th1. En parallèle, l'IL-21 augmente l'expression de T-bet sur des lignées cellulaires T *in vitro*^{341, 354}. Finalement, des résultats *in vitro* sur LT CD8⁺ OT-I activés ont montré que l'IL-21 induit l'expression d'Id2 tout en limitant celle d'Id3²⁸¹. A la vue de ces différentes études, il est possible de penser que l'IL-21 pourrait *in vivo* favoriser la génération des SLECs en contrôlant les niveaux des différents facteurs de transcription clés.

4.5 Synergie et redondance

Comme nous avons pu le voir au cours de cette section, les cytokines IL-7, IL-2, IL-15 et IL-21 sont toutes plus ou moins impliquées dans le développement d'une réponse effectrice primaire T CD8⁺. Individuellement, *in vivo*, les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 semblent être en partie requises à l'expansion des LTe CD8⁺, à leur différenciation en SLEC/MPEC ainsi qu'à leur acquisition de fonctions effectrices. Cependant, comme nous l'avons vu durant la section 2, les cytokines dépendantes de la chaîne γ_c partagent beaucoup de similitudes. Par exemple, l'IL-2 et l'IL-15, en plus d'avoir en commun la même chaîne CD132, possèdent aussi la même chaîne CD122 et les mêmes voies de signalisation (JAK1-3/STAT5 et PI3K/Akt)^{128, 334, 336}. De plus, la structure quaternaire du complexe IL-2/IL-2R et celle du complexe IL-15/IL-15R sont quasiment identiques³⁵⁵. Un tel degré de similarité laisse sous-entendre que l'IL-2 et l'IL-15 pourraient avoir des rôles synergiques ou redondants sur le développement d'une réponse effectrice primaire CD8⁺. En effet, on peut émettre l'hypothèse que l'IL-15 compenserait l'absence de signaux IL-2 en reprenant certaines de ses fonctions dans l'expansion et la différenciation LTe CD8⁺ ainsi que dans l'établissement des fonctions cytotoxiques. A l'inverse, dans des modèles IL-15^{-/-}, l'IL-2 pourrait compenser la perte de signaux IL-15 en reprenant certains des ses fonctions dans l'expansion, la différenciation des LTe CD8⁺ et l'acquisition des fonctions cytotoxiques. Les rôles redondants et synergiques des

cytokines dépendantes de la chaîne γ_c sur la réponse effectrice primaire T CD8⁺ n'ont été que très peu étudié et ce que nous étudierons dans les sections 1 et 2 de la partie résultats. Il a notamment été montré *in vitro* que l'IL-15 et l'IL-21 agissaient en synergie afin d'amplifier l'expansion des LT CD8⁺ activés⁹⁹. Par ailleurs, l'équipe de Williams a démontré qu'en absence combinée de signaux IL-2 et IL-15, la proportion de SLECs, 8 jours après infection avec LCMV Armstrong, était plus faible qu'en absence individuelle de l'une ou l'autre de ces cytokines⁹⁷. Cependant, cette étude présentait quelques limites au niveau du modèle murin. En effet, des T CD8⁺ CD25^{-/-} étaient transférés dans des souris IL-15^{-/-}. Le fait que les T CD8⁺ soient IL-2R α déficients n'abroge pas complètement la signalisation IL-2 comme nous l'avons vu dans la section 2. De plus, les souris IL-15^{-/-} présentent des défauts dans la survie et la maturation des CD et donc dans leur capacité à présenter un Ag^{356, 357}. Des études complémentaires semblent donc nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes synergiques et/ou redondants des cytokines IL-7, IL-2, IL-15 et IL-21 sur : l'expansion des LTe CD8⁺, la différenciation en SLEC/MPEC, l'acquisition des fonctions effectrices et la résolution de l'infection. Ces questions seront précisément abordées dans les deux premières sections de ma partie résultats.

5. Lymphocytes T CD8⁺ mémoires

Une fois l'agent pathogène éliminé de l'organisme, les LTe CD8⁺ ayant survécu à la phase de contraction vont se développer en LTm CD8⁺. Ces LTm vont fournir une protection majeure à long terme contre une nouvelle exposition à leur pathogène spécifique. Ces cellules vont survivre et se maintenir plusieurs mois chez la souris et plusieurs années chez l'homme. Comparativement à des LTn CD8⁺, les LTm CD8⁺ possèdent diverses caractéristiques propres qui leurs permettent d'annihiler rapidement une infection secondaire. Premièrement, des LTm CD8⁺ spécifiques d'un antigène donné sont présents à un niveau 100 à 1000 fois supérieur à la proportion initiale de LTn CD8⁺ spécifiques du dit antigène²²⁴. En effet, dans le cadre d'une infection avec LCMV Armstrong, Blattman a démontré que $5 \cdot 10^5$ LTm CD8⁺ spécifiques du peptide GP₃₃₋₄₁ étaient générés dans la rate à partir de 200 précurseurs initiaux³⁵⁸. Deuxièmement, ces cellules sont dans un état de préactivation constant qui leur permet

d'initier rapidement leur prolifération et la sécrétion de cytokines (IFN γ , TNF α) lors d'une réinfection^{359, 360}. Cet état de préactivation se traduit notamment par une sensibilité accrue à diverses cytokines par rapport à LTn CD8⁺ et une expression plus élevée de la cycline CDK6 qui favorise la transition de la phase G0/G1 à la phase S du cycle cellulaire^{359, 360}. Troisièmement, les LTm CD8⁺ acquièrent rapidement leurs fonctions effectrices (cytotoxicité, sécrétion de cytokines)^{361, 362}. Il a été montré dans un modèle d'immunisation que des cellules mémoires CD8⁺ étaient capables de lyser *in vitro* des cellules cibles en produisant notamment des perforines plus précocement que des LTn CD8⁺³⁶¹. Ceci s'explique notamment par des modifications de la chromatine facilitant la transcription des gènes codant pour les molécules effectrices IFN γ , perforines et Grz B. Quatrièmement, les LTm CD8⁺ sont localisés à travers différents organes dans le corps afin de maximiser la surveillance^{363, 364, 365}. En effet, les organes lymphoïdes, les organes non-lymphoïdes et les muqueuses représentent tous des sites d'implantation possible pour les LTm CD8⁺. Il est fondamental de noter que la localisation des mémoires T CD8⁺ est un élément majeur dans la classification des différents sous-types de LTm CD8⁺²¹¹. On citera notamment les mémoires centraux (T_{CM}), les effecteurs mémoires (T_{EM}) et les résidents mémoires (T_{RM}) qui sont localisés dans différents compartiments de l'organisme²¹¹. Cinquièmement, les LTm CD8⁺ présentent des capacités de survie et de prolifération homéostatique supérieures à celles des LTn CD8⁺ notamment en raison des signaux IL-7 et IL-15^{100, 102, 103, 309, 333, 366, 367, 368, 369}. Collectivement, toutes ces facultés expliquent la maintenance sur le long terme de populations lymphocytaires T CD8⁺ spécifiques d'un antigène possédant des capacités de protection accrues.

Les mécanismes et molécules permettant une survie et un auto-renouvellement sont nombreux et ont été clairement décrits à travers la littérature. De plus, à l'instar des populations effectrices, les LTm CD8⁺ ne constituent pas un groupe homogène. Il existe en effet différents types de mémoires T CD8⁺ qui traduisent une hétérogénéité de localisation et de fonctions^{363, 364, 365, 370}. Finalement, de multiples facteurs de transcription modulent le développement des différents sous-types de LTm CD8⁺²²⁹. Nous nous attacherons à détailler précisément tous ces éléments au cours de cette section.

5.1 Maintenance et survie des lymphocytes T CD8⁺ mémoires

Les LTe CD8⁺ ayant survécu à la phase de contraction effectuent une transition métabolique en passant d'un métabolisme anabolique (glycolyse) à un métabolisme catabolique principalement mitochondrial : la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (**Figure 8**)^{227, 235, 236, 137}. Les besoins énergétiques des LTm CD8⁺ en ATP sont plus faibles que ceux des LTe CD8⁺. Comme décrit au cours de la section 3, la phosphorylation oxydative est un métabolisme partagé par les LT CD8⁺ naïfs et mémoires permettant aux cellules en état de quiescence de produire de l'ATP dans des conditions où les ressources en nutriments tels que le glucose sont faibles²²⁷. Une activation constitutive de la glycolyse limite le développement des LTm CD8⁺ ainsi que leur survie à long terme^{137, 371, 372}. Inversement, l'inhibition de cette voie métabolique aura comme effet de promouvoir la génération des LTm CD8⁺^{371, 372}. Cette transition métabolique est donc essentielle à la survie des cellules devenant LTm CD8⁺ compte-tenu d'un milieu environnant pauvre en nutriments.

En plus de cette transition métabolique, les LTm CD8⁺ ont une masse mitochondriale augmentée par rapport à des LTe CD8⁺³⁷³. Cela se traduit par un accroissement de la capacité à produire de l'énergie ou « Spare Respiratory Capacity » (SRC) dans des conditions de stress. Dans une étude, avec *Lm* comme modèle infectieux, l'équipe de Pearce a démontré que cette SRC accrue permet aux mitochondries de produire plus d'ATP lorsque le RCT reconnaît son complexe peptide/MHC³⁷⁴. Ainsi, les LTm CD8⁺ peuvent enclencher plus rapidement les mécanismes effecteurs coûteux en énergie tels que la prolifération ou l'acquisition des fonctions cytotoxiques. Cette faculté fournit donc aux LTm CD8⁺ un avantage bioénergétique favorisant un contrôle optimal d'une infection secondaire.

Cette transition métabolique n'est pas le seul aspect permettant aux LTm CD8⁺ de se maintenir sur le long terme. Premièrement, les LTm CD8⁺ disposent d'un système de survie supérieur à celui des LTn CD8⁺. En effet, contrairement à ces derniers, les LTm CD8⁺ n'ont pas besoin d'interaction RCT-CMH I pour leur survie. Des LTm CD8⁺ transférés dans des souris CMH I déficientes sont maintenus et voient leurs fonctions préservées³⁷⁵. Cette donnée a été confirmée récemment dans un modèle d'immunisation où l'expression du RCT des LTm

CD8⁺ a été abolie³⁷⁶. Dans cette étude, même en l'absence de signaux RCT, les LTm CD8⁺ survivent au long terme et restent fonctionnels³⁷⁶. Deuxièmement, les LTm CD8⁺ effectuent ce que l'on appelle communément la prolifération homéostatique. Ce mécanisme permet un auto-renouvellement régulier et stable des différentes populations mémoires. La survie et la prolifération homéostatique des LTm CD8⁺ sont respectivement régulées par deux cytokines dépendantes de la chaîne γ_c : l'IL-7 et l'IL-15. L'implication propre de ces deux cytokines sur la survie et la maintenance des LTm CD8⁺ sera détaillée au cours de la section 6.

5.2 LT CD8⁺ mémoires et leurs fonctions

Tel qu'évoqué au début de cette section, les LTm CD8⁺ ne forment pas une population homogène avec des spécificités communes. Il existe en effet parmi ces cellules mémoires une hétérogénéité basée sur des localisations diverses et des fonctions distinctes. A la fin des années 1990, l'équipe de Lanzavecchia a défini deux types de lymphocytes T CD8⁺ mémoires dans la circulation sanguine humaine : les mémoires centraux (T_{CM}) et les effecteurs mémoires (T_{EM}) (**Figure 12**)³⁷⁰. Ces deux populations ont par la suite également été identifiées chez la souris dans des modèles d'infection LCMV Armstrong et *Lm*^{363, 377}. Plus tardivement, vers la fin des années 2000, une troisième population de LT CD8⁺ mémoires a été caractérisée, les résidents mémoires (T_{RM}) (**Figure 12**)^{364, 365, 378, 379, 380, 381}. Ces trois populations de LT mémoires CD8⁺, tout en pouvant être spécifique du même antigène, participent chacune de manière individuelle et complémentaire à la protection de l'organisme au long terme^{364, 377, 382}.

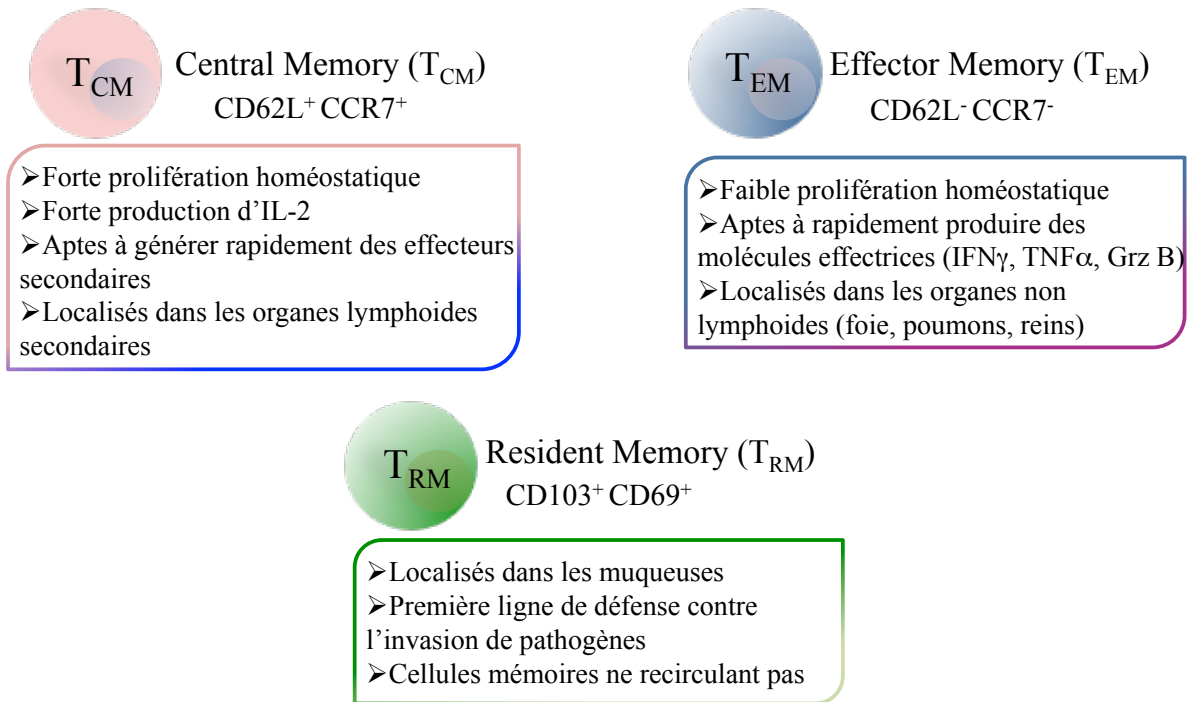


Figure 12 : Les différents sous-types de LTm CD8⁺. Représentation des différents sous-types de LTm CD8⁺ avec leurs caractéristiques propres.

5.2.1 Effecteurs mémoires (T_{EM})

Cette population de LT CD8⁺ mémoires a été phénotypiquement décrite comme étant CD62L^{faible} CCR7^{faible} CD127^{élevé} CD44^{élevé} CD27^{faible}^{211, 370}. Les T_{EM}, n'exprimant que très faiblement la L-Sélectin et CCR7, le récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21, se localisent préférentiellement dans les organes non lymphoïdes tels que le foie, les poumons ou les reins^{211, 377}. Cependant il est tout de même possible de détecter des T_{EM} dans des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, moelle). Ceux-ci sont alors situés en périphérie de cet organe et non dans la zone T où l'on retrouve principalement les T_{CM} comme population mémoire³⁸³. Les T_{EM} possèdent un faible potentiel prolifératif mais sont capables de rapidement produire des cytokines (TNF α , IFN γ) et des molécules cytotoxiques (Grz B, perforine) en cas de réinfection chez l'homme comme chez la souris^{363, 370}. Ainsi les T_{EM}, de part leurs localisations et leurs fonctions, constituent une première ligne de défense apte à

rapidement éliminer des cellules infectées sans nécessiter une différenciation en effecteurs secondaires.

5.2.2 Mémoires centraux (T_{CM})

Les T_{CM} sont phénotypiquement identifiés comme étant $CD62L^{élevé}$ $CCR7^{élevé}$ $CD127^{élevé}$ $CD44^{élevé}$ $CD27^{élevé}$ ^{211, 370}. Contrairement aux T_{EM} , les T_{CM} sont majoritairement localisés dans les organes lymphoïdes secondaires^{211, 363, 370, 377}. Ces mémoires centrales sont d'intenses producteurs d'IL-2 en cas de réinfection et grâce à leur potentiel prolifératif, ils peuvent rapidement générer des effecteurs secondaires aptes à combattre une infection secondaire LCMV ou VV³⁷⁷. Comparativement aux LTn $CD8^+$, les T_{CM} expriment plus de CXCR3 ce qui leur permet de migrer plus rapidement vers les zones de présentation antigénique des organes lymphoïdes secondaires²²³. Ainsi, alors que les effecteurs mémoires offrent une ligne de défense immédiate contre une réinfection, les T_{CM} assurent la génération rapide et en grande quantité d'effecteurs secondaires nécessaires à l'élimination complète du pathogène. Il est important de préciser qu'il a été montré, via un système de transfert adoptif, que des cellules $CD62L^{faible}$ étaient tout à fait aptes à générer des effecteurs secondaires³⁸⁴. Mais que la capacité des cellules $CD62^{élevée}$ à générer des effecteurs secondaires est bien supérieure à celle des cellules $CD62L^{faible}$ ³⁸⁴. Finalement, il semble clair désormais que les T_{CM} sont les cellules mémoires qui persistent le plus à long terme notamment à cause d'une survie et d'une prolifération homéostatique plus importante que celles des T_{EM} ^{377, 385}.

5.2.3 Résidents mémoires (T_{RM})

Les T_{RM} ont été premièrement définis comme des cellules mémoires résidentes de la peau dans une infection murine à HSV ou du petit intestin dans un modèle LCMV Armstrong^{364, 378}. Cette notion de population mémoire résidente et non circulante est essentielle à la définition des T_{RM} . En effet, alors que les T_{CM} et les T_{EM} recirculent à travers l'organisme via la voie sanguine, les T_{RM} eux restent assignés à résidence du ou des tissus où ils sont localisés²²². Des expériences de parabiose murine ou de greffe de peau ou d'intestin ont démontré que ces résidents mémoires sont présents dans des tissus et des épithéliums aussi variés que l'intestin^{378, 380, 382}, la peau^{364, 365, 386}, le cerveau^{380, 387}, les poumons³⁸⁸ ou l'appareil reproducteur femelle³⁸¹. Bien que les organes non lymphoïdes tels que les muqueuses et les

épithéliums soient les principales localisations des T_{RM} , il est possible d'en identifier en périphérie de la rate³⁸⁹. Phénotypiquement, ils sont décrits comme étant $CD62L^{faible} CCR7^{faible} CD44^{élevé} CD69^{élevé} CD103^{élevé}$ ²¹¹. L'expression importante de CD69 a été montrée comme nécessaire à l'inhibition du gène *S1pr1* codant pour la protéine S1P1, molécule essentielle à la recirculation des LTn et LTm $CD8^{215, 216, 387, 390}$. Des LT $CD8^+$ déficients pour CD69 voient leur développement en T_{RM} réduit dans la peau et les poumons^{390, 391}. Des $T_{RM} CD103^{négatif}$ ont récemment été caractérisés dans l'intestin, le foie et la rate^{388, 389, 392}. Contrairement aux $T_{RM} CD103^+$, il apparaît que ces T_{RM} soient indépendants du TGF β pour leur développement dans les muqueuses intestinales³⁹². Il apparaît que la meilleure définition, pour le moment, d'un T_{RM} ne soit pas une définition phénotypique mais plus le concept d'une cellule mémoire résidente, ne recirculant pas à travers l'organisme.

De part leur expression très faible de CD62L et CCR7 et leurs localisations, les T_{RM} peuvent s'apparenter à des T_{EM} comme certains auteurs l'ont suggéré en parlant de T_{EM} migratoires ou résidents²¹⁰. Cependant, il a récemment été démontré que les T_{RM} de divers tissus (intestin, peau et poumons) expriment différemment certains facteurs de transcription clés (T-bet/Eomes) en comparaison des T_{CM} et T_{EM} ^{386, 393}. A l'opposé des T_{CM} , les T_{RM} n'expriment pas d'Eomes³⁹³. De plus, au contraire des T_{EM} qui expriment de forts niveaux de T-bet, l'expression de ce facteur de transcription dans les T_{RM} est faible³⁹³. Ceci suggérerait potentiellement que les T_{RM} forment une entité à part entière des LTm $CD8^+$. Fait intéressant, les T_{CM} et les T_{RM} semblent avoir un répertoire RCT commun³⁹⁴ et cela supporterait l'idée que les T_{RM} sont issus de populations effectrices similaires. Finalement, les T_{RM} , en étant situés dans les sites d'entrées de pathogènes comme HSV ou VV, offrent une protection très rapide avant le recrutement des LTm $CD8^+$ recirculants^{364, 365, 381, 395, 396}.

Toutes ces études basées sur des modèles d'infections murines ont montré l'existence des T_{RM} chez la souris. De part la localisation des T_{RM} , il est plus difficile d'identifier cette population mémoire chez l'homme notamment à cause de la difficulté d'obtenir des biopsies de tissus contenant suffisamment de cellules. Cependant, plusieurs articles ont montré la persistance de LT $CD8^+ CD69^+$ ou $CD103^+$ dans différents modèles pathologiques (psoriasis, allergies)^{397, 398} ou dans des échantillons de tissus d'organes destinés à la greffe^{399, 400}. Donc en

nous basant sur les études faites chez la souris, nous pouvons penser que les T_{RM} sont également présents chez l'homme⁴⁰¹.

5.3 Facteurs de transcription

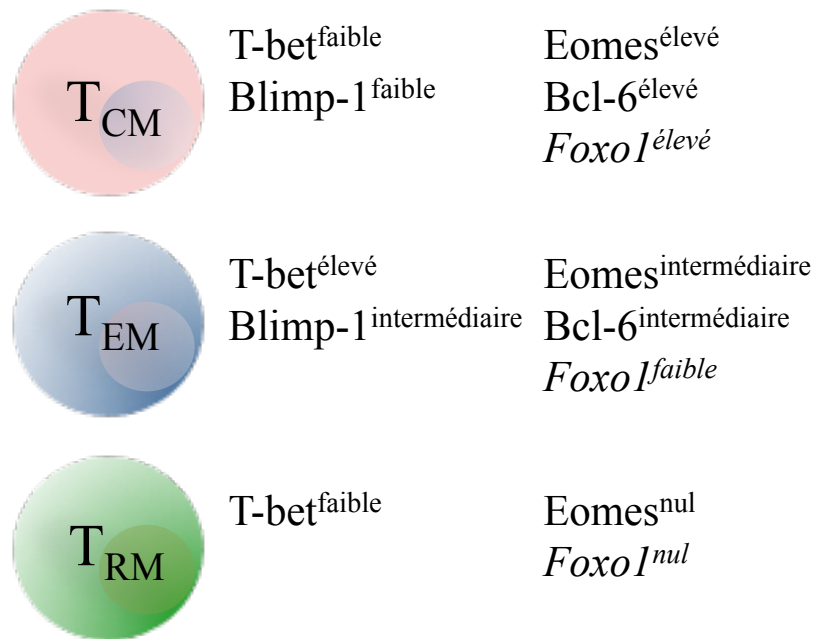


Figure 13 : Les facteurs de transcription orientant la différenciation des sous-types de LTm CD8⁺. Expression relative des facteurs de transcriptions par les T_{CM}, T_{EM} et T_{RM}. L'expression de Foxo1 en italique indique une suggestion proposée à partir d'éléments de la littérature.

5.3.1 T-bet / Eomes

Ces deux molécules de la famille des facteurs de transcription T-box ont été de multiples fois décrites comme influant sur l'homéostasie et l'hétérogénéité des LTm CD8⁺^{74, 204, 255, 256, 402}. T-bet et Eomes contribuent tous les deux à l'expression de CD122, élément indispensable à la prolifération homéostatique et donc au maintien à long terme des LTm CD8⁺²⁵⁵. Il est important de noter que plus les LTm CD8⁺ acquièrent un phénotype mémoire, plus l'expression de T-bet diminue alors que celle d'Eomes augmente^{204, 402, 403}.

Les T_{EM} présentent de fort niveau de T-bet alors qu'Eomes est plus exprimé chez les T_{CM} (**Figure 13**)^{204, 402}. Eomes permet aux T_{CM} de compétitionner pour les niches mémoires dans une infection LCMV en induisant l'expression de CXCR3 et CXCR4, deux récepteurs d'écotaxie vers la moelle osseuse⁴⁰². Finalement, Mackay a récemment montré dans un très bel article que la différenciation des T_{RM} de la peau est aussi régulée par T-bet et Eomes (**Figure 13**)³⁹³. En effet, l'étude a prouvé que le développement des T_{RM}, en réponse à une infection murine à HSV-1, nécessitait une faible expression de T-bet alors que celle d'Eomes doit être éteinte³⁹³. La maintenance d'une expression de T-bet, même à un faible niveau, est nécessaire pour soutenir la présence de CD122 à la surface des T_{RM} et ainsi assurer leur survie à long terme³⁹³.

Collectivement, ces études indiquent que le ratio d'expression de ces deux facteurs de transcription clés oriente la différenciation LTe CD8⁺ ayant survécu à la phase de contraction en divers sous-types de LTm CD8⁺ (T_{EM}, T_{CM}, T_{RM}) (**Figure 13**). Il est donc crucial de connaître les mécanismes biologiques régulant ce ratio soit vers T-bet soit vers Eomes ou vers aucun des deux.

5.3.2 Foxo1/mTOR

En absence de Foxo1, le nombre de LTm CD8⁺ est réduit par rapport aux LTm CD8⁺ contrôles 60 jours après l'inoculation de *Lm*-OVA²⁶¹. A l'opposé, à 35 et à 60 jours après une infection aigue avec LCMV, le nombre de LTm CD8⁺ généré est similaire que les lymphocytes soient Foxo1 déficients ou non^{262, 263}. Ainsi, le rôle de Foxo1 dans la génération du nombre de LTm CD8⁺ semble dépendre du modèle infectieux. Le phénotype des LTm CD8⁺ Foxo1^{-/-} splénique est non classique car il y a maintien d'une expression de CD69 et du Grz B et ce bien après l'élimination du pathogène²⁶². En parallèle, les LTm CD8⁺ Foxo1^{-/-} présentent une très faible augmentation des marqueurs spécifiques des LT CD8⁺ mémoires (CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD44) 60 jours après une infection LCMV Armstrong²⁶³. Ce type de phénotype s'apparente à celui des LTe CD8⁺ et indique que Foxo1 est essentiel au développement des CD8⁺ mémoires en réprimant l'expression de gènes spécifiques des

lymphocytes effecteurs^{404, 405}. Foxo1 favorise la génération des LTm CD8⁺ en orientant *in vitro* et *in vivo* le ratio T-bet/Eomes en faveur d'Eomes^{262, 283}.

Foxo1 est également un élément majeur dans la différenciation des LTm CD8⁺. En effet, Foxo1, en tant que facteur de transcription, induit l'expression de KLF2 (*Krüppel Like Factor 2*), CD62L, CCR7, S1P1 et Eomes^{212, 283, 404, 406}, des molécules toutes associées à un phénotype T_{CM}. Cependant, même si l'ensemble des gènes dont Foxo1 induit la transcription suggère qu'il favorise la différenciation des T_{CM}, cela n'a pas encore été clairement montré *in vivo* (**Figure 13**). Nous pouvons supposer que les signaux Foxo1 doivent être abolis pour le développement des T_{RM}. En effet, la génération de ces cellules nécessite une extinction de l'expression des gènes codant pour Eomes, KLF2, CD62L et S1P1, cibles de Foxo1³⁸⁷. Le maintien de CD69, marqueur phénotypique des T_{RM}, à la surface des LTm CD8⁺ Foxo1^{-/-} tendrait à appuyer cette supposition²⁶². Cependant cela reste à prouver expérimentalement (**Figure 13**).

Finalement, les LTm CD8⁺ Foxo1^{-/-} sont incapables d'induire une réponse secondaire optimale²⁶². L'expansion des effecteurs secondaires Foxo1^{-/-} en réponse à un challenge est réduite. De plus leur capacité à éliminer l'antigène lors d'une infection secondaire est altérée notamment à cause de leur faible production d'IFN γ ^{261, 263}. Ainsi, Foxo1 apparaît comme étant essentiel au développement de LTm CD8⁺ aptes à contrôler une réinfection. Enfin l'activité cytotoxique des effecteurs secondaires est plus faible en absence de Foxo1 comme l'indiquent les tests de cytotoxicité *in vivo*²⁶¹.

Foxo1 est un facteur de transcription inactivé par phosphorylation lors des phases effectrices. En effet, lorsque Foxo1 est phosphorylé, il est séquestré dans le cytoplasme, il ne peut pénétrer dans le noyau et donc agir en tant que facteur de transcription^{212, 283, 404}. L'IL-12 via STAT4, les signaux TCR, ainsi que l'IL-2 et l'IL-15 induisent l'activation de la kinase Akt qui va phosphoryler et inactiver Foxo1^{283, 407, 408}. En parallèle, la kinase Akt va induire l'activation du complexe mTOR, ce dernier limitant le développement des LT CD8⁺ mémoires en favorisant l'expression de T-bet par rapport à Eomes²⁵⁶. De façon intéressante, des inhibiteurs directs ou indirects de mTORC1 accélèrent le développement des LTm CD8 dans

des infections LCMV Armstrong et *Lm*^{234, 235}. De plus, l'inhibition directe ou indirecte de mTOR respectivement via la Rapamycin et la Metformin a pour effet de promouvoir la phosphorylation oxydative^{234, 235}, processus métabolique essentiel au développement des LTm CD8⁺ comme décrit plus haut.

Foxo1 et mTOR sont deux molécules différentes, un facteur de transcription et une kinase. Cependant, elles sont extrêmement reliées l'une à l'autre via Akt. Leurs effets respectifs sur le développement des LTm CD8⁺ sont strictement opposés mais agissent sur des éléments identiques, T-bet et Eomes. Ainsi, le couple Foxo1-mTOR a des impacts en amont du binôme T-bet-Eomes. L'inhibition de mTOR favorise la transition métabolique nécessaire au maintien des LTm CD8⁺. A ma connaissance, aucun rôle de Foxo1 sur le métabolisme mitochondrial n'a été démontré.

5.3.3 Blimp-1 / Bcl-6

Nous avons discuté au cours de la section 3 du rôle de ces deux facteurs de transcriptions sur le développement SLEC/MPEC et sur l'acquisition des fonctions effectrices des LTe CD8⁺. Cependant, comme T-bet et Eomes, Blimp-1 et Bcl-6 ont également un impact sur la génération des LTm CD8⁺. L'expression de Blimp-1 diminue au fur et à mesure que les LTm CD8⁺ deviennent matures²⁶⁹ alors que celle de Bcl-6 suit l'exact opposé en augmentant au cours du temps²⁷⁰. Ceci est d'autant plus vrai dans les T_{CM} qui est la population mémoire exprimant le moins de Blimp-1 et le plus de Bcl-6^{269, 279}.

Bien que son expression dans les LTm CD8⁺ diminue au cours du temps, Blimp-1 influe sur développement des LT mémoires CD8⁺, en particulier des T_{CM} (**Figure 13**). En effet, des LT CD8⁺ Blimp-1 déficients voient leur différenciation mémoire plus orientée vers un phénotype T_{CM} dans des modèles d'infections Influenza et LCMV^{269, 271}. Ceci peut s'expliquer notamment par le fait qu'en absence de Blimp-1, les gènes codant pour Eomes, Bcl-6, CD62L, CCR7 sont traduits bien plus précocement^{269, 271}. Finalement, il est intéressant de noter que les LTm CD8⁺ Blimp-1^{-/-} présentent une expansion très atténuée lors d'une réponse secondaire à Influenza²⁷¹.

Des études comparant des souris Bcl-6^{-/-} à des souris surexprimant Bcl-6 ont démontré que ce facteur de transcription était essentiel à une génération optimale de LTm CD8⁺ et en particulier des T_{CM}^{278, 279}. En effet, après une infection à VV, plus de T_{CM} sont détectables, 10 semaines après immunisation, dans les souris surexprimant Bcl-6. Ceci peut en partie s'expliquer par le fait que Bcl-6 favorise la transition métabolique spécifique aux LTm CD8⁺ en inhibant les gènes codant pour la glycolyse⁴⁰⁹. Ainsi, Bcl-6 apparaît comme crucial à la formation et à l'auto-renouvellement des T_{CM}^{278, 279}.

5.3.4 Id2 / Id3

Id2 et Id3 constituent une autre paire de facteurs de transcriptions influant sur le développement des LTm CD8⁺. Comme dit lors de la section 3, Id2 et Id3 supportent la survie des LTe CD8⁺; Id2 lors de la transition LTn CD8⁺ vers LTe CD8⁺ alors qu'Id3 augmente la survie des LTe CD8⁺ lors de la phase de contraction, au moment de la transition LTe CD8⁺ vers LTm CD8⁺^{280, 281}.

Des souris Id2^{-/-} infectées par *Lm* voient leur nombre de LTe CD8⁺ effecteurs réduits et donc le nombre de LTm CD8⁺ également²⁸². De plus, chez ces mêmes souris Id2^{-/-}, la quantité de T_{EM} formée est moindre que chez les souris contrôles après une infection *Lm*²⁸². Cette diminution du nombre total de LTm CD8⁺ et plus spécifiquement des T_{EM} s'explique par le fait qu'Id2 promeut la survie des lymphocytes en induisant l'expression de Bcl-2²⁸².

Id3 n'a pas un rôle majeur sur les LTe CD8⁺ lors de phase effectrice, il est cependant requis pour la génération au long terme de LTm CD8⁺^{280, 281}. Il a notamment été montré qu'une surexpression d'Id3 augmente la survie des SLECs qui devraient normalement mourir par apoptose^{280, 281}. Les effets anti-apoptotiques d'Id3 sont différents de ceux d'Id2. En effet, alors qu'Id2 induit l'expression de molécules favorisant la survie telle que Bcl-2, Id3 stimule la traduction de gènes codants pour la réplication de l'ADN, limitant ainsi la sensibilité à l'apoptose²⁸⁰.

5.4 Inflammation

Nous avons déjà vu dans la section 3 que les signaux inflammatoires générés lors de différentes infections (IL-12, IFNs de type I) peuvent moduler la différenciation des effecteurs primaires. Les signaux inflammatoires peuvent également avoir un impact sur le rythme de conversion des LTe CD8⁺ en LTm CD8⁺^{401, 410}. L'équipe de Badovinac a très clairement démontré, dans un modèle d'infection *Lm*, que des souris traitées avec des antibiotiques avant ou après l'inoculation du pathogène présentaient une accélération de la transition des LT CD8⁺ effecteurs vers des LT CD8⁺ mémoires^{131, 401}. Ces cellules mémoires générées en présence d'un niveau réduit d'inflammation sont totalement fonctionnelles comme l'indique leur capacité à développer une réponse secondaire à un challenge seulement 7 jours après l'infection initiale⁴⁰¹. De façon intéressante, cette accélération du développement des LTm CD8⁺ induite par un traitement antibiotique peut être réversée en effectuant un traitement CpG qui restaurera l'inflammation⁴⁰¹. Le concept d'un développement mémoire plus précoce dans des conditions d'inflammation réduites a également été prouvé lorsque des souris T-bet déficientes ou IL-12R déficientes sont infectées^{179, 185, 204}. De plus, les modèles d'immunisation via des CD chargées avec un peptide immunogène, présentent un développement des LTm CD8⁺ extrêmement rapide⁴¹¹.

6. Cytokines γ_c dans le développement des LTm CD8⁺

Nous avons détaillé au cours de la section 4 l'impact individuel de quatre cytokines dépendantes de la chaîne γ_c (IL-7, IL-2, IL-15 et IL-21) sur le développement des LTe CD8⁺. Ces molécules ont également un impact sur le développement et sur la survie des LTm CD8⁺^{97, 98, 99, 103, 107, 203, 246, 270, 310, 333, 336}. Elles sont aussi impliquées dans la capacité des LTm CD8⁺ à générer une réponse secondaire lors d'une réinfection. Au cours de cette section nous décrirons précisément le rôle individuel de chacune de ces cytokines sur le destin des LTm CD8⁺.

6.1 IL-2

En absence de signaux IL-2, le nombre de LTm CD8⁺ généré est deux fois moins élevé que ce soit dans un modèle LCMV Armstrong, VV ou *Lm*^{97, 203, 327}. Les LTm CD8⁺ sont issus des LTe CD8⁺ n'ayant pas subi l'apoptose lors de la phase contraction. Ainsi, le pool de LTm CD8⁺ est le direct reflet de la quantité de LTe CD8⁺ au pic de la réponse immune. On peut donc supposer que les LT CD8⁺ IL-2R α ^{-/-} génèrent moins de LTm CD8⁺ car la quantité de LTe CD8⁺ IL-2R α ^{-/-} est plus faible. Il semble peu probable que l'IL-2 influe sur la survie et la prolifération homéostatique des LTm CD8⁺ car celle-ci est en concentration trop faible lors de la maintenance des mémoires CD8⁺¹²⁸. De plus, l'absence d'expression de CD25 à la surface des CD8⁺ mémoires contrôle soutient cette hypothèse¹²⁸. Fait intéressant, après une infection LCMV Armstrong, les LTm CD8⁺ IL-2R α ^{-/-} présentent une proportion augmentée de T_{CM} et une proportion plus réduite de T_{EM} en comparaison des LTm CD8⁺ contrôle^{97, 203}. A ce jour, aucune étude n'a été faite sur une potentielle implication de l'IL-2 dans le développement et le maintien des T_{RM}. L'impact de l'IL-2 sur la réponse secondaire est sujet à controverse. Plusieurs études, avec LCMV comme modèle infectieux, ont suggéré que des signaux IL-2 lors du « priming » de la réponse primaire étaient requis afin de programmer l'expansion des effecteurs secondaires^{97, 203, 322}. Selon ces études, ce programming est essentiel à la survie et à l'accumulation des LTe CD8⁺ mais pas à leur prolifération. A l'opposé, ces signaux IL-2 durant la phase d'activation ne semblent pas être requis pour l'expansion des effecteurs secondaires lors d'une infection à *Lm*³²⁷. Ainsi, le rôle de l'IL-2 dans le développement d'une réponse secondaire semble variable et dépendant du contexte expérimental. Nous attacherons dans la section 1 de la partie résultats à éclaircir l'implication des signaux sur le développement d'une réponse secondaire.

6.2 IL-15

L'IL-15 a comme rôle majeur de soutenir le maintien au long terme des LTm CD8⁺. Elle procède via trois mécanismes bien distincts. Premièrement, l'IL-15 promeut l'expression mitochondriale de l'enzyme métabolique CPT1a (*carnitine palmitoyl transférase 1a*)³⁷³. Cette molécule permet aux cellules mémoires d'adopter un métabolisme énergétique basé sur la phosphorylation oxydative, caractéristique des LTm CD8⁺³⁷³. Deuxièmement, l'IL-15 induit

l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 et favorise ainsi la survie des LTm CD8⁺^{335, 368}. Cependant, les signaux anti-apoptotiques fournis par l'IL-7 sont plus cruciaux que ceux fournis par l'IL-15 pour la survie des LTm CD8⁺^{100, 309}. En effet, les LTm CD8⁺ générés après des infections peuvent survivre de longues périodes en absence d'IL-15 en étant uniquement dépendant de l'IL-7. Cependant, ces cellules mémoires vont finir par disparaître à cause d'un défaut d'IL-15 limitant leur prolifération homéostatique^{333, 367, 369}. Troisièmement, l'IL-15 est essentielle à la prolifération homéostatique des LTm CD8⁺. En effet, bien que le nombre de LTm CD8⁺ généré dans des souris IL-15^{-/-} ou IL-15R α ^{-/-} après une infection LCMV soit identique à celui des souris contrôles, ce nombre décroît avec le temps³³³. Dans la même étude, des expériences de dilution de CFSE par les LTm CD8⁺ ont prouvé que les signaux IL-15 sont indispensables à la prolifération homéostatique³³³. Ce rôle de l'IL-15 a également été mis en évidence dans des infections VSV et VV^{339, 369}.

L'IL-15 est indispensable à la maintenance des T_{CM} et T_{EM}, mais des études récentes étaient partagées sur son impact sur les T_{RM}^{381, 386, 389, 393}. Il semblerait que les T_{RM} de la rate ne requièrent pas d'IL-15 pour leur maintien³⁸⁹ alors que ceux de la peau et des poumons en soient dépendants³⁹³. Finalement, il a été montré que les T_{RM} des tissus intestinaux (IELs et LP), issus de cellules P14 transférées dans des souris IL-15^{-/-}, n'avaient pas besoin de l'IL-15 ni pour leur prolifération homéostatique ni pour leur survie 60 jours après une infection LCMV Armstrong⁴¹². Compte-tenu de l'abondance de l'IL-15 dans l'épithélium intestinal⁴¹³, ce dernier résultat est plutôt étonnant. Nous évoquerons cela plus en détail dans la section 3 de ma partie résultats. Finalement, l'IL-15 n'apparaît pas comme indispensable à l'expansion secondaire des effecteurs⁹⁷ bien qu'elle soit requise pour l'expression du Grz B et la seconde différenciation des T_{EM} suite à une infection secondaire³¹⁰.

6.3 IL-7

L'IL-7 joue un rôle important dans la maintenance des LTm CD8. L'IL-7 permet la survie au long terme des lymphocytes T CD8⁺ mémoires et ce dans différents modèles expérimentaux^{100, 246, 309}. Cette fonction majeure de l'IL-7 a été confirmée via l'utilisation de cellules OT-I IL-7R^{-/-}. Par exemple, l'infection par VSV-OVA de souris transférées avec des LTn CD8⁺ IL-7R^{-/-} ou non a montré que les LTm IL-7R^{-/-} générés ne survivent pas sur le long

terme²⁴⁶. Ce résultat a également été confirmé dans un modèle d'immunisation peptidique toujours avec des cellules CD8⁺ OT-I¹⁰⁰. L'IL-7 favorise la survie des LTm CD8⁺ en augmentant l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2^{100, 246}. En effet, une surexpression de Bcl-2 restaure la survie des LTm CD8⁺ IL-7R^{-/-100}. Cependant, dans des infections LCMV et *Lm*, augmenter l'expression de Bcl-2 ne semble pas suffisant pour restaurer la survie dépendante d'IL-7^{107, 309}. Ainsi, l'IL-7 médie ses effets sur la survie des LTm CD8⁺ par des mécanismes Bcl-2 dépendants et indépendants. Contrairement à l'IL-15, l'IL-7 n'agit pas sur la prolifération homéostatique des LTm CD8⁺⁹⁰. Il est toutefois important de noter que l'absence de signaux de survie IL-7 dépendants ne peut être compensée par des signaux de survie IL-15 dépendants^{100, 309}.

6.4 IL-21

Comme pour les LTe CD8⁺, l'impact de l'IL-21 sur les LTm CD8⁺ dépend du contexte expérimental. Par exemple, dans un modèle d'infection LCMV Armstrong, le nombre de LTm CD8⁺ endogènes générés pour chaque épitope (GP₃₃, NP₃₉₆, GP₂₇₆, NP₂₀₅) n'est pas dépendant des signaux IL-21⁹⁸. En revanche, après une infection avec Adenovirus ou VV, le pool de LTm CD8⁺ est réduit dans les souris IL-21R^{-/-} par rapport aux souris contrôles^{351, 352}. Dans le modèle d'infection par VV, l'IL-21 semble promouvoir la survie des LTm CD8⁺ en augmentant l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-2³⁵². En accord avec ce fait, une surexpression d'IL-21 dans un modèle non-infectieux conduit à une accumulation des LTm CD8⁺⁴¹⁴. De plus, l'IL-21 soutient le développement des cellules mémoires en agissant de concert avec l'IL-10²⁷⁰. Une étude récente a montré que l'absence de signaux IL-21 altère l'accumulation des T_{EM} et des T_{RM} dans un modèle non infectieux⁴¹⁵. Cependant, il a été montré, dans la même étude, que dans le cadre d'une infection avec LCMV Armstrong, l'IL-21 n'était pas requise pour le maintien des différentes populations de LTm CD8⁺ (T_{CM}, T_{EM} et T_{RM})⁴¹⁵. Finalement, cette cytokine semble, encore une fois, avoir des rôles différents dans le cadre d'une réponse secondaire. En effet, après une ré-infection avec Adenovirus ou VV, les LTe CD8⁺ IL-21R^{-/-} présentent une forte expression de la molécule pro-apoptotique TRAIL, ce qui limite la réponse secondaire au pathogène³⁵¹. En revanche, dans le cadre d'une

infection à LCMV, le rôle de l'IL-21 se restreint à soutenir une production optimale d'IL-2 sans pour autant affecter la réponse secondaire⁹⁸.

6.5 Synergie et Redondance

Il est indéniable que les cytokines IL-2, IL-15, IL-7 et IL-21 ont un impact sur le développement et le maintien des LTm CD8⁺. Fait intéressant, la délétion individuelle d'une de ces cytokines résulte en une réduction du nombre de LTm CD8⁺^{97, 98, 203, 230, 246, 309, 333, 339, 351, 352}. En revanche, une abrogation complète des signaux γ_c dépendants conduit à une absence totale de LTm CD8⁺¹⁰⁷. Cette donnée suggère donc que ces cytokines ont des rôles combinés et redondants sur la génération des LTm CD8⁺. Quelques études commencent à montrer que les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 agissent de manière redondante ou synergique sur le développement des LTm CD8⁺^{97, 99, 270}. Cependant, des études complémentaires sont requises afin de clairement établir les mécanismes synergiques et/ou redondants des cytokines IL-2, IL-15, IL-7 et IL-21 sur : la génération, le maintien des LTm CD8⁺ et leur capacité à développer une réponse secondaire efficace. Ces aspects seront étudiés lors des sections 1 et 2 de la partie résultats.

Les rôles des cytokines IL-2, IL-15, IL-7 et IL-21 sur la différenciation et la maintenance des T_{CM}, T_{EM} ou T_{RM} n'ont été que pauvrement évalués et restent donc très peu définis. Nous avons vu au cours de la section 3 qu'un panel important de facteurs de transcription contrôlait le développement des SLECs et des MPECs. Par la suite, nous avons vu et suggéré à la section 4 que les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 pouvaient réguler la différenciation des SLECs et des MPECs en modifiant les niveaux d'expression de ces mêmes facteurs de transcriptions. Fait intéressant, ces mêmes molécules influent également sur la génération et le maintien des T_{CM}, T_{EM} ou T_{RM} comme nous l'avons vu dans la section 5. Ainsi, il est pertinent de penser que les cytokines dépendantes de la chaîne γ_c sont capables de contrôler le développement et l'homéostasie des diverses populations de LTm CD8⁺ en altérant l'expression de ces facteurs de transcription clés, comme elles le font pour les SLEC/MPEC. Afin de mieux comprendre l'influence des cytokines IL-2, IL-15, IL-7 et IL-21 sur le développement des T_{CM}, T_{EM} ou T_{RM}, il sera nécessaire d'évaluer l'expression des

facteurs de transcriptions clés au sein des LTm CD8⁺ en l'absence des signaux dépendants de ces cytokines particulières. Ce que nous explorerons lors de la section 1 de ma partie résultats.

7. Problématiques, Hypothèses et Objectifs

7.1 Problématique 1 : Influences combinées des cytokines IL-2 et IL-15 sur la génération des réponses LT CD8⁺ antivirales primaires et secondaires

Nous avons vu dans les sections 4 et 6 de cette introduction que les cytokines dépendantes de la chaîne γ_c étaient impliquées dans le développement des LTe et LTm CD8⁺.

Il a été montré qu'une abrogation complète des signaux γ_c dépendants résultait en une réduction drastique du nombre de LTe CD8⁺¹⁰⁷. En effet, il a été prouvé que des cytokines telles que l'IL-2 et l'IL-15 supportaient comme contribuant fortement au développement des LTe CD8⁺. En absence de signaux IL-2, l'expansion des LTe CD8⁺ est réduite d'un facteur 2 à 3 selon le modèle expérimental^{97, 203, 325, 328}. L'influence de l'IL-15 sur les LTe CD8⁺ est quant à lui sujet à débat. En effet, certains auteurs suggèrent que cette cytokine supporte l'expansion des LTe CD8⁺^{339, 340} alors que d'autres soutiennent que non^{105, 106, 333}. En ce sens, il est nécessaire de clarifier le rôle de l'IL-15 sur l'expansion primaire des LTe CD8⁺. De plus, l'IL-2 et l'IL-15 ont toutes les deux été montré comme ayant un impact sur la différenciation ou la maintenance des SLECs. En effet, l'absence de signaux IL-2 ou IL-15 conduit à une réduction des fréquences de SLECs à J7 pi dans une infection LCMV Armstrong⁹⁷. L'IL-2 favorise leur différenciation en induisant l'expression de facteurs de transcription clés (T-bet, Blimp-1)^{250, 265, 271}. L'IL-15 a été montré comme un facteur favorisant la survie des SLECs^{102, 340}. Enfin, ces deux cytokines sont capables de soutenir l'expression de molécules cytotoxiques (Grz A, Grz B et perforine)^{97, 104, 250}. L'ensemble de ces données suggère que les cytokines IL-2 et IL-15 possèdent des fonctions redondantes et synergiques sur la réponse primaire LT CD8⁺.

Il a également été montré qu'une abrogation complète des signaux γ_c dépendants résultait en une absence totale de LTm CD8⁺¹⁰⁷. A l'opposé, une délétion individuelle d'IL-2, IL-7, IL-15 ou IL-21 ne conduit qu'à une réduction partielle et non complète du nombre de LTm CD8⁺^{97, 98, 203, 230, 246, 309, 333, 339, 351, 352}. Ceci suggère que ces cytokines ont des fonctions

synergiques et redondantes dans la génération des LTm CD8⁺. En ce sens, les cytokines IL-2 et IL-15 présentent un intérêt particulier. En effet, ces deux cytokines partagent non seulement les mêmes chaînes CD122 et CD132 sur leur récepteur mais elles ont également en commun des voies de signalisation identiques (JAK1-3/STAT5 et PI3K/Akt)^{128, 334, 336}. De plus, la structure quaternaire du complexe IL-2/IL-2R et celle du complexe IL-15/IL-15R sont quasiment identiques³⁵⁵.

Des rapports conflictuels existent sur l'implication des signaux IL-2 sur l'expansion des effecteurs secondaires. En effet, certains auteurs suggèrent que les signaux IL-2 présents lors du « priming » initial lors de la primo-infection programment l'expansion des effecteurs secondaires^{97, 203, 322}. A l'opposé, une autre étude a montré que les signaux IL-2 durant la phase d'activation initiale ne semblent pas être requis pour l'expansion des effecteurs secondaires³²⁷. En ce sens, il apparaît nécessaire de clarifier l'implication de l'IL-2 sur l'expansion des effecteurs secondaires. Par ailleurs, aucune étude n'a observé si les cytokines IL-2 et IL-15 possédaient des rôles identiques lors d'infections primaires et secondaires. Autrement dit, il n'a pas été clairement montré si l'expansion, la différenciation et l'acquisition des fonctions effectrices des effecteurs secondaires sont régulées par les mêmes signaux cytokiniques.

7.1.1 Hypothèse : Nous émettons l'hypothèse que les cytokines IL-2 et IL-15 possèdent des fonctions synergiques et redondantes dans le développement de la réponse immune LT CD8⁺ antivirale primaire et secondaire.

7.1.2 Objectifs : Nous testerons notre hypothèse au cours de la section 1 de la partie résultats. Durant cette section 1, les objectifs seront d'évaluer les impacts d'une déficience combinée en signaux IL-2 et IL-15 dépendants sur :

- 1/ Le développement d'une réponse effectrice primaire et la différenciation des effecteurs (SLECs, MPECs)
- 2/ La génération et le maintien des LTm CD8⁺ et en particulier sur les T_{CM} et T_{EM}
- 3/ L'élaboration d'une réponse secondaire efficiente

7.2 Problématique 2 : Influence de l'IL-21 sur le développement des LTe et LTm CD8⁺ en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants

Au cours de la problématique 1, nous allons étudier l'impact combiné des cytokines IL-2 et IL-15 sur le développement d'une réponse immune LT CD8⁺ antivirale. Nous nous intéresserons notamment aux contributions synergiques que ces deux cytokines auront sur la génération et l'homéostasie des LTe CD8⁺ (SLECs, MPECs) et LTm CD8⁺ (T_{CM} et T_{EM}). Cette étude a été élaborée à partir du postulat que l'IL-2 et l'IL-15 étaient deux cytokines de la famille γ_c capables d'avoir des rôles combinés et redondants sur une réponse immune LT CD8⁺. Cependant, une autre cytokine de cette famille, l'IL-21, peut également avoir des rôles synergiques sur les LT CD8⁺^{99, 270, 348}. En effet, il a été montré qu'*in vitro*, l'IL-21 agit en combinaison avec l'IL-15 afin d'augmenter la prolifération des LT CD8⁺ activés^{99, 348}. Toujours *in vitro*, l'IL-21 accroît, en synergie avec l'IL-7, la sécrétion de cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α) ainsi que les fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺ à l'encontre de cellules tumorales⁴¹⁶. Il a été montré qu'*in vivo*, l'IL-21 favorise le développement des LTm CD8⁺ en agissant en synergie avec l'IL-10²⁷⁰.

Des études contradictoires existent sur le rôle de l'IL-21 *in vivo* sur le développement d'une réponse immune LT CD8⁺. En effet, en réponse à une infection à LCMV Armstrong, les souris IL-21^{-/-} ou IL-21R^{-/-} montent une réponse effectrice T CD8⁺ similaire en terme d'expansion et de cytotoxicité à celle des souris contrôles^{98, 350}. A l'opposé, des études utilisant VV comme agent infectieux ont prouvé que les LTe CD8⁺ IL-21R^{-/-} proliféraient moins et possédaient des fonctions cytotoxiques réduites^{99, 351, 352}. De plus, il n'a pas encore été montré si l'IL-21 modulait la différenciation des SLECs et des MPECs. En ce sens, il est nécessaire d'éclaircir l'implication exacte de l'IL-21 dans plusieurs aspects d'une réponse immune LT CD8⁺. Nous émettons l'hypothèse que les différences observées dans l'impact de l'IL-21 dans ces différents modèles peuvent s'expliquer par la présence de cytokines ayant des fonctions redondantes ou synergiques à celles de l'IL-21. Nous avons vu que l'IL-21 agit en synergie *in vitro* avec l'IL-15 et l'IL-7 afin de promouvoir la prolifération et la sécrétion de cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α) de LT CD8⁺ activés^{99, 416}. Cependant, un tel rôle synergique de l'IL-21 n'a pas encore été montré *in vivo*. Nous pensons donc que dans un modèle *in vivo* où l'IL-21 n'a apparemment aucun rôle sur la réponse LT CD8⁺, tel que

LCMV Armstrong, son impact est masqué par l'action de cytokines possédant des fonctions similaires. Ainsi, nous pensons que l'IL-21 agit en synergie avec l'IL-2 et l'IL-15 afin de soutenir la réponse immune LT CD8⁺ dans une infection LCMV Armstrong.

7.2.1 Hypothèse : Compte tenu de ces données, nous émettons l'hypothèse qu'une combinaison des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 contrôle le développement des LTe et LTm CD8⁺

7.2.2 Objectifs : Nous testerons notre hypothèse au cours de la section 2 de la partie résultats. Durant cette section 2, les objectifs seront d'évaluer les impacts d'une triple déficience en signaux IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants sur :

- 1/ Le développement d'une réponse effectrice primaire et la différenciation des effecteurs (SLECs, MPECs)
- 2/ La génération des LTm CD8⁺ et en particulier sur les T_{CM} et T_{EM}

7.3 Problématique 3 : Impact des signaux IL2R β sur la migration des LT CD8^+ et sur le développement des T RM

Au cours des problématiques 1 et 2, nous allons notamment étudier l'influence combinée des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sur le développement et la maintenance de deux sous-types de LT CD8^+ ; les T CM et les T EM suite à infection LCMV Armstrong. Cependant, nous n'avons pas encore abordé l'impact de ces cytokines de la famille γ_c sur l'homéostasie des T RM , population de LT CD8^+ résidente des tissus.

Plusieurs données fournies par la littérature actuelle supportent le fait que les cytokines IL-21 et IL-15 peuvent être impliquées, selon le contexte expérimental, dans l'homéostasie des T RM . Une étude récente a montré que l'absence de signaux IL-21 résulte en une réduction du nombre de LT CD8^+ dans les tissus non lymphoïdes (poumon, foie, rein, IE (épithélium intestinal) et LP (lamina propria)) 160 jours après reconstitution de souris irradiées létalement avec des chimères de moelle osseuse contenant un mélange 1 pour 1 de PBMC IL-21R $^{+/+}$ et IL-21R $^{-/415}$. A l'opposé, il a été montré, dans la même étude, que dans le cadre d'une infection avec LCMV Armstrong, l'IL-21 n'était pas requise pour le maintien des T RM dans l'épithélium intestinal⁴¹⁵. Ces données soutiennent encore une fois, que le rôle de l'IL-21 dans la réponse immune LT CD8^+ varie selon le contexte expérimental. L'IL-15 étant notamment connue pour assurer la maintenance des T CM et T EM ³⁶⁶, son impact sur la maintenance des T RM a été évalué dans plusieurs études. Il a été montré, via un transfert adoptif de cellules P14 dans des souris naïves contrôles ou IL-15 $^{-/}$, que les T RM de la rate sont beaucoup moins dépendants des signaux IL-15 pour leur survie que les T CM et T EM 60 jours après une infection LCMV Armstrong³⁸⁹. A l'opposé, le traitement avec un anti-IL-15+IL-15R de souris infectées avec HSV ou Influenza résulte en une réduction d'un facteur 3 du nombre de T RM de la peau et des poumons après plus de 14 post-infection³⁹³. Finalement, il a été montré que les T RM des tissus intestinaux (IELs et LP), issus de cellules P14 transférées dans des souris IL-15 $^{-/}$, n'avaient pas besoin de l'IL-15 ni pour leur prolifération homéostatique ni pour leur survie 60 jours après une infection LCMV Armstrong⁴¹². En raison des différences expérimentales entre ces trois études (modèles murins et infectieux et localisation des T RM étudiés), un rôle clair de l'IL-15 sur la maintenance des T RM n'a pu être établi.

Nous venons de voir que plusieurs articles avaient étudié l'implication de l'IL-15 dans la maintenance des T_{RM} . Cependant, une des limites de ces études est le fait qu'il a été très peu observé si l'absence de signaux IL-15 limitait la migration et la résidence des $LT\ CD8^+$. En effet, une réduction du nombre de T_{RM} dans les organes non lymphoïdes et dans un contexte IL-15 déficient pourrait être la conséquence à la fois d'un défaut de survie mais également d'un défaut de migration.

Quand on discute du développement des T_{RM} , la migration est un élément fort important. En effet, dans un excellent article, Masopust a clairement montré que seuls des $LTe\ CD8^+$ spléniques précoces (entre 4 et 5 jours pi) possèdent la faculté à migrer vers la muqueuse intestinale suite à une infection ip avec LCMV Armstrong³⁷⁸. Cette capacité à migrer et à investir la muqueuse intestinale est rapidement perdue par les $LTe\ CD8^+$ à partir de jour 7 pi³⁷⁸. Ainsi, selon le modèle proposé par cette étude, des $LTe\ CD8^+$ spléniques migrent très précocement vers les tissus intestinaux et sont les seuls effecteurs spléniques aptes à se différencier en T_{RM} .

La régulation de la migration, des $LTe\ CD8^+$, via l'expression de marqueurs de migration, est donc un critère majeur dans le développement des T_{RM} . Il a notamment été montré que certaines cytokines de la famille γ_c étaient capables de moduler l'expression de marqueurs de migration à la surface des $LTe\ CD8^+$. En effet, l'IL-21 promeut l'expression de $\alpha 4\beta 7$, marqueur de migration vers l'intestin, *in vitro* et *in vivo* sur des $LTe\ CD8^+$ ⁴¹⁵. Par ailleurs, il a été démontré que l'IL-15 favorise l'expression des ligands aux P- et E-selectin sur les $LTm\ CD8^+$ facilitant ainsi la migration vers les tissus inflammés⁴¹⁷. Il est donc tout à fait envisageable que l'IL-15 puisse réguler le développement des T_{RM} en contrôlant la migration des $LTe\ CD8^+$ précoces vers les muqueuses et assurer la maintenance des T_{RM} .

7.3.1 Hypothèse : Nous émettons l'hypothèse que l'IL-15 module le développement et la maintenance des T_{RM} des tissus intestinaux en régulant d'abord la migration de leurs progéniteurs mais également en assurant ensuite leur maintenance sur le long terme.

7.3.2 Objectifs : Nous testerons notre hypothèse au cours de la section 3 de la partie résultats. Durant cette section 3, les objectifs seront de caractériser l'impact des signaux IL2R β sur

l'expression de marqueurs de migration intestinaux et sur la capacité des LT α CD8 $^{+}$ à migrer vers les tissus intestinaux en l'absence de signaux IL-15 dépendants.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

1. Modèles murins

Afin de répondre à nos différentes hypothèses de travail, nous avons utilisé plusieurs modèles murins particuliers. L'ensemble de nos souris donneuses étaient C57BL/6 CD45.2 $^{+}$ Rag2 $^{-/-}$ et possédaient un RCT transgénique P14. Ainsi, ces souris ne génèrent qu'une population monoclonale naïve de LT α CD8 $^{+}$ spécifiques de la glycoprotéine GP $_{33-41}$ du virus LCMV 418 . Nous avons à notre disposition trois groupes de souris transgéniques : des souris contrôles P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (abrégé P14 dans le texte), des souris P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (déficiences pour les signalisations IL-2 et IL-15 dépendantes) et enfin des souris P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL-21R $^{-/-}$ (déficiences pour les signalisations IL-2, IL-15 et IL-21 dépendantes). Pour étudier les effets redondants ou synergiques des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 lors d'infections primaires, des souris receveuses naïves C57BL/6 CD45.1.2 $^{+}$ (agées de 8 à 10 semaines) ont reçu par transfert adoptif 10 5 P14 ou P14 IL2R $\beta^{-/-}$ ou P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL-21R $^{-/-}$ LT α CD8 $^{+}$ de souris donneuses (agées de 6 à 8 semaines). Afin de prévenir le rejet des cellules transférées, les souris receveuses naïves C57BL/6 CD45.1.2 $^{+}$ ont été générées en croisant des souris P14 $^{-}$ CD45.2 $^{+}$ avec des souris C57BL/6 CD45.1 $^{+}$ (B6.SJL, Jackson Laboratory). Pour les infections secondaires, 10 4 P14 ou P14 IL2R $\beta^{-/-}$ CD45.2 $^{+}$ LT α CD8 $^{+}$ (Jour 70 post-infection) ont été transférées dans des souris receveuses naïves C57BL/6 CD45.1.2 $^{+}$ (agées de 8 à 10 semaines). Pour les tests de cytotoxicité *in vivo*, des souris perforine déficientes (Pfp $^{-/-}$, B6 $^{Prf1tm1sdz/J}$, Jackson Laboratory) ont été utilisées comme souris receveuses. L'ensemble des souris utilisées lors de cette thèse ont été maintenues dans un environnement libre de tout pathogènes dans l'animalerie du Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine. Les animaux ont été manipulés en accord avec les lignes directrices du Conseil Canadien de la Protection des Animaux (CCPA). Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le Conseil Institutionnel de Bonnes Pratiques Animales en Recherche du CHU Sainte-Justine.

2. Virus, titres viraux et infection des souris

Le virus LCMV Armstrong a été obtenu de Rolf M. Zinkernagel (Hopital Universitaire de Zurich Suisse) et a été cultivé dans des cellules BHK-21⁴¹⁹. Les titres viraux ont été déterminés en observant les plages de lyse sur des cellules MC57G⁴²⁰.

Les souris receveuses C57BL/6 CD45.1.2⁺ ont été infectées 20h après avoir reçu le transfert adoptif de LTn ou LTm CD8⁺ P14. Que ce soit pour les infections primaires ou secondaires, la dose virale injectée par voie intrapéritonéale était 2.10⁵ PFU de LCMV Armstrong. Toutes les souris infectées étaient maintenues dans des salles dédiées aux animaux infectés dans les animaleries du Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine et de l'Institut National de Recherche Scientifique (INRS)-Institut Armand Frappier (IAF).

3. Traitement avec des anticorps bloquants

Au cours de plusieurs expériences, un anticorps bloquant anti-CD122 (TM-β1, 200μg/injection ip) a été injecté un jour avant le transfert adoptif de LTn CD8⁺ P14 et tout les deux jours jusqu'à J6 post-infection. D'autres groupes de souris ont reçus le même traitement exclusivement durant la phase de réinfection ou durant les phases d'infections primaires et secondaires. Les souris des groupes contrôles ont été traitées de la même manière avec un anticorps bloquant contrôle (LTF-2) dirigé contre la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), molécule d'un gastéropode nommé patelle. Les anticorps bloquants anti-CD122 et LTF-2 ont été commandés chez la compagnie BioXcell.

4. Isolement cellulaire

Le sang périphérique (100μL) a été obtenu par prélèvement rétro-orbital ou dans la veine saphène dans des tubes contenant 100μL de PBS 1X complémenté avec de l'EDTA (5mM). Les cellules de la moelle osseuse ont été obtenues en injectant plusieurs fois une solution de PBS 1X à l'intérieur des fémurs de souris préalablement sacrifiées. Les cellules spléniques ont été obtenues en écrasant la rate des souris sur un filtre en nylon de 100μM. Par la suite, des suspensions cellulaires du sang, de la moelle osseuse et de la rate ont été générées et une lyse des érythrocytes a été effectuée (NH₄CL ou BD FACS Lysing Buffer).

Pour récupérer les cellules de l'intestin (*Intra Epithelium Lymphocytes* ou IELs et Lamina Propria ou LP), nous avons préalablement séparé le petit intestin du reste de l'organe et nous y avons également excisé les plaques de Peyer. Ensuite, le petit intestin a été ouvert de manière longitudinale et lavé dans une boîte de Pétri contenant 5mL de PBS 1X froid. Une fois lavé, le petit intestin a été découpé en plusieurs morceaux de 1 cm. Ces derniers ont alors été placés dans 15mL d'un milieu d'isolement des IELs préchauffé à 37°C (Milieu RPMI 1640, L-Glutamine 1X (GIBCO), 1% SVF, 1mM EDTA, 1,5mM MgCl₂) et agités à 260 rpm pendant 20 minutes à 37°C. Une fois le temps d'incubation écoulé, le surnageant a été récolté, filtré à travers un filtre en nylon de 100µM et déposé dans un tube 50mL contenant 20mL de PBS 1X. Le culot restant après incubation a été complété avec de nouveau 15mL de milieu d'isolement des IELs préchauffé à 37°C. Cette préparation a été une nouvelle fois incubée pendant 20 minutes à 37°C avec une agitation à 260 rpm. Le supernageant a ensuite été récupéré, filtré et ajouté au supernageant récolté après la première incubation. Le tube de récolte des surnageants contenant les IELs a alors été centrifugé (1500 rpm, 10 minutes à 4°C) et resuspendu dans 1mL de PBS 1X froid.

Afin de récupérer les cellules de la LP, nous avons repris le culot d'intestin restant suite à la seconde incubation avec 15 mL de milieu d'isolement des LP préchauffé à 37°C (Milieu RPMI 1640, L-Glutamine 1X (GIBCO), 20% SVF et 3,5 mg de collagenase type VIII (Sigma) pour 15 mL de RPMI/20% SVF) et agités à 260 rpm pendant 5 minutes à 37°C. Après cette courte incubation, le surnageant contenant encore des IELs a été jeté. 15 mL de milieu d'isolement des LP ont été rajouté au culot et le tout a été incubé 20 minutes à 37°C avec une agitation à 260 rpm. Le surnageant a ensuite été récolté, filtré à travers un filtre en nylon de 70µM et déposé dans un tube 50mL contenant 20mL de PBS 1X. Le culot restant après incubation a été complété avec de nouveau 15mL de milieu d'isolement des LP préchauffé à 37°C. Cette préparation a été une nouvelle fois incubée pendant 20 minutes à 37°C avec une agitation à 260 rpm. Le supernageant a ensuite été récupéré, filtré et ajouté au supernageant récolté après la première incubation. Le tube de récolte des surnageants contenant les IELs a alors été centrifugé (1500 rpm, 10 minutes à 4°C) et resuspendu dans 1mL de PBS 1X froid.

5. Induction des marqueurs de migration sur des LT CD8⁺ cultivés *in vitro*

L'influence de la cytokine IL-2 sur l'expression de différents marqueurs de migration CXCR3 (eBioscience, clone CXCR3-173), $\alpha 4\beta 7$ (eBioscience, clone DATK32), CCR9 (eBioscience, clone eBioCW-1.2) et résidence CD103 (eBioscience, clone 2E7) a été évalué sur des LTn CD8⁺ activés *in vitro*. Nous avons stimulé, dans du RPMI complet (RPMIc), 2.10^4 P14 naïfs avec 2.10^4 cCD chargées avec $0,1\mu\text{M}$ de peptide GP₃₃₋₄₁ dans une plaque 96 puits à fond conique. Les cCD avaient été récoltées à partir de souris C57BL/6 CD45.2⁺ (B6.J, Jackson Laboratory) à l'aide d'un kit d'isolement des cellules CD11c⁺ (Miltenyi Biotec). Après 48h de stimulation, les P14 activés ont été récoltés, regroupés et lavés avec du RPMIc. Ils ont ensuite été déposés en nombres égaux dans différents puits d'une plaque 96 puits à fond plat. Les puits ont reçus ou non de l'IL-2 à diverses concentrations ($0,1$ U/mL ou 5 U/mL). Dans le but d'induire l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sur les LT CD8⁺ activés *in vitro*, les cellules ont été mises en culture, 48h après la stimulation initiale, avec de l'acide rétinoïque (RA) à 500 nM. Le RA étant une molécule connue pour soutenir l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ à la surface de LT CD8⁺ activés^{421, 422}. Afin de maintenir, les LT CD8⁺ activés en prolifération et ce 48h après leur stimulation, une dose de peptide GP₃₃₋₄₁ ($0,1\mu\text{M}$) a été rajoutée au milieu de culture. 96h après la stimulation et 48h après l'ajout ou d'IL-2 et/ou de RA, l'expression extracellulaire de $\alpha 4\beta 7$, CCR9, CD103 et CD25 (eBioscience, clone PC61.5) est quantifiée sur les LT CD8⁺ P14 par cytométrie en flux.

6. Marquage cellulaire, analyse de cytométrie et tri cellulaire

Les suspensions cellulaires de sang, moelle osseuse, rate et intestin ont été marquées dans 50 à 100 μL de PBS 1X (complété avec 2% de SVF) pendant 15 minutes sur glace et à l'abri de la lumière. Avant d'être marquées, les cellules ont subi un traitement au Fc-block afin d'éviter tout marquage aspécifique. Les anticorps monoclonaux utilisés lors des expériences ont tous été achetés chez eBioscience ou BD Bioscience excepté le Grz B (Molecular Probes) et le CD43 (BioLegend, clone 1B11). Le marquage CCR7 a été fait en incubant les cellules pendant 40 minutes à 37°C avec du CCR7-biotin (eBioscience, clone 4B12). De l'ultra-avidin-R-phycoerythrin (Leinco) a été utilisé pour révéler le marquage CCR7. Les tétramères de CMHI spécifiques des peptides GP₃₃₋₄₁ et NP₃₉₆ nous ont été fournis respectivement par F.

Lemaître (Institut Pasteur, Paris) et A. Lamarre (INRS-IAF). Nous avons couplé ces tétramères avec de l'ultra-avidin-R-phycoerythrin (Leinco). Ces tétramères ont été utilisés en simultané des marquages effectués avec des anticorps extracellulaires. Les cellules mortes ont été exclues à l'aide du marqueur de viabilité cellulaire avant fixation (Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain kit, Molecular Probes). Les marquages avec Mitotracker Deep Red (Invitrogen) et Annexin V/7-AAD (eBioscience) ont été effectués selon les instructions du fournisseur et avant les marquages d'anticorps monoclonaux. Pour étudier la prolifération homéostatique des LTm CD8⁺ IL2Rβ déficients ou non, 1 mg de BRDU (Sigma Aldrich) dans une solution de PBS 1X a été injecté par voie intrapéritonéale tout les jours de J50 à J70 post-infection. Le marquage du BRDU à J70 post-infection a été effectué en suivant le protocole du fournisseur du kit de marquage (BD Biosciences). L'acquisition des données de fluorescence a été faite sur un cytomètre en flux de type FACS LSR Fortessa (BD Biosciences). Les analyses des données récoltées par cytométrie en flux ont été effectuées à l'aide du logiciel FlowJo (Treestar). Pour l'étude des réponses secondaires, les LTm CD8⁺ P14 CD45.2⁺ IL2Rβ^{+/-} ou IL2Rβ^{-/-} encore vivant à J70 post-infection ont été triés sur la base du phénotype suivant : CD8⁺ CD3⁺ CD45.1⁻ CD45.2⁺ P14. Les tris cellulaires ont été effectués sur un BD FACS Aria II (98% pureté).

7. Marquage intracellulaire et test de cytotoxicité *in vivo*

Les marquages intracellulaires ont été effectués à la suite d'une fixation et d'une perméabilisation de splénocytes fraîchement isolés avec les kits de *Fixation and Permeabilization* (BD Biosciences ou eBioscience). Les productions d'IFNγ (BD Biosciences, clone XMG1.2), de TNFα (eBioscience, clone MP6-XT22) et d'IL-2 (eBioscience, clone JES6-5H4) ont été évaluées par cytométrie intracellulaire après une restimulation de 4h *in vitro* avec du peptide GP₃₃₋₄₁ (0,2 μg/mL) et en présence de brefeldin A (10 μg/mL). De la même manière, la capacité à dégranuler des LTe CD8⁺ a été observée après 5h de restimulation *ex vivo* en présence de l'anticorps CD107a (BD Biosciences, clone 1D4B) et de Golgi stop (Monensin, BD Biosciences). Les marquages Grz B (Life-technologies) et perforine (eBioscience, clone eBioOMAK-D) ont été effectués sans restimulation. Les marquages Bim (Cell Signaling, clone C34C5), Bcl-2 (BD Biosciences, kit FITC Hamster

Anti-Mouse Bcl-2 FITC), active-caspase 3 (BD Biosciences, kit PE Active Caspase-3 Apoptosis), Ki-67 (eBioscience, clone SolA15), T-bet (eBioscience, clone 4B10), Eomes (eBioscience, clone Dan11mag) et pSTAT5 Y694 (Cell Signaling, clone C71E5) ont tous été effectués en accord avec les protocoles des fournisseurs. Pour le marquage Bim, un anticorps de singe couplé à la *fluorescein isothiocyanate* (FITC), dirigé contre l'anticorps de lapin anti-Bim (Cell Signaling), a été utilisé comme anticorps secondaire (Jackson ImmunoResearch). Pour les tests de cytotoxicité *in vivo*, 10⁶ splénocytes marqués au CFSE (1 µM) et chargés avec du peptide GP₃₃₋₄₁ (10 µg/mL) ont été transférés par voie intraveineuse à chaque souris Pfp^{-/-} à J7 post-infection. En même temps, ces souris ont également été injectées avec 10⁶ splénocytes marqués au CFSE (0,1 µM) et non chargés avec du peptide GP₃₃₋₄₁. Ce protocole pour évaluer la cytotoxicité *in vivo* des LTe CD8⁺ reproduit celui d'une précédente étude¹⁰⁷. La formule utilisée pour calculer le pourcentage de «killing» est la suivante :

$$100 - \frac{100 \times (\% \text{ peptide-loaded infected mice} / \% \text{ unloaded infected mice})}{\% \text{ peptide-loaded control mice} / \% \text{ unloaded control mice}}$$

8. Extraction d'ARN et PCR quantitative

Les ARN ont été isolés de 2.10⁴ cellules triées LT CD8⁺ P14 CD45.2⁺ IL2Rβ^{+/-} ou IL2Rβ^{-/-} à différents temps post-infection. Les cellules triées ont été récoltées dans 350 µL de Trizol (Invitrogen) froid. Les ARN ont ensuite été purifiés avec le kit RNeasy Micro (Qiagen) et les ADN complémentaires ont été synthétisés en utilisant le kit Superscript VILO (Invitrogen). Les PCR quantitatives ont été effectuées sur un thermocycleur Stratagene Mx3000P (Agilent Biosystems). La sonde fluorescente choisie pour quantifier l'ADN à chaque cycle d'amplification était le SYBR Green (SYBR Select Master Mix, Applied Biosystems). La température d'hybridation des amorces était de 60°C et le nombre total de cycles d'amplification était de 40. Les couples d'amorces utilisés lors des PCR quantitatives sont exposés dans le tableau ci-dessous et ont toutes été utilisées à la concentration de 200nM (**Tableau 3**).

Gène	Amorce
Prdm1	F : ACACACAGGAGAGAAGCCACATGA R : TCGAAGGTGGGTCTTGAGATTGCT
Tbx21	F : AGGGGACACTCGCAACAGA R : AGGGGGCTTCCAACAATG
Eomesodermin	F : CCGCCCACTACAATGTTTTTC R : GAAATCTCCTGCCTCATCCA
KLF2	F : TGTGAGAAATGCCTTTGAGTTTACTG R : CCCTTATAGAAATACAATCGGTCATAGTC
Bcl-6	F : GGGACATCTTGACGGACGTT R : TCACGGGAGGTTTAAGTGC
Granzyme A	F : TTTCATCCTGTAATTGGACTAA R : GCGATCTCCACACTTCTC
Granzyme B	F : CCTCCTGCTACTGCTGAC R : GTCAGCACAAAGTCCTCTC
Hprt	F : CTCCTCAGACCGCTTTTTTGC R : TAACCTGGTTCATCATCGCTAATC

Tableau 3 : Couples d'amorces utilisés lors des PCR quantitatives

9. Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Les tests utilisés au cours de cette thèse sont le test de t non pairé de Student et l'ANOVA de Kruskal-Wallis. Une valeur de «p» inférieure à 0,05 pour ces tests étant considérée comme une différence significative.

Chapitre 3 : RESULTATS

1. Influences combinées des cytokines IL-2 et IL-15 sur la génération des réponses LT CD8⁺ antivirales primaires et secondaires

Mise en contexte

Nous avons vu au cours des sections 4 et 6 de l'introduction que les cytokines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21 étaient fortement impliquées dans le développement optimal des LTe et LTm CD8⁺. Plusieurs études ont effet mis en lumière, l'impact individuel de ces cytokines sur la réponse immune CD8⁺. Cependant, plusieurs indices suggèrent que ces cytokines dépendantes de la chaîne γ_c peuvent agir de manière synergique. En effet, il a été montré *in vitro* que l'IL-21 collaborait avec l'IL-15 afin d'amplifier l'expansion de LT CD8⁺ activés⁹⁹. De plus, la délétion individuelle d'IL-2, IL-7, IL-15 ou IL-21 limite le nombre de LTm CD8⁺ générés alors qu'une déficience totale en signaux γ_c dépendants résulte en une absence complète de LTm CD8⁺^{97, 98, 107, 203, 230, 246, 309, 333, 339, 351, 352}. Ainsi, afin de mieux comprendre l'ensemble des mécanismes impliqués dans le développement et la maintenance des LTe et LTm CD8⁺, il est essentiel de caractériser les fonctions synergiques et redondantes des cytokines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21. En ce sens nous nous proposons d'étudier les rôles combinés de l'IL-2 et l'IL-15. Ces deux cytokines, en plus de partager la chaîne CD132, présentent également la même chaîne CD122 sur leur récepteur et les mêmes voies de signalisation (JAK1-3/STAT5 et PI3K/Akt)^{128, 334, 336}. Finalement, la structure quaternaire du complexe IL-2/IL-2R et celle du complexe IL-15/IL-15R sont quasiment identiques³⁵⁵.

Compte tenu de ces données, nous émettons l'hypothèse que les cytokines IL-2 et IL-15 possèdent des rôles synergiques et redondants dans le développement de la réponse immune LT CD8⁺ antivirale.

1.1 Les signaux IL-2R β dépendants supportent l'expansion des LTe CD8⁺ et soutiennent la différenciation des SLECs sans affecter leurs fonctions effectrices

1.1.1 La survie et la prolifération des effecteurs primaires sont réduites en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants

Nous avons vu durant l'introduction que l'IL-2 et l'IL-15 sont deux cytokines ayant un rôle dans le développement de la phase d'expansion des LTe CD8⁺. Plusieurs études ont montré que l'absence de signaux IL-2 réduit de 2 à 3 fois le nombre d'effecteurs LT CD8⁺ générés au pic de la réponse selon le contexte expérimental^{97, 203, 325, 326, 327, 423}. En ce qui concerne l'IL-15, sa nécessité dans l'établissement d'une expansion optimale est controversée et dépend du modèle expérimental^{104, 105, 106, 333, 339, 340}. Il semble notamment que dans des infections LCMV ou *Lm*^{105, 106, 333}, l'IL-15 n'ait pas d'impact alors que dans une infection VSV ou dans un modèle de vaccination via des cCD, l'IL-15 semble être indispensable à l'expansion^{104, 339}. Cela suggère que dans certains modèles expérimentaux, l'absence de signaux IL-15 peut être compensée par l'action d'autres molécules possédant des fonctions redondantes à celles de l'IL-15. Etant donné les fortes similitudes entre les cytokines IL-2 et IL-15, nous pouvons supposer que ces deux molécules possèdent un impact simultané et redondant sur l'expansion des LTe CD8⁺. En conséquence, étudier l'expansion des LTe CD8⁺ IL2R β ^{-/-} permettra de clarifier l'impact de de l'IL-2 et de l'IL-15 sur l'expansion. Plus précisément, nous observerons si l'absence signaux IL2R β dépendants modifie la prolifération et la survie des LTe CD8⁺, ces deux dernières étant les composantes de l'expansion.

Pour tester l'implication combinée des signaux IL-2 et IL-15 dans l'expansion des LTe CD8⁺, nous avons transféré 10⁵ LTn CD8⁺ P14 ou P14 IL2R β ^{-/-} CD45.2⁺ dans des souris receveuses C57BL/6 CD45.1.2⁺. 20h plus tard, ces mêmes souris ont été infectées avec une dose de 2.10⁵ PFU de LCMV Armstrong afin de générer une infection virale aigüe²⁷. Ce virus présente un pic infectieux situé 4 jours après le début de l'infection et est détectable dans plusieurs compartiments de la souris (sérum, rate, foie et reins)⁴⁵. Il est ensuite complètement éliminé de la souris entre 7 à 10 jours post-infection grâce aux fonctions cytotoxiques des LTe CD8⁺^{27, 29}. Ce modèle de transfert adoptif de LTn CD8⁺ P14 ou P14 IL2R β ^{-/-} CD45.2⁺ permet

d'étudier l'impact de l'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15 uniquement sur les LT CD8⁺ transférés adoptivement sans affecter l'influence de ces cytokines sur d'autres types cellulaires. En effet, ce modèle abroge la signalisation via le complexe IL2Rβγ ce qui n'est pas le cas des approches expérimentales utilisant des souris ou des cellules IL2Rα^{-/-}. De plus, notre modèle, préserve également la survie, la maturation et la présentation antigénique des cCD connues pour être altérées dans des hôtes IL-15^{-/-}^{356, 357}.

Nous avons noté qu'à jour 5 post-infection, le nombre de LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} dans la rate n'est pas significativement différent de celui des LTe CD8⁺ P14 contrôles (**Figure 14A**). En revanche, au pic de la réponse à jour 7 (J7), le nombre de LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} est significativement réduit par rapport aux LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{+/-} (10,9.10⁶ versus 38,6.10⁶ respectivement, p=0,0001) (**Figure 14A**). Ainsi, l'abrogation combinée des signaux IL-2 et IL-15 dépendants résulte en une génération d'effecteurs 3,5 fois moins élevée par rapport aux conditions où les signaux IL2Rβ dépendants sont présents. En comparaison, la déficience de signaux IL-2 réduit le nombre d'effecteurs d'un facteur 2 et ce dans le même contexte expérimental^{97, 203}. Cette donnée suggère que l'IL-2 et l'IL-15 ont un impact synergique sur la l'expansion terminale des LTe CD8⁺ dans une infection LCMV Armstrong.

L'expansion altérée des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} à J7 pi peut résulter soit d'une prolifération réduite entre J5 et J7 par rapport aux P14 soit d'une mortalité accrue au sein des LTe CD8⁺ IL2Rβ déficients. En ce sens, nous avons marqué, avec un anticorps anti Ki-67, les LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} de la rate à J5 et J7 pi. Ce marqueur Ki-67, exprimé uniquement par les cellules prolifératives, nous a ainsi permis d'évaluer la prolifération des LTe CD8⁺ en présence et absence de signaux IL-2 et IL-15. Nous n'avons constaté aucune différence significative de prolifération à J5 pi entre les deux types de LTe CD8⁺ comme en atteste les fréquence de cellules Ki-67⁺ (60% pour les LTe CD8⁺ P14 versus 55% pour les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-}, **Figure 14B**). En revanche, à J7 pi, nous avons observé un taux de prolifération réduit des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 (respectivement 80% versus 90% de cellules Ki-67⁺, **Figure 14B, 14C**). Ces résultats indiquent que les signaux IL-2 et IL-15 sont uniquement requis au soutien de la prolifération au pic de la réponse immune LT CD8⁺. Nous avons également observé si les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} présentaient une expression accrue de certains marqueurs pro-apoptotiques (Bim,

caspace 3 activée) par rapport aux LTe CD8⁺ P14 à J5 et J7 pi (**Figure 14B, 14C**). Nous avons constaté, en absence de signaux IL-2 et IL-15, une fréquence plus élevée de la forme active de la caspase 3 (14% pour les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} versus 7% pour les cellules P14, **Figure 14B, 14C**) à J7 pi mais pas à J5. En parallèle, nous avons également observé une expression plus soutenue de Bim à J7 pi, mais pas à J5 pi, dans les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} par rapport aux cellules P14 (**Figure 14B**). Nous n'avons en revanche constaté aucune différence d'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 entre les LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} à J5 et J7 pi dans la rate (**Figure 14B**). Ces données suggèrent une apoptose accrue des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} par rapport aux cellules P14 au pic de la réponse immune LT CD8⁺. Pour confirmer cette suggestion, nous avons effectué un double marquage Annexin V/7-AAD à J7 pi sur les LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} spléniques. Ce double marquage permet d'identifier dans quelle phase d'apoptose se situe les LTe CD8⁺. En effet, des cellules Annexin V⁺ 7-AAD⁻ sont considérées comme étant en phase précoce d'apoptose alors que les cellules Annexin V⁺ 7-AAD⁺ sont elles considérées comme étant en phase tardive d'apoptose (**Figure 14D**). Nous avons révélé que l'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15 dépendants au pic de la réponse résulte en une augmentation de la fréquence de cellules Annexin V⁺ 7-AAD⁺ au sein des LTe CD8⁺ (27% pour les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} versus 17% pour les cellules P14, **Figure 14E et F**). Ce résultat confirme qu'à J7 pi, les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} sont dans un état d'apoptose plus avancé que les LTe CD8⁺ P14. Ainsi, ces données suggèrent que les signaux combinés IL-2 et IL-15 dépendants limitent la mort cellulaire au pic de la réponse immune. En revanche, ces signaux n'influent pas de manière significative sur l'apoptose à des temps plus précoces tels que le J5.

L'ensemble de nos données montre que les signaux IL2Rβ sont essentiels à l'expansion terminale des LTe CD8⁺. Plus précisément, ils sont requis à la fois pour maintenir un taux de prolifération soutenu mais également pour restreindre l'apoptose au sein des LTe CD8⁺.

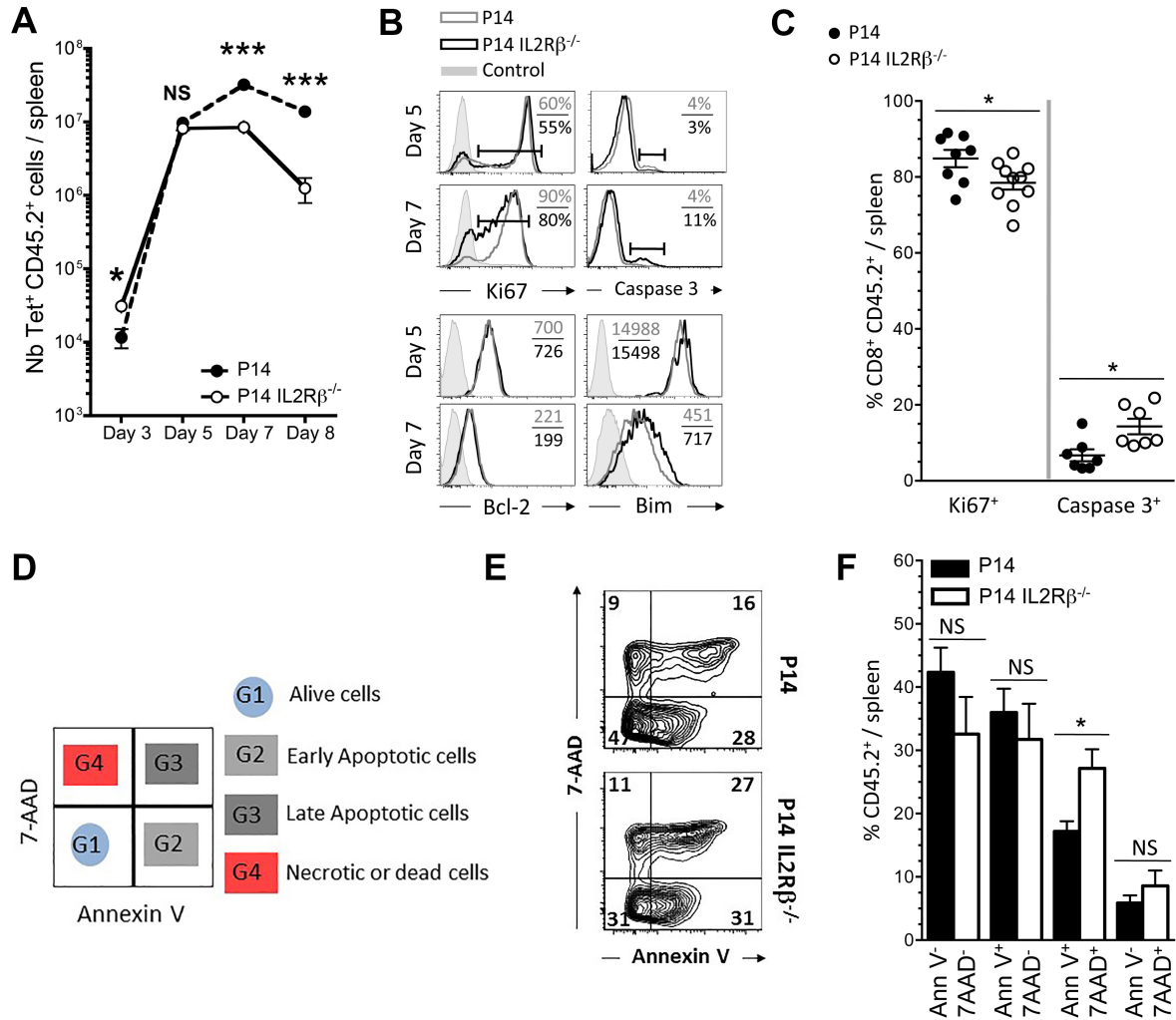


Figure 14 : Les signaux IL-2 et IL-15 combinés conditionnent la prolifération et la survie des LTe CD8⁺ primaires. (A) Nombres totaux de splénocytes LTe CD8⁺ P14 (ronds noirs) et P14 IL2Rβ^{-/-} (ronds blancs) (n=8 souris par « time-point » provenant de quatre expériences distinctes). (B) Marquage intracellulaire de Ki-67, Caspase 3 activée, Bcl-2 et Bim dans les LTe CD8⁺ P14 (ligne grise) et P14 IL2Rβ^{-/-} (ligne noire) de la rate à J5 et J7 post-infection (pi). Les nombres correspondent au pourcentage de cellules positives ou à la fluorescence moyenne (MFI) pour chaque marqueur. Résultats représentatifs de trois expériences (n=9 souris par génotype). (C) Fréquences individuelles des Ki-67⁺ et caspase 3 activée⁺ parmi les splénocytes LTe CD8⁺ P14 (ronds noirs) et P14 IL2Rβ^{-/-} (ronds blancs) J7 pi (n=7). (D) Représentation schématique des différentes populations en fonctions du marquage Annexin V/7-AAD (E et F) Nuage de points (E) et histogramme représentant (F) les différentes proportions de cellules of Annexin V⁺ et/ou 7-AAD⁺ parmi les LTe CD8⁺ P14 (barres noires) et P14 IL2Rβ^{-/-} (barres blanches) de la rate à J7 pi (n=6). (* p<0.05, *** p<0.0005, NS p≥0.05, test t non-pairé)

1.1.2 L'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15 limite la différenciation en SLECs

Après avoir démontré que les cytokines IL-2 et IL-15 conditionnaient l'expansion terminale des LTe CD8⁺, nous nous sommes demandé si elles régulaient aussi la différenciation des effecteurs. Nous avons pu remarquer des distinctions notables sur l'expression de certains marqueurs de différenciation (CD62L, CD127, KLRG1, CD27, **Figure 15A, 15B**) entre LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} de la rate à J7 pi. En effet, on peut noter que les cellules P14 possèdent un phénotype d'effecteur terminal (CD62L^{faible} CD127^{faible} KLRG1^{élevé}) alors que certaines cellules P14 IL2Rβ^{-/-} présentent déjà une expression de marqueurs spécifiques des LTm CD8⁺ (CD62L^{élevé} CD127^{élevé} KLRG1^{faible} CD27^{élevé}). A travers la littérature, plusieurs études ont démontré que différentes populations de LTe CD8⁺ (SLECs, MPECs) étaient définies par leur expression des marqueurs phénotypiques KLRG1 et CD127^{97, 230}. Comme évoqué dans la section 3 de l'introduction, les SLECs sont définis comme étant KLRG1^{élevé} CD127^{faible} alors que les MPECs sont caractérisés par un phénotype KLRG1^{faible} CD127^{élevé}. L'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants conduit à une réduction significative du pourcentage de SLECs dans la rate à J7 (53% pour les LTe CD8⁺ P14 versus 32% pour les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-}, p=0,0013, **Figure 15C, 15D**). A l'opposé, la proportion de MPECs est accrue au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} au même moment (17% pour les LTe CD8⁺ P14 versus 30% pour les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-}, p=0,0001, **Figure 15C, 15D**). Nous avons aussi observé une réduction du nombre de SLECs dans les cellules CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} par rapport aux cellules CD8⁺ P14 toujours à J7 pi (respectivement 4.10⁶ versus 14,2.10⁶, p=0,0018, **Figure 15E**). En revanche, nous n'avons pas constaté de réduction significative du nombre de MPECs en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 (4,5.10⁶ pour les LTe CD8⁺ P14 versus 2,75.10⁶ pour les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-}, p=0,3, **Figure 15E**).

Nous avons ensuite voulu nous assurer que la fréquence et le nombre réduit de SLECs observés à J7 pi dans les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} par rapport aux P14 IL2Rβ^{+/-} (**Figure 15D,E**), ne résultaient pas d'un défaut de génération des SLECs. Nous avons donc quantifié les fréquences et les nombres de SLECs au sein des LTe CD8⁺ IL2Rβ déficients ou non à J5 pi dans la rate (**Figure 16**). Nous n'avons constaté aucune différence significative dans les proportions de SLECs à J5 entre cellules P14 et cellules P14 IL2Rβ^{-/-} (respectivement 30,7%

versus 37,2%, $p=0,13$, **Figure 16A**). Nous n'avons pas non plus observé de différence significative dans le nombre de SLECs à J5 dans la rate en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants ($2,2 \cdot 10^5$ pour les LTe $CD8^+$ P14 versus $1,5 \cdot 10^5$ pour les LTe $CD8^+$ P14 $IL2R\beta^{-/-}$, $p=0,22$, **Figure 16B**). Ces résultats montrent que les LTe $CD8^+$ $IL2R\beta$ déficients sont tout aussi capables de générer des SLECs que les contrôles LTe $CD8^+$ $IL2R\beta$ compétents à J5 pi. Cependant, ces données suggèrent donc que les signaux combinés IL-2 et IL-15 sont cruciaux dans la différenciation ou la maintenance des SLECs à J7 pi. Pour évaluer l'impact des signaux $IL2R\beta$ sur la prolifération des SLECs et des MPECs à J7 pi dans la rate, nous avons quantifié la fréquence de SLECs et MPECs $Ki-67^+$ parmi les cellules P14 et P14 $IL2R\beta^{-/-}$ (**Figure 16C**). Nous avons constaté une proportion de SLECs $Ki-67^+$ significativement plus faible en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 combinés (87% pour les SLECs P14 versus 74,8% pour les SLECs P14 $IL2R\beta^{-/-}$, $p=0,04$, **Figure 16C**). A l'opposé, nous n'avons pas observé de différence significative dans les fréquences de $Ki-67^+$ entre MPECs P14 et P14 $IL2R\beta^{-/-}$ (respectivement 70,6% versus 76,5%, $p=0,32$, **Figure 16C**). Pour compléter ces résultats, il serait nécessaire d'évaluer l'apoptose des SLECs et des MPECs à J7 pi dans les cellules P14 et P14 $IL2R\beta^{-/-}$ en effectuant un marquage Annexin V/7-AAD.

L'ensemble des données des **Figures 15 et 16** confirme de précédentes études ayant démontré l'implication de l'IL-2 dans l'accumulation des SLECs^{97, 250, 265}. Bien que nous ayons montré que le nombre plus faible de SLECs en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 résulte en partie d'une prolifération réduite des SLECs à J7, nous ne pouvons exclure l'hypothèse que les signaux $IL2R\beta$ favorise la différenciation des SLECs à J7. Nous testerons cette hypothèse dans la partie ci-dessous. En revanche, la différenciation ou la maintenance des MPECs ne semblent pas conditionnés par les signaux $IL2R\beta$.

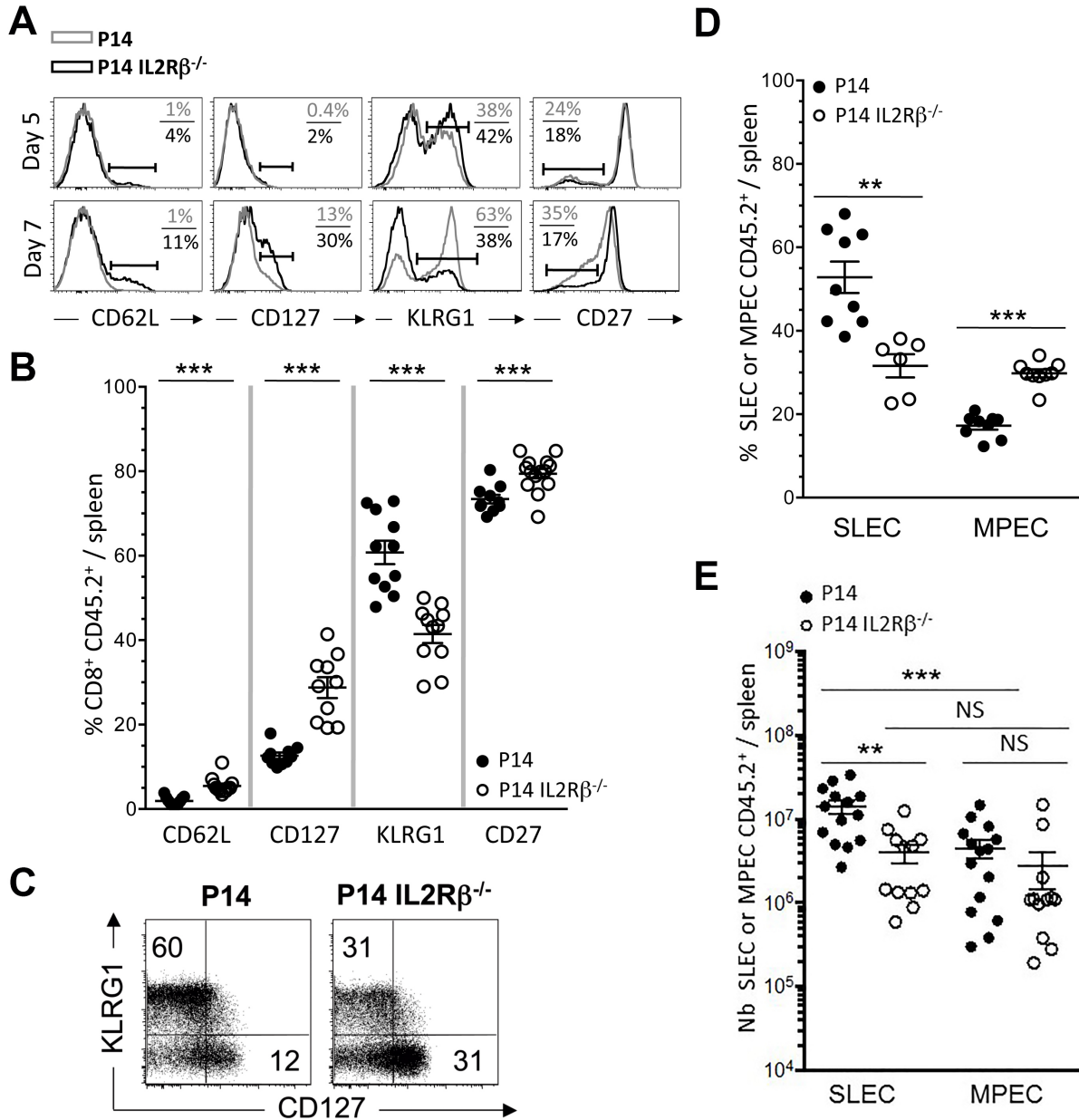


Figure 15 : Les signaux IL-2 et IL-15 combinés conditionnent la différenciation des LTe CD8⁺ en SLECs. (A) Expression des marqueurs indiqués à la surface des LTe CD8⁺ P14 (ligne grise) et P14 IL2Rβ^{-/-} (ligne noire) de la rate à J5 et J7 pi. Les nombres correspondent au pourcentage de cellules positives pour chaque marqueur (n=14). (B) Fréquences individuelles de cellules CD62L⁺, CD127⁺, KLRG1⁺ et CD27⁺ parmi les LTe CD8⁺ P14 (cercle noir) et P14 IL2Rβ^{-/-} (cercle blanc) de la rate à J7 pi. Données compilées de trois expériences. (C) Dot plot et (D) pourcentage des SLECs et MPECs parmi les LTe CD8⁺ P14 (cercle noir) et P14 IL2Rβ^{-/-} (cercle blanc) de la rate à J7 pi (n=9). (E) Nombres absolus de SLECs et MPECs dans les LTe CD8⁺ P14 (cercle noir) et P14 IL2Rβ^{-/-} (cercle blanc) de la rate à J7 pi (n=12). (* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005, NS p≥0.05, test t non-pairé)

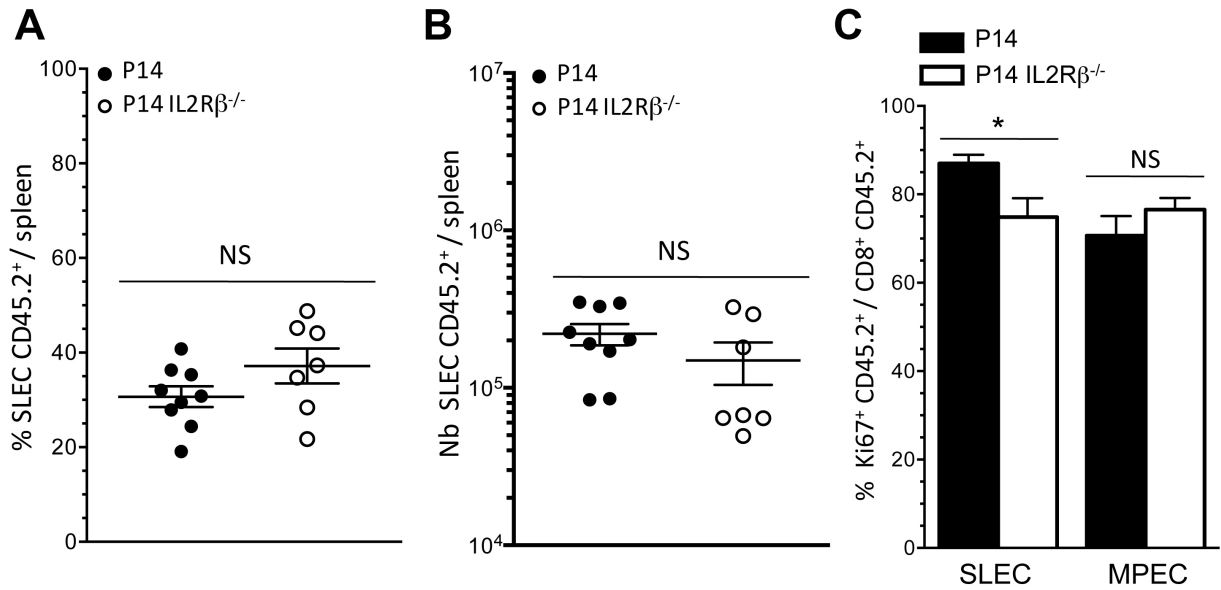


Figure 16 : L'absence de signaux IL2R β réduit la prolifération des SLECs. (A) Pourcentage de SLECs parmi les LTe CD8⁺ P14 (cercle noir) et P14 IL2R β ^{-/-} (cercle blanc) de la rate à J5 pi (résultats cumulés de deux expériences différentes, n=7). (B) Nombres absolus de SLECs dans les LTe CD8⁺ P14 (cercle noir) et P14 IL2R β ^{-/-} (cercle blanc) de la rate à J5 pi (résultats cumulés de deux expériences différentes, n=7). (C) Histogramme représentant les différentes proportions de cellules Ki-67⁺ parmi les SLECs et MPECs P14 (barres noires) et P14 IL2R β ^{-/-} (barres blanches) de la rate à J7 pi (n=6). (* p<0.05, NS p \geq 0.05, test t non-pairé)

Afin de voir si en l'absence de signaux IL2R β , la différenciation en SLECs pouvait être altérée, nous avons évalué l'expression de facteurs de transcription impliqués dans le développement des effecteurs terminaux ou des précurseurs mémoires (**Figure 17**). Nous nous sommes premièrement focalisés sur les niveaux de T-bet et Eomes, deux facteurs de transcription respectivement connus pour favoriser le développement des SLECs et des MPECs^{185, 255}. Nous n'avons premièrement constaté aucune différence d'expression de T-bet et Eomes entre les cellules P14 et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ à J5 pi (**Figure 17A**). En revanche, nous avons détecté une forte augmentation de l'expression de Eomes à J7 chez les LTe CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ par rapport aux cellules P14 contrôles (**Figure 17A**). En parallèle, les niveaux de T-bet eux ne sont que faiblement réduits en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants (**Figure 17A**). Ainsi, l'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15 altère la régulation de l'expression du facteur de transcription Eomes uniquement au pic de la réponse immune. Parallèlement, nous avons observé le ratio d'expression Eomes/T-bet dans les cellules P14 et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (**Figure 17B**). Nous avons noté que le ratio penchait en faveur d'Eomes au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ en comparaison des cellules P14 contrôles (**Figure 17B**). Un tel ratio d'expression de Eomes/T-bet, en absence de signaux IL2R $\beta^{-/-}$, suggère une différenciation préférentielle vers les MPECs plutôt que vers les SLECs. Afin de compléter notre analyse, nous avons observé les niveaux d'expression de gènes codant pour d'autres facteurs de transcription (Blimp-1, Bcl-6, Klf2) impliqués dans la différenciation SLECs/MPECs (**Figure 17C**). Pour ce faire, nous avons évalué, par RTqPCR, les quantités d'ARNm des gènes *Klf2*, *Bcl6*, *Eomes*, *Prdm1* et *Tbx21* dans 2.10⁴ LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ extrait de la rate à J7 post-infection par tri cellulaire (**Figure 17C**). Nous avons constaté une augmentation des taux d'ARNm de *Klf2*, *Bcl6* et donc *Eomes*, gènes orientant la différenciation en précurseurs mémoires^{229, 424} dans les cellules P14 IL2R $\beta^{-/-}$ par rapport aux cellules P14 (**Figure 17C**). A l'opposé, les niveaux d'ARNm transcrits de gènes favorisant le développement des SLECs (*Prdm1*, *Tbx21*)^{253, 267, 269, 271} étaient plus faibles dans les cellules P14 IL2R $\beta^{-/-}$ en comparaison des cellules P14 (**Figure 17C**). Ces données indiquent qu'au pic de la réponse immune, les signaux IL2R β régulent l'expression de plusieurs facteurs de transcription influant sur la différenciation des LTe CD8⁺. Une limite dans l'interprétation de ces résultats est le fait que les LTe CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ présentent plus de MPECs et moins de SLECs que les LTe CD8⁺

P14. En effet, il est possible que l'expression accrue d'Eomes au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} totaux résulte simplement du fait que les MPECs expriment plus d'Eomes que les SLECs. Ainsi, afin de s'assurer de nos résultats, nous avons comparé l'expression d'Eomes entre les SLECs et les MPECs P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} (**Figure 17D**). Nous avons constaté que les SLECs et les MPECs des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} ont une expression accrue d'Eomes en comparaison respective des SLECs et MPECs des LTe CD8⁺ P14 (**Figure 17D**). Donc, l'augmentation d'Eomes dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} n'est pas due à une différence de composition en SLECs et en MPECs. De plus, afin de nous assurer que les signaux IL-7 n'était pas à l'origine de l'augmentation d'Eomes parmi les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-}, nous avons évalué l'expression de ce facteur de transcription dans les cellules CD127^{élevée} et CD127^{faible} au sein des effecteurs IL2Rβ déficients ou non (**Figure 17E**). Nous avons relevé que les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-}, CD127^{élevée} ou CD127^{faible}, expriment plus d'Eomes que leurs contrôles P14 respectifs (**Figure 17E**). Donc l'augmentation d'Eomes dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} à J7 n'est pas une conséquence d'un biais de différenciation SLEC/MPEC mais est bien consécutif à une délétion des signaux IL-2 et IL-15 dépendants.

L'ensemble de nos données suggère que les signaux IL-2 et IL-15 soutiennent la différenciation des SLECs en régulant l'expression de facteurs transcription impliqués dans la différenciation des LTe CD8⁺ (T-bet, Blimp-1, Eomes, Bcl-6 et Klf2).

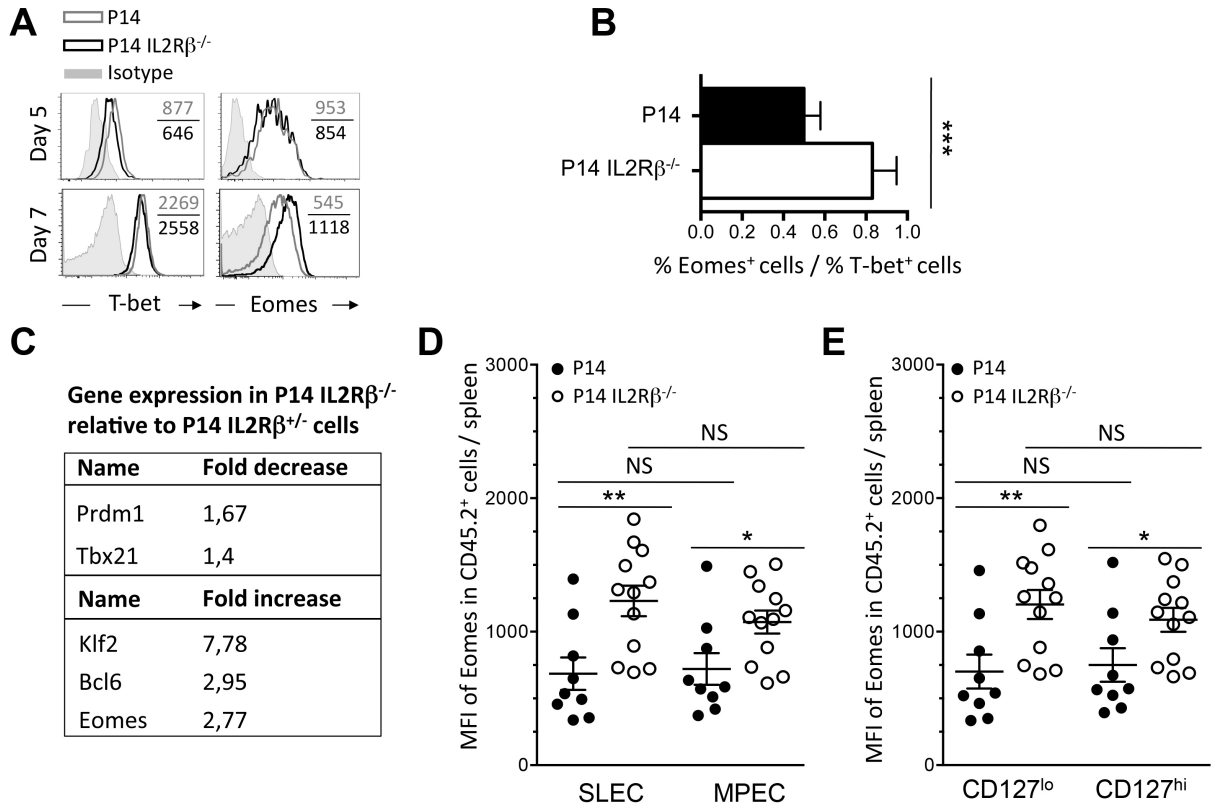


Figure 17 : L'absence de signaux IL2Rβ modifie l'expression de facteurs de transcription clés. (A) Marquage intracellulaire de Eomes et T-bet dans les LTe CD8⁺ P14 (ligne grise) et P14 IL2Rβ^{-/-} (ligne noire) de la rate à J5 et J7 pi. L'isotype contrôle est indiqué en gris plein et les nombres correspondent aux MFI (représentatif de deux expériences distinctes, n=6). (B) Ratio de la fréquence des cellules Eomes⁺ sur celle des cellules T-bet⁺ des cellules P14 (barre noire) et des P14 IL2Rβ^{-/-} (barre blanche) à J7 pi (résultats cumulés de deux expériences différentes, n=6). (C) L'expression des gènes indiqués a été évaluée par RTqPCR. Les chiffres indiquent le « fold decrease » ou le « fold increase » dans les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} par rapport aux P14 à J7 pi dans la rate (résultats cumulés de deux expériences distinctes, n=5 par génotype). (D) MFI de Eomes dans les SLECs et les MPECs des LTe CD8⁺ P14 (ronds noirs) et P14 IL2Rβ^{-/-} (ronds blancs) à J7 pi dans la rate (résultats cumulés de trois expériences différentes, n=9-12). (E) MFI de Eomes dans les CD127^{élevé} et CD127^{faible} des P14 (ronds noirs) et P14 IL2Rβ^{-/-} (ronds blancs) à J7 pi dans la rate (résultats cumulés de trois expériences différentes, n=9-12). (* p<0.05 ** p<0.005, NS p≥0.05, test t non-pairé)

1.1.3 L'abrogation des signaux IL2R β n'influe pas sur les fonctions effectrices

Après avoir vu les rôles des signaux IL2R β sur l'expansion et la différenciation des effecteurs, nous avons voulu déterminer les impacts de ces mêmes signaux sur les fonctions effectrices des LTe CD8⁺ (**Figure 18**). Comme décrit au cours de la section 3 de l'introduction, les lymphocytes cytotoxiques disposent d'au moins trois mécanismes pour induire l'apoptose des cellules cibles : 1) la sécrétion de cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α), 2) la sécrétion de molécules cytotoxiques (perforine, granzymes) et 3) l'induction de l'expression de récepteurs de mort (FAS, TNFR, TRAILR). Dans le cadre d'une infection LCMV Armstrong, le couple perforine/granzyme est essentiel à l'élimination complète des cellules infectées comme en atteste l'incapacité des souris Pfp^{-/-} à contrôler une infection avec ce pathogène^{25, 232}. A l'opposé, l'élimination du LCMV s'effectue majoritairement sans l'aide de l'apoptose médiée par Fas et FasL²⁵. Ainsi, nous n'avons pas étudié l'impact de l'absence des signaux IL2R β sur l'apoptose induite par les récepteurs de mort dans le cadre de notre modèle infectieux.

Nous avons tout d'abord évalué la capacité des LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} à sécréter, après restimulation *in vitro* avec du peptide GP₃₃₋₄₁ (0,2 μ g/mL), des cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α et IL-2) essentielles à l'élimination du virus LCMV Armstrong. Nous avons relevé que la production d'IFN γ et de TNF α par les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} J7 pi était identique à celle des LTe CD8⁺ P14 (**Figure 18A**). Nous avons par ailleurs constaté que la fréquence de cellules sécrétant de l'IL-2 est deux fois plus élevée parmi les P14 IL2R β ^{-/-} par rapport aux cellules P14 contrôles (respectivement 19% versus 10,8%, p=0,0012, **Figure 18A**). Ce phénomène est probablement relié au fait que la proportion de MPECs, connu pour produire plus d'IL-2 que les SLECs^{225, 230}, est accrue au sein des cellules P14 IL2R β ^{-/-}. En conséquence, il n'est pas surprenant de voir que l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants accroît la fréquence de cellules aptes à sécréter, après restimulation *in vitro* avec du peptide GP₃₃₋₄₁ (0,2 μ g/mL), les trois cytokines simultanément (IFN γ , TNF α et IL-2) (16% pour les cellules P14 IL2R β ^{-/-} contre 11% pour les cellules P14 IL2R β ^{+/-}, **Figure 18B**). En ce qui concerne les molécules cytotoxiques, nous avons pu constater une réduction significative des niveaux de Grz B chez les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 contrôles (**Figure 18C**). Plus précisément, nous avons relevé une forte diminution des cellules

produisant fortement du Grz B dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} (**Figure 18C**). Une telle réduction de cellules produisant fortement du Grz B a été préalablement décrite au sein d'une population de LTe CD8⁺ P14 γ_c^{-/-} à J7 pi avec LCMV Armstrong¹⁰⁷. Dans cette étude, ce défaut de production de Grz B était principalement restreint aux cellules KLRG1^{faible}. Nous émettons donc l'hypothèse que le défaut de production de Grz B au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} soit spécifique aux cellules KLRG1^{faible}. Des expériences complémentaires viendront confirmer ou non cette hypothèse. Cette diminution dans la capacité à produire des granzymes ne s'applique pas uniquement au Grz B comme en atteste la faible expression du gène codant pour le Grz A (**Figure 18C**). Bien que les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} produisent moins de granzymes que les cellules P14, leur sécrétion de perforine et leur capacité à dégranuler, comme en atteste l'expression du marqueur de dégranulation CD107a (après 5h de restimulation *ex vivo* avec du peptide GP₃₃₋₄₁ (0,2μg/mL) (cf Matériels et méthodes), sont identiques aux LTe CD8⁺ contrôles (**Figure 18C**). Dans le but d'évaluer si la faible production de granzymes des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} limitait leur capacité à contrôler l'infection, nous avons réalisé un test de « killing » *in vivo*. Pour ce faire, nous avons transféré ou non 10⁵ cellules P14 ou 10⁵ cellules P14 IL2Rβ^{-/-} naïves dans des souris Pfp^{-/-} (**Figure 18D**). Ces souris ont la particularité de ne pas pouvoir contrôler une infection LCMV à cause d'une cytotoxicité granule dépendante compromise²³². Ces souris permettent de ne tester la réponse cytotoxique spécifique des cellules transférées sans être biaisé par la cytotoxicité générée par la réponse endogène. Ainsi, ces souris Pfp^{-/-} permettent d'évaluer la capacité des LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} à éliminer des cellules cibles. 24h après avoir reçu ou non par transfert adoptif les cellules P14 et P14 IL2Rβ, les souris Pfp^{-/-} ont été infectées avec 2.10⁵ PFU de LCMV Armstrong. A J7 pi, toutes les souris Pfp^{-/-} ont reçu un mix 1 pour 1 cellules de cibles chargées (marquées avec 1 μM de CFSE) ou non (marquées avec 0,1 μM de CFSE) avec le peptide GP₃₃₋₄₁ (10 μg/mL). 1h ou 3h après l'injection par voie intraveineuse du mélange de cellules cibles, les souris Pfp^{-/-} ont été sacrifiées afin d'évaluer le « killing » *in vivo* (cf Matériels et méthodes). Nos résultats montrent qu'à 1h après l'injection des cellules cibles, le « killing » *in vivo* des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} est significativement plus faible que celui des cellules P14 (respectivement 85% versus 92%, **Figure 18D**). 3h après l'injection des cellules cibles, le « killing » *in vivo* des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} est identique à celui des cellules P14

(respectivement 97% versus 98%, **Figure 18D**). Ce test de cytotoxicité *in vivo* démontre que les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} sont tout aussi capables, au pic de la réponse immune, d'éliminer les cellules cibles que les LTe CD8⁺ P14 (**Figure 18D**). Il est toutefois possible que le grand nombre d'effecteurs P14 IL2Rβ^{-/-} présents à J7 (10,9.10⁶, **Figure 14A**) masque la difficulté réelle de ces cellules à éliminer les cellules cibles. Afin d'exclure cette hypothèse, nous avons réalisé le même test de « killing » *in vivo* mais nous avons transféré 10⁴ LTn CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} déficients ou non dans les souris Pfp^{-/-} le jour précédent l'infection de ces mêmes souris avec 2.10⁵ PFU de LCMV Armstrong (**Figure 18E**). Nos résultats montrent que 3h après l'injection des cellules cibles, le « killing » *in vivo* des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} est identique à celui des cellules P14 (respectivement 69% versus 74%, p=0,39, **Figure 18E**). Donc, malgré une production de granzymes fortement compromise, l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants n'affectent pas la capacité des LTe CD8⁺ à éliminer des cellules cibles. Toutefois, les nombres de LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} à J7 pi dans ces « killing » *in vivo* n'ont pas été évalués pour des raisons expérimentales ce qui limite l'interprétation du résultat. En parallèle, nous avons évalué les niveaux de charges virales à J7 dans la rate au sein des souris C57BL/6 transférées avec des LTn CD8⁺ P14 ou P14 IL2Rβ^{-/-} (**Figure 18F**). Nos résultats montrent que les charges virales des souris C57BL/6 transférées avec des LTn CD8⁺ P14 ou P14 IL2Rβ^{-/-} sont identiques (p=0,56, **Figure 18F**). Cette donnée suggère que l'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15 n'altère pas les capacités des cellules à faire diminuer la charge virale. Toutefois, ce résultat est limité par le fait que ces charges virales ont été effectuées dans des souris C57BL/6 possédant une réponse endogène apte à contrôler une infection LCMV Armstrong. Pour être certain de notre résultat, les charges virales doivent être évaluées dans des souris Pfp^{-/-}.

L'ensemble de nos données démontre que les signaux IL-2 et IL-15 soutiennent l'expression des molécules cytotoxiques que sont les granzymes. Cependant, malgré une production de granzymes fortement réduites, les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} semblent tout à fait capables d'éliminer des cellules cibles. Ainsi, nos données suggèrent que les cytokines IL-2 et IL-15 ne sont pas requises pour l'établissement des fonctions effectrices des LTe CD8⁺.

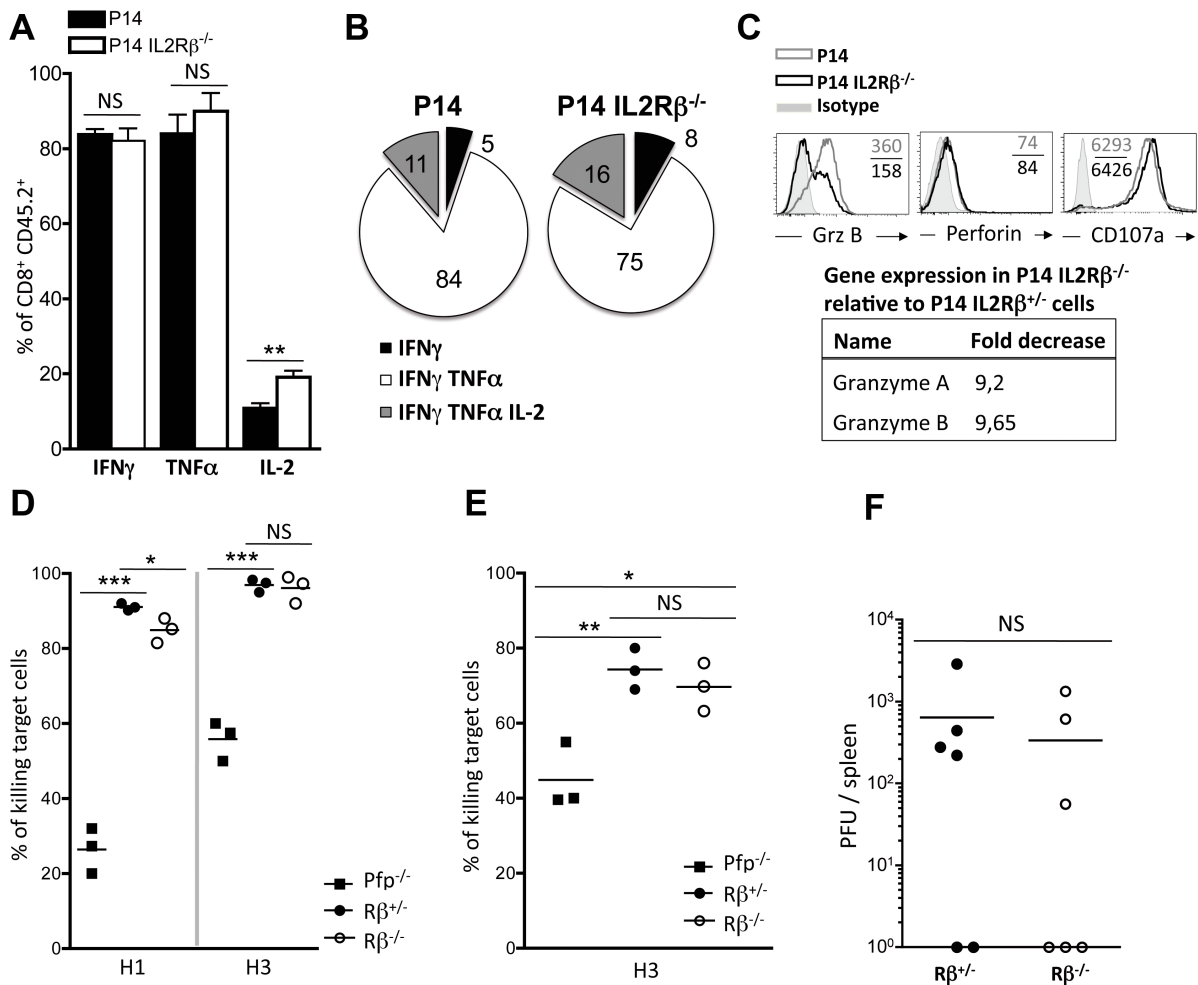


Figure 18 : Les LTe CD8⁺ IL2Rβ^{-/-} sont aptes à contrôler une infection malgré une production limitée de granzymes. (A) Fréquences de LTe CD8⁺ P14 (barres noires) et P14 IL2Rβ^{-/-} (barres blanches) exprimant de l'IFNγ, du TNFα ou de l'IL-2 à J7 pi après 4h de restimulation *ex vivo* avec du peptide GP₃₃₋₄₁ (résultats cumulés de deux expériences distinctes; n=11 par génotype). (B) Tartes représentant le pourcentage splénique d'effecteurs P14 (à gauche) et P14 IL2Rβ^{-/-} (à droite) produisant une ou plusieurs cytokines à J7 pi. Les valeurs indiquent la fréquence de chaque phénotype (résultats cumulés de deux expériences distinctes, n=6 par génotype). (C) Expression intracellulaire de Grz B, Perforine et CD107a (en haut) dans les cellules P14 (ligne grise) et P14 IL2Rβ^{-/-} (ligne noire) à J7 pi. L'isotype contrôle est indiqué en gris plein et les nombres correspondent aux MFI (représentatif de trois expériences distinctes, n=8 par génotype). L'expression des gènes indiqués a été évaluée par RTqPCR (en bas). Les chiffres indiquent le « fold decrease » ou le « fold increase » dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} par rapport au P14 à J7 pi dans la rate (n =5 par génotype). (D) Killing *in vivo* à J7 pi des souris Pfp^{-/-} (carrés noirs), cellules P14 (ronds noirs) et cellules P14 IL2Rβ^{-/-} (ronds blancs) après 1 et 3 heures après l'injection des cellules cibles (n=3). 10⁵ LTn CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} déficients ou non ont été adoptivement transférés 24h avant l'infection. (E) Killing

in vivo à J7 pi des souris Pfp^{-/-} (carrés noirs), cellules P14 (ronds noirs) et cellules P14 IL2Rβ^{-/-} (ronds blancs) 3 heures après l'injection des cellules cibles (n=3). 10⁴ LTn CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} déficients ou non ont été adoptivement transférés 24h avant l'infection. (F) Titres viraux à J7 pi dans la rate des souris ayant reçu des cellules LTn CD8⁺ P14 (ronds noirs) ou des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} (ronds blancs) (n=6 par génotype). (* p<0.05, ** p<0.005 *** p<0.0005, NS p≥0.05, test t non-pairé)

1.2 L'IL-2 et l'IL-15 sont essentielles à la maintenance des LTm CD8⁺ de type effecteurs mémoires (T_{EM})

Nous avons vu au cours de la section 6 de l'introduction que les cytokines IL-2 et IL-15 étaient impliquées dans l'accumulation des LTm CD8⁺ ^{95, 97, 203, 327, 335, 336, 339, 368}. Cependant, l'impact de ces cytokines sur les différentes populations de LTm CD8⁺ (T_{CM}, T_{EM} et T_{RM}) reste peu défini. En ce sens, nous avons évalué les conséquences d'une déficience combinée en signaux IL-2 et IL-15 dépendants sur la génération et le maintien des T_{CM} et T_{EM} 70 jours après une infection LCMV Armstrong (**Figure 19, 20, 21**). L'impact des signaux IL2Rβ sur les T_{RM} sera détaillé dans la section 3 des résultats.

1.2.1 Les signaux IL2Rβ contrôlent la génération et le maintien des LTm CD8⁺

Avant d'évaluer les effets des signaux IL-2 et IL-15 sur la génération et la survie des T_{CM} et T_{EM}, nous avons préalablement observé le développement des LTm CD8⁺ totaux au sein des populations cellulaires P14 IL2Rβ^{-/-} et P14 (**Figure 19**). Nous avons d'abord remarqué que les fréquences sanguines de LT CD8⁺ sont plus faibles en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 et ce tout au long de la réponse immune (**Figure 19A**). De plus, les nombres absolus de LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} à J70 dans la rate et la moelle osseuse sont significativement plus faibles que ceux des P14 (0,2.10⁶ pour les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} versus 1,6.10⁶ pour les cellules P14 dans la rate, p=0,006 ; 0,4.10⁴ pour les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} versus 2,8.10⁴ pour les cellules P14 dans la moelle osseuse, p=0,002, **Figure 19B**). Cette différence en quantité de LTm CD8⁺ entre cellules P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} s'explique notamment par un taux de contraction plus élevé entre J7 et J10 pi des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 (**Figure 19C**). Le taux de contraction a été calculé selon la méthode

suivante : pour le taux de contraction entre J7 et J10 des LT CD8⁺ P14, le nombre moyen de LT CD8⁺ P14 à J7 a été divisé par le nombre moyen de LT CD8⁺ à J10.

En plus de générer un nombre réduit de LTm CD8⁺ totaux, l'absence de signaux IL-2 et IL-15 affecte également la maintenance de ces lymphocytes mémoires. En effet, les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} présentent une réduction significative du nombre de LTm CD8⁺ entre J70 et J100, ce qui n'est pas le cas des cellules P14 contrôles (**Figure 19D**). Afin de voir si ce phénomène était une conséquence d'une survie réduite des LTm CD8⁺ IL2Rβ^{-/-}, nous avons mesuré l'expression intracellulaire de Bcl-2 et Bim des LTm CD8⁺, IL2Rβ déficients ou non, à J70 dans la rate (**Figure 19E**). Nos résultats montrent que l'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15 limite l'expression du Bcl-2 intracellulaire des LTm CD8⁺ IL2Rβ^{-/-} par rapport aux LTm CD8⁺ IL2Rβ^{+/-} (**Figure 19E**). En revanche, nous n'avons constaté aucune différence dans l'expression du marqueur pro-apoptotique Bim (**Figure 19E**). Nous avons également testé la capacité des LTm CD8⁺ IL2Rβ^{-/-} à adopter un métabolisme catabolique basé sur une production d'ATP majoritairement au niveau mitochondrial. Ce métabolisme énergétique permet l'activation de l'OXPPOS et donc la production de grandes quantités d'ATP dans des conditions pauvres en nutriments. Nous avons donc effectué, à J70 pi dans la rate, un marquage Mitotracker dans les LTm CD8⁺, IL2Rβ déficients ou non, afin d'évaluer la masse mitochondriale de ces cellules (**Figure 19F**). Nous avons constaté que la masse mitochondriale des LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} est réduite par rapport aux LTm CD8⁺ P14, ce qui témoigne d'une réduction du nombre de mitochondries à J70 pi en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants (**Figure 19E**). Ces résultats suggèrent que les signaux combinés IL-2 et IL-15 collaborent à la maintenance des LTm CD8⁺ en augmentant l'expression de molécules anti-apoptotiques et en soutenant l'adoption d'un métabolisme énergétique permettant une forte production d'ATP nécessaire à leur survie.

L'ensemble de ces données démontre que l'absence de signaux cytokiniques IL-2 et IL-15 dépendants réduit le nombre total de LTm CD8⁺ générés et affecte leur maintenance. Ainsi, ces deux cytokines contrôlent la taille du pool de LTm CD8⁺ en 1) soutenant l'expansion des LTe CD8⁺, 2) limitant l'intensité de la phase de contraction et en 3) assurant la maintenance à long terme des LTm CD8⁺ générés. Cette dernière étant notamment dépendante d'au moins deux facteurs (expression de molécules anti-apoptotiques et métabolisme

mitochondriale comme source d'énergie) (**Figure 19E**). Sachant que l'IL-15 joue un rôle majeur dans la prolifération homéostatique des LTm CD8⁺³⁶⁷, il serait important d'évaluer la prolifération homéostatique des LTm CD8⁺ IL2R β déficients par rapport à celle des LTm CD8⁺ IL2R β compétents entre J70 et J100 pi dans la rate. Pour ce faire, nous pourrions injecter, de J70 à J100, du BRDU aux souris C57BL/6 contenant des LTm CD8 IL2R β ^{+/-} ou IL2R β ^{-/-}. A J100 pi, nous sacrifierions ces souris et nous quantifierions les fréquences de LTm CD8⁺ BRDU⁺ parmi les LTm CD8⁺ IL2R β ^{+/-} ou IL2R β ^{-/-}.

Cependant, il est fort intéressant de constater qu'en dépit d'une déficience en signaux IL2R β , il y a toujours formation d'un pool de LTm CD8⁺. Ceci contraste avec un modèle d'abrogation complète des signaux dépendants de la chaîne γ_c où une absence totale de LTm CD8⁺ est constatée et ce dans le même modèle infectieux (LCMV Armstrong)¹⁰⁷. Il serait donc pertinent d'évaluer la contribution d'autres cytokines dépendantes de la chaîne γ_c telles que l'IL-21 dans le développement et la maintenance des LTm CD8⁺. C'est que ce nous nous attacherons à faire dans la section 2 de cette partie résultats

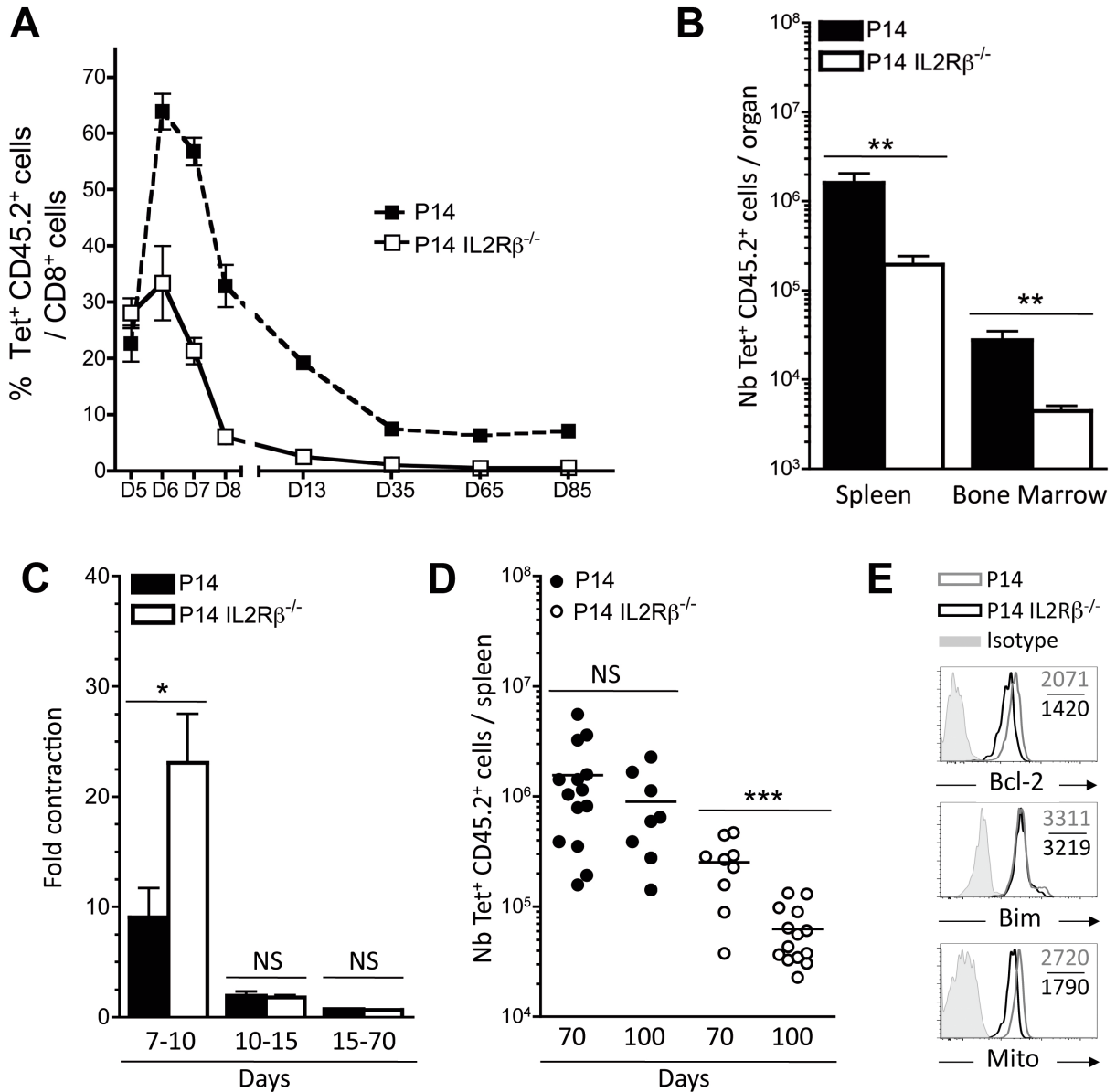


Figure 19 : Les signaux IL-2 et IL-15 conditionnent la génération et la maintenance des LTm CD8⁺. (A) Fréquences des cellules LT CD8⁺ P14 (carrés noirs) et P14 IL2Rβ^{-/-} (carrés blancs) dans le sang évaluées pendant 90 jours après l'infection (résultats représentatifs de trois expériences distinctes, n=5-10 souris par génotype). (B) Nombre total de LTm CD8⁺ P14 (barres noires) et P14 IL2Rβ^{-/-} (barres blanches) dans la rate et la moelle osseuse à J70 pi (n=9 souris par génotype provenant de trois expériences distinctes). (C) Taux de contraction des LTm CD8⁺ P14 (barres noires) et P14 IL2Rβ^{-/-} (barres blanches) dans la rate entre J7-J10, J10-15 et J15-70 pi. Le taux de contraction a été, par exemple, calculé en divisant le nombre de cellules à J7 par le nombre de cellules à J10. Résultats cumulatifs de cinq expériences distinctes avec n=10 par génotype. (D) Nombres absolus des LTm CD8⁺ P14 (cercles noirs) et P14 IL2Rβ^{-/-} (cercles blancs) à J70 et J100 pi dans la rate. Chaque cercle symbolise une souris individuelle et les barres représentent le nombre moyen pour 10-14 souris par génotype.

Résultats cumulatifs issus de trois expériences distinctes. (E) Marquage intracellulaire de Bcl-2, Bim et Mitotracker Deep Red évalué par cytométrie à J70 pi dans les LTm CD8⁺ P14 (ligne grise) et P14 IL2Rβ^{-/-} (ligne noire). Résultats représentatifs de trois expériences distinctes avec 7 à 14 souris par génotype. (* p<0.05, ** p<0.005 *** p<0.0005, NS p≥0.05, test t non-pairé)

1.2.2 Les cytokines IL-2 et IL-15 sont requises pour la maintenance des T_{EM} mais pas pour celle des T_{CM}

Au cours de la section 4 de l'introduction, nous avons vu qu'un pool de LTm CD8⁺ est composé de divers types de lymphocytes T mémoires (T_{CM}, T_{EM}, T_{RM}), chacun ayant des spécificités particulières qui leurs sont propres (phénotype, localisation et fonctions). Nous avons démontré précédemment que les signaux IL2Rβ régulaient les proportions de SLECs et de MPECs (**Figure 15**). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les cytokines IL-2 et IL-15 pouvaient moduler la composition du pool de LTm CD8⁺.

Nous avons donc comparé à J70 pi l'expression de marqueurs phénotypiques spécifiques des différents types de LTm CD8⁺ (CD62L, CD127, CCR7, CXCR3, CD43 et CD27) (**Figure 20A-B**). Il est notable que l'expression à J70 de certains de ces marqueurs diffère significativement entre les cellules P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} de la rate (**Figure 20A-B**). En effet, alors que les niveaux de CD44, CD127 et CD43 sont identiques entre les cellules P14 et P14 IL2Rβ^{-/-}, l'expression de CD62L, CCR7, KLRG1, CD27 et CXCR3 est significativement distincte entre les LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ déficients ou non (**Figure 20A-B**). En analysant de manière combinée l'expression de ces marqueurs phénotypiques, on constate que les LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} présentent une plus grande proportion de T_{CM} (CD62L^{élevé} CD127^{élevé}) que les LTm CD8⁺ des P14 contrôles à J70 pi (79% pour les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} versus 64,5% pour les cellules P14, p<0,001) (**Figure 20C-D**). A l'opposé, la fréquence de T_{EM} (CD62L^{faible} CD127^{élevé}) parmi les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} est significativement plus faible (19% pour les LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} versus 31% pour les LTm CD8⁺ P14, p<0,001) (**Figure 20C-D**). De plus, à J70 pi, nous avons constaté une accumulation de LTm CD8⁺ CD27^{élevé} CD43^{faible}, identifiés comme acteurs majeurs dans l'initiation d'une réponse secondaire⁴²⁵, aux dépens de LTm CD8⁺ à phénotype plus effecteurs (CD27^{faible} CD43^{faible} CXCR3^{faible} KLRG1^{élevé}) au sein des LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} par rapport aux LTm CD8⁺ P14 (**Figure 20C-D**). Ces données, basées uniquement sur des fréquences de LTm CD8⁺, suggèrent que les signaux IL-2 et IL-15

dépendants contrôlent la différenciation et/ou la maintenance de la population T_{EM}. A l'opposé, l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants semblent favoriser la différenciation de la population T_{CM}.

Afin de mieux comprendre pourquoi, en l'absence de signaux IL2R β , la différenciation en T_{EM} est réduite, nous avons évalué l'expression intracellulaire de facteurs de transcription (T-bet, Eomes) impliqués dans le développement des divers types de LTm CD8⁺204, 402. Nous avons constaté une expression plus soutenue d'Eomes et une expression légèrement plus faible de T-bet dans les LTm CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} par rapport aux LTm CD8⁺ P14 de la rate à J70 pi (**Figure 20E**). Ce résultat est en accord avec la littérature qui a décrit que le facteur de transcription Eomes était essentiel dans la génération des T_{CM}^{204, 402}. Il aurait été pertinent d'évaluer l'expression de Bcl-6, Foxo1 et KLF2, tous des facteurs de transcriptions soutenant la différenciation des T_{CM}^{261, 262, 278, 279, 283}.

Ces différences significatives dans les proportions de T_{EM} et T_{CM} en l'absence de signaux combinés IL-2 et IL-15 peuvent résulter d'une génération et/ou d'une maintenance altérée des T_{EM} mais également d'une différenciation accrue en T_{CM}. Pour évaluer l'impact des signaux IL2R β sur la maintenance des T_{EM} mais aussi des T_{CM}, nous avons comparé les nombres de ces deux sous-types de LTm CD8⁺ à J70 et J100 pi au sein des cellules P14 IL2R β déficientes ou non de la rate (**Figure 21A**). Nous avons vu que le nombre de T_{EM} dans les LTm CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} était significativement réduit de J70 à J100 (respectivement 4,3.10⁴ cellules versus 0,7.10⁴, p=0,0033, **Figure 21A**). Dans le cas des LTm CD8⁺ P14, nous n'avons pas constaté de différences significatives entre le nombre de T_{EM} à J70 et à J100 (respectivement 4,6.10⁵ cellules versus 2,3.10⁵, p=0,16, **Figure 21A**). En ce qui concerne les T_{CM}, nous n'avons pas observé de différences significatives en nombre entre J70 et J100 au sein des LTm CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} (respectivement 1,4.10⁵ cellules versus 0,7.10⁵, p=0,12, **Figure 21A**). Pareillement, nous n'avons pas relevé de différences significatives entre le nombre de T_{CM} à J70 et à J100 dans les LTm CD8⁺ P14 (respectivement 9,4.10⁵ cellules versus 6,4.10⁵, p=0,34, **Figure 21A**). Ainsi, ces données indiquent que les signaux IL2R β contribuent à la maintenance, entre J70 et J100 pi, des T_{EM} mais pas à celle des T_{CM} (**Figure 21A**).

Dans le but de voir si, en plus de la maintenance, la génération des T_{EM} était affectée par la déficience en $IL2R\beta$, nous avons quantifié les proportions de T_{EM} à des temps plus précoces (J15 et 30 pi) (**Figure 21B**). Les fréquences non significativement différentes de T_{EM} à J15 et J30 pi entre les cellules P14 et P14 $IL2R\beta^{-/-}$ démontrent que non seulement la génération des T_{EM} n'est pas réduite en l'absence de signaux combinés IL-2 et IL-15 dépendants mais qu'elle a même tendance à être plus forte que dans les conditions contrôles (**Figure 21B**). En revanche, la génération des T_{CM} est significativement accentuée lorsque les signaux $IL2R\beta$ dépendants sont déficients comme en atteste les pourcentages plus élevés de T_{CM} dans les cellules P14 $IL2R\beta^{-/-}$ par rapport aux cellules P14 dès le J15 pi dans la rate (**Figure 21B**).

L'ensemble de ces données indique que les signaux IL-2 et IL-15 dépendants sont nécessaires à l'accumulation des T_{EM} et T_{CM} . De plus, nos résultats montrent que ces signaux cytokiniques sont des acteurs clés dans la maintenance mais non dans la génération des T_{EM} . A l'opposé, la génération des T_{CM} est favorisée en l'absence de la chaîne $IL2R\beta$ mais la maintenance des T_{CM} n'est aucunement dépendante des signaux IL-2 et IL-15 dépendants. Ainsi, nos résultats suggèrent que plusieurs aspects des T_{CM} et T_{EM} (génération, accumulation, maintenance) sont différemment régulés par les cytokines IL-2 et IL-15. Il est notamment probable que ces deux molécules modulent l'expression de facteurs de transcription clés dans le développement et la maintenance de ces deux types de lymphocytes mémoires. En ce sens, les différences d'expression d'Eomes entre cellules mémoires P14 et P14 $IL2R\beta^{-/-}$ corrélaient avec cette supposition (**Figure 20E**). Par ailleurs, comme nous l'avons vu plus haut, nous ne pouvons exclure un rôle d'autres facteurs de transcription tels que Blimp-1, Bcl-6, Foxo1, KLF2, Id3 connus pour être impliqués dans l'homéostasie des T_{EM} et T_{CM} ²²⁹.

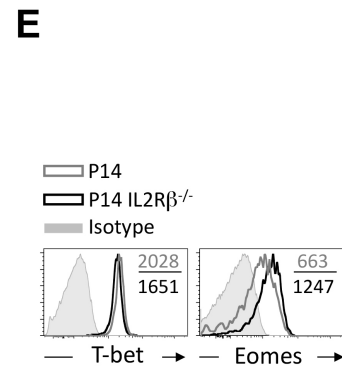
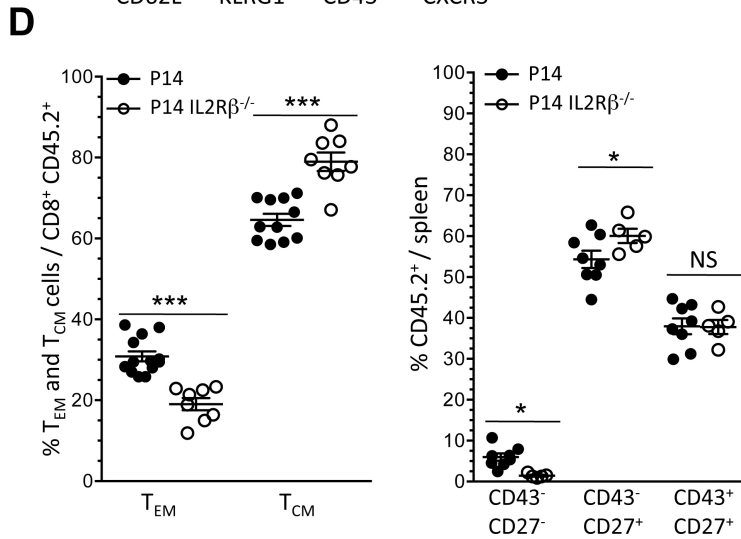
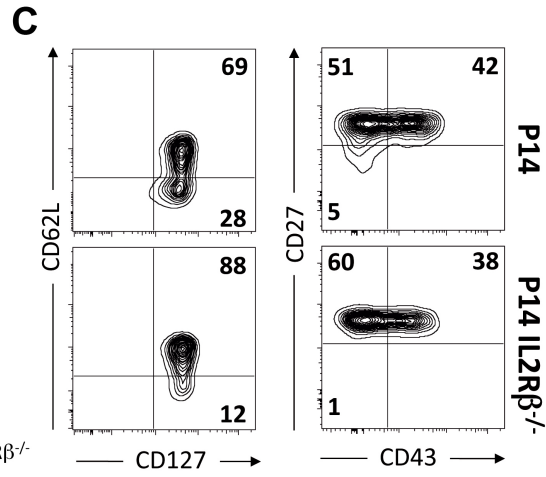
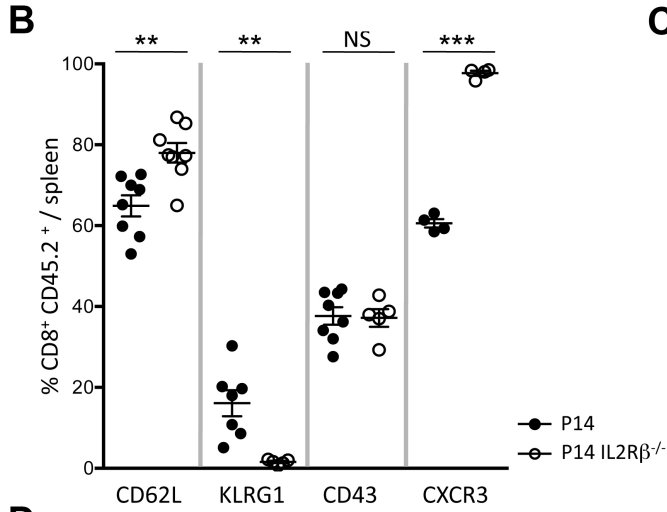
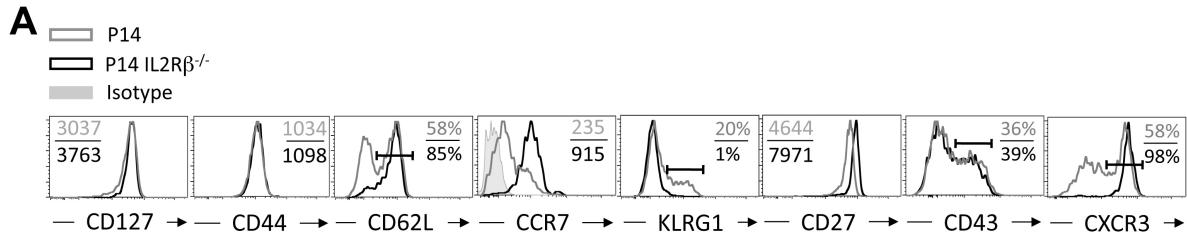


Figure 20 : Les T_{EM} sont dépendants des signaux IL-2 et IL-15 pour leur différenciation (A) et (B) Expression extracellulaire des molécules indiquées par les LTm CD8⁺ P14 (ligne grise) et les P14 IL2Rβ^{-/-} (ligne noire) dans la rate à J70 pi. Les chiffres indiquent les MFI ou les fréquences respectives (résultats représentatifs de quatre expériences distinctes, n=7-14 souris par génotype). (C) Expression de CD62L, CD127, CD27 et CD43 sur les LTm CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} de la rate à J70 pi. Les nombres indiquent les fréquences de cellules dans chaque quadrant. Résultats représentatifs de trois expériences (n=8 souris par génotype). (D) Fréquence des T_{EM} et des T_{CM} (à gauche) et des CD43⁻ CD27⁻, CD43⁻ CD27⁺, CD43⁺ CD27⁺ (à droite) parmi les LTm CD8⁺ P14 (ronds noirs) et les P14 IL2Rβ^{-/-} (ronds blancs) de la rate à J70 pi. Chaque cercle symbolise une souris individuelle et les barres représentent la fréquence moyenne pour 8-14 souris par génotype. Résultats cumulatifs issus de trois expériences distinctes. (E) Expression intracellulaire de T-bet et Eomes par les LTm CD8⁺ P14 (ligne grise) et les P14 IL2Rβ^{-/-} (ligne noire) dans la rate à J70 pi. Les nombres indiquent les MFI respectives (résultat représentatif de deux expériences distinctes, n=6 souris par génotype). (* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005, NS p≥0.05, test t non-pairé).

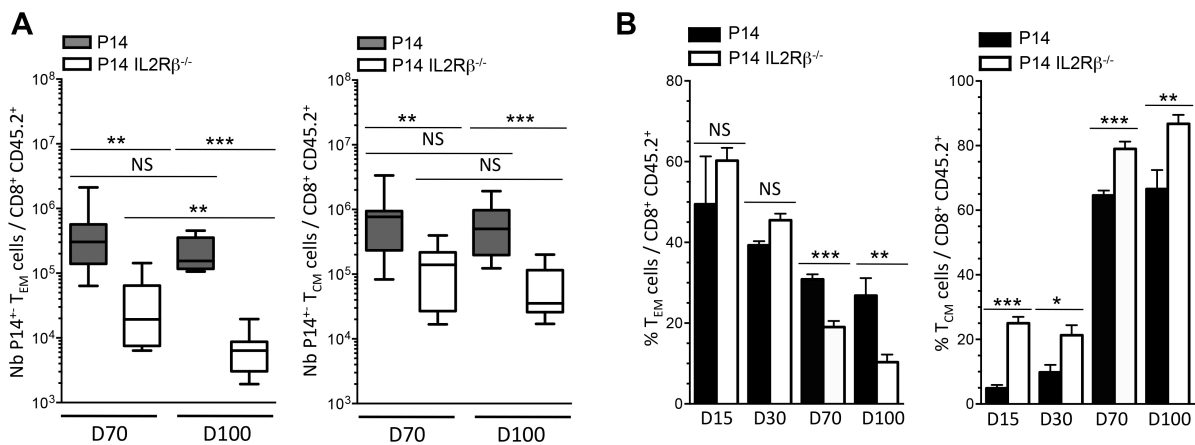


Figure 21 : Les signaux IL2Rβ contrôlent la maintenance des T_{EM} (A) Nombre de T_{EM} (à gauche) et de T_{CM} (à droite) au sein des LTm CD8⁺ P14 (boîtes grises) et P14 IL2Rβ^{-/-} (boîtes blanches) de la rate à J70 et J100 pi (n=8-14 souris par génotypes provenant de trois expériences distinctes). (B) Histogrammes représentant les fréquences des T_{EM} (à gauche) et des T_{CM} (à droite) dans les cellules P14 (barres noires) et P14 IL2Rβ^{-/-} (barres blanches) de la rate de J15 à J100 pi. Résultats cumulés issus de quatre expériences indépendantes (n= 4-13 souris par génotype). (* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005, NS p≥0.05, test t non-pairé).

1.3 La déficience de la chaîne IL2R β restreint l'expansion des SLECs secondaires sans limiter les fonctions des effecteurs secondaires

1.3.1 L'expansion des SLECs secondaires est réduite en absence des signaux IL-2 et IL-15

Les LTm CD8⁺ générés en l'absence de la chaîne IL2R β présentent une plus grande proportion de T_{CM} que de T_{EM} en comparaison des LTm CD8⁺ contrôles. Nous avons donc voulu voir si ces changements phénotypiques allaient modifier la capacité des LTm CD8⁺ à générer une réponse secondaire. Pour répondre à cette question, nous avons isolé par tri cellulaire 10⁴ LTm CD8⁺ P14 ou P14 IL2R β ^{-/-} de J70 pi. Ces LTm CD8⁺ P14 IL2R β déficients ou non, ont été isolés via un trieur cellulaire (BD Facs Aria II) sur la base de l'expression des marqueurs suivants : CD8⁺ CD3⁺ CD45.1⁻ CD45.2⁺. Ensuite, ils ont été injectés dans de nouveaux hôtes B6 naïfs. 24h après le transfert adoptif des cellules mémoires, les hôtes B6 murins ont été infectés avec une dose standard de LCMV Armstrong (2.10⁵ PFU). Comme lors de la primo-infection, plusieurs paramètres de la réponse effectrice ont été évalués (expansion, différenciation et fonctionnalité des effecteurs).

Premièrement, nous avons observé l'expansion secondaire des LTm CD8⁺ IL2R β déficients ou non à J70+5 et J70+7 (**Figure 22A**). Ces temps d'analyse ont été choisis précisément afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux préalablement obtenus lors de la primo-infection (**Figure 14**). Ainsi, nous pourrions évaluer si les signaux IL2R β régulent ou non de la même manière une expansion primaire et une expansion secondaire. Nous avons constaté qu'à J70+5, les nombres de LTe CD8⁺ secondaires n'étaient pas significativement différents que les cellules soient IL2R β déficientes ou non (3,7.10⁵ cellules P14 IL2R β ^{-/-} versus 2,8.10⁵ cellules P14 dans la rate, p=0,67, **Figure 22A**). En revanche, nous avons relevé une différence significative entre le nombre de LTe CD8⁺ secondaires P14 IL2R β ^{-/-} et P14 à J70+7 (0,9.10⁶ cellules P14 IL2R β ^{-/-} versus 4,7.10⁶ cellules P14 dans la rate à J70+7, p=0,003, **Figure 22A**). Donc, comme lors de la primo-infection, les signaux IL-2 et IL-15 dépendants ne sont pas requis à l'expansion initiale des effecteurs secondaires (J70 à J70+5). De plus, encore une fois comme lors de la primo-infection, les signaux IL-2 et IL-15 dépendants soutiennent l'expansion terminale, de J70+5 à J70+7, des effecteurs secondaires. Cette

expansion terminale réduite, en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants, résulte en une génération d'effecteurs secondaires 4,7 fois moins élevée par rapport aux conditions où les signaux IL2R β dépendants sont présents. Lors de la réponse primaire à J7, le nombre d'effecteurs primaires générés, en absence de signaux IL2R β , était 3,5 fois moins élevé que dans la condition contrôle. Cette donnée suggère que les effecteurs secondaires apparaissent comme étant plus dépendants de l'IL-2 et l'IL-15 pour leur expansion terminale que les effecteurs primaires.

Cette expansion réduite à J70+7 des LTm CD8⁺ IL2R β déficients par rapport aux LTm CD8⁺ IL2R β compétents peut résulter d'un défaut de prolifération ou d'un défaut de survie. En conséquence, nous avons évalué le taux de prolifération des LTe CD8⁺ IL2R β déficients ou non à J70+7 via un marquage Ki-67 (**Figure 22B**). Nous avons constaté que les effecteurs secondaires P14 IL2R β ^{-/-} présentaient une fréquence de cellules Ki-67⁺ significativement plus faible que celle des LTe CD8⁺ P14 secondaires (respectivement 18% versus 53%, **Figure 22B**). Cette donnée indique une prolifération réduite au sein des cellules P14 IL2R β ^{-/-} par rapport aux P14 contrôles. Nous avons également observé si, à J70+7 dans la rate, les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} exprimaient des niveaux de la molécule pro-apoptotique Bim plus élevé que ceux des LTe CD8⁺ P14 (**Figure 22B**). Nous avons effectivement révélé que l'expression de Bim était plus soutenue au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} secondaires en comparaison de celle des LTe CD8⁺ P14 (**Figure 22B**). Ce résultat suggère une apoptose accrue des cellules P14 IL2R β ^{-/-} par rapport aux cellules P14 IL2R β ^{+/-} à J7 post ré-infection. Un marquage Annexin V/7-AAD à J70+7 sur les LTe CD8⁺ P14 IL2R β déficients ou non permettrait de confirmer cette suggestion. Par ailleurs, nous avons également observé les niveaux de Bcl-2 dans les effecteurs secondaires P14 et P14 IL2R β ^{-/-} à J7 post ré-infection (**Figure 22B**). Nous avons constaté une légère réduction des niveaux de Bcl-2 au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} secondaires par rapport aux LTe CD8⁺ P14, suggérant une apoptose accrue en absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants (**Figure 22B**). Ces données suggèrent que les signaux IL2R β sont essentiels à l'expansion terminale des LTe CD8⁺ secondaires. Plus précisément, ils sont requis à la fois pour maintenir un taux de prolifération soutenu mais également pour restreindre l'apoptose au sein des LTe CD8⁺ secondaires.

Nous avons ensuite regardé si l'absence de signaux IL2R β lors de la réponse secondaire nuisait à la différenciation des LTe CD8⁺ secondaires. Pour ce faire, nous avons quantifié l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation à la surface des LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2R β ^{-/-} à J5 et J7 post ré-infection (**Figure 22C**). Nous avons constaté une diminution d'expression de CD62L, CD127, CD27 et une augmentation de KLRG1 sur les LTe CD8⁺ secondaires, IL2R β déficients ou non, à J70+5 et J70+7 dans la rate (**Figure 22C**). Ce résultat suggère que les LTm CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} peuvent se développer en effecteurs secondaires lors d'une ré-infection (**Figure 22C**). Cependant, la fréquence de cellules KLRG1⁺ est plus faible à J70+7 en l'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15 dépendants (92% pour les LTe CD8⁺ P14 versus 76% pour les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-}, **Figure 22C**). Cette différence de niveaux de KLRG1 entre les cellules P14 et P14 IL2R β ^{-/-} à J70+7 corrèle avec une réduction significative des proportions de SLECs secondaires parmi les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 (respectivement 71% versus 83%, p=0,03, **Figure 22D**). A l'opposé, nous avons constaté une augmentation des fréquences de MPECs secondaires dans les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} en comparaison des LTe CD8⁺ P14 à J70+7 (respectivement 7% versus 2%, p=0,03, **Figure 22D**). En évaluant, à J70+7, le nombre de SLECs secondaires au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-}, nous avons constaté que leur quantité était significativement moindre que celle des LTe CD8⁺ P14 (0,7.10⁶ cellules P14 IL2R β ^{-/-} versus 3,3.10⁶ cellules P14 dans la rate à J70+7, p=0,0036, **Figure 22D**). En revanche, nous n'avons pas observé de différences significatives à J70+7 entre les nombres de MPECs secondaires entre LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2R β ^{-/-} (respectivement 0,85.10⁵ versus 0,38.10⁵ cellules, p=0,12). Ces données suggèrent que, comme lors de la primo-infection, les signaux combinés IL-2 et IL-15 sont requis à la différenciation et/ou à la maintenance des SLECs à J70+7. Des expériences supplémentaires sur la survie et la prolifération des SLECs secondaires permettraient de dire si les signaux IL2R β conditionnent la maintenance de ces SLECs comme nous l'avons montré lors de la primo-infection (**Figure 16**).

Afin d'établir si la différenciation des SLECs secondaires était altérée à J70+7, nous avons décidé d'évaluer l'expression de facteurs de transcription impliqués dans le différenciation des LTe CD8⁺. Nous avons émis l'hypothèse que les facteurs de transcription T-bet et Eomes, régulant la différenciation des effecteurs primaires (**Figure 17**), modulaient

également la différenciation des effecteurs secondaires. Nous avons constaté à J70+7, par RTqPCR sur 2.10^4 LTe CD8⁺ P14 IL2R β déficients ou non, une réduction des niveaux d'ARNm codant pour T-bet dans les cellules P14 IL2R β ^{-/-} par rapport aux cellules P14 (**Figure 22E**). Par la même technique, nous avons relevé une augmentation des niveaux d'ARNm codant pour Eomes au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 (**Figure 22E**). En accord avec ces données, nous avons pu observer une réduction de l'expression intracellulaire de T-bet parmi les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 (**Figure 22F**). Nous avons noté une augmentation de l'expression intracellulaire de Eomes dans les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 (**Figure 22F**). En parallèle, nous avons également pu constater une augmentation des niveaux d'ARNm codant pour Bcl-6 et Klf2 et une réduction des niveaux d'ARNm codant pour Blimp-1 (**Figure 22E**). Finalement, nous avons remarqué que le ratio d'expression Eomes/T-bet favorisait plus Eomes dans les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} que dans les LTe CD8⁺ P14 à J70+7 (**Figure 22G**). Ces données montrent que les signaux IL2R β régulent la différenciation des SLECs secondaires à J7 post réinfection en favorisant l'expression de facteurs de transcription impliqués (T-bet, Blimp-1) dans la différenciation des LTe CD8⁺. En l'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15, l'expression de molécules (Eomes, Bcl-6, Klf2) favorisant la différenciation des MPECs est augmentée à J70+7. Il est très intéressant de noter que les signaux IL2R β influencent la différenciation des SLECs primaires et secondaires en usant des mêmes acteurs. Ainsi, les différenciations des effecteurs primaires et secondaires sont dépendantes des mêmes signaux.

Ces données regroupées mettent en lumière les contributions décisives des cytokines IL-2 et IL-15 dans l'établissement d'une réponse secondaire. Premièrement, ces deux molécules soutiennent l'expansion terminale des LTe CD8⁺ à J70+7. Deuxièmement, en soutenant la différenciation des SLECs secondaires via la modulation d'un réseau de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LTe CD8⁺ (T-bet, Blimp-1, Eomes, Bcl-6 et Klf2). Finalement, il est également envisageable que les cytokines IL-2 et IL-15 soutiennent la prolifération et la survie des SLECs secondaires. Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences supplémentaires sont requises. Nous pensons notamment faire un marquage Ki-67 ainsi qu'un marquage Annexin V/7-AAD sur les SLECs et les MPECs à

J70+7 afin d'évaluer la prolifération et la survie de ces deux types d'effecteurs en l'absence de signaux IL2R β .

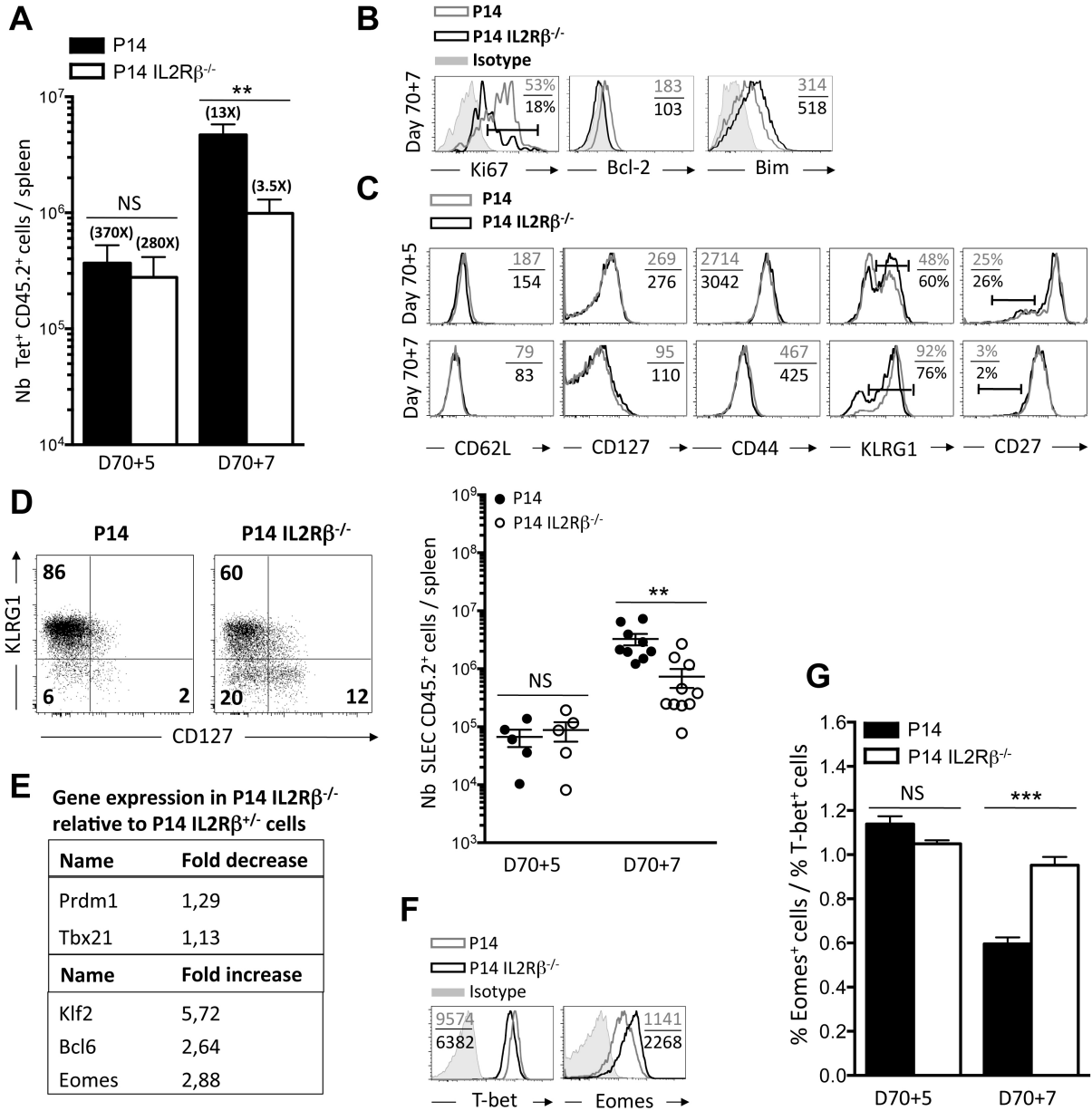


Figure 22 : La déficience en signaux IL2R β restreint l'expansion des SLECs secondaires

10⁴ LTm CD8⁺ P14 ou P14 IL2R β ^{-/-} CD45.2⁺ spléniques ont été triés par cytométrie en flux à J70. Ces cellules ont ensuite été transférées dans des souris C57BL/6 CD45.1.2⁺ naïves différentes. Ces nouvelles souris receveuses ont été infectées avec 2.10⁵ PFU de LCMV Armstrong 24h après. L'expansion des LTe CD8⁺ secondaires a été analysée par cytométrie à J5 (Day 70+5) et J7 (Day 70+7) post-réinfection. (A) Nombres totaux de splénocytes LTe CD8⁺ P14 (barres noires) et P14 IL2R β ^{-/-} (barres blanches) dans la rate à J5 et J7 pi. Les chiffres entre parenthèses indiquent le facteur d'expansion pour chaque population cellulaire. Résultats cumulés de trois expériences distinctes avec n=6-9 souris par jour et par génotype. (B) Marquage intracellulaire de Ki-67, Bcl-2 et Bim dans les LTe CD8⁺ P14 (ligne grise) et P14 IL2R β ^{-/-} (ligne noire) de la rate à J5 et J7 pi. Les nombres correspondent au pourcentage de cellules positives ou à la fluorescence moyenne (MFI) pour chaque marqueur. Résultats représentatifs de trois expériences indépendantes (n=9 souris par génotype). (C) Expression des marqueurs indiqués à la surface des LTe CD8⁺ secondaires P14 (ligne grise) et P14 IL2R β ^{-/-} (ligne noire) de la rate à J5 et J7 pi. Les nombres correspondent au pourcentage de cellules positives pour chaque marqueur. Résultats représentatifs de trois expériences indépendantes (n=10 souris par génotype). (D) Dot plot à J7 pi (à gauche) et nombres absolus de SLECs à J5 et J7 pi (à droite) basés sur les expressions de KLRG1 et CD127 au sein des LTe CD8⁺ secondaires P14 (ronds noirs) et P14 IL2R β ^{-/-} (ronds blancs). Résultats cumulés de trois expériences distinctes (n=5-10 souris par génotype). (E) L'expression des gènes indiqués a été évaluée par RTqPCR. Les chiffres indiquent le « fold decrease » ou le « fold increase » dans les P14 IL2R β ^{-/-} par rapport au P14 à J7 pi dans la rate (résultat cumulé de deux expériences distinctes, n=5 par génotype). (F) Marquage intracellulaire de Eomes et T-bet dans les LTe CD8⁺ secondaires P14 (ligne grise) et P14 IL2R β ^{-/-} (ligne noire) de la rate à J5 et J7 pi. L'isotype contrôle est indiqué en gris plein et les nombres correspondent aux MFI (représentatif de deux expériences distinctes, n=6). (G) Ratio de la fréquence des cellules Eomes⁺ sur celle des cellules T-bet⁺ des P14 (barre noire) et des P14 IL2R β ^{-/-} (barre blanche) à J5 et J7 pi (résultats cumulés de deux expériences différentes, n=6). (** p<0.005, *** p<0.0005, NS p≥0.05, test t non-pairé).

1.3.2 Les fonctions des effecteurs secondaires ne sont pas affectées par l'absence de signaux IL2R β

Nous venons de voir l'impact des cytokines IL-2 et IL-15 sur les effecteurs secondaires. En l'absence de signaux IL2R β dépendants, l'expansion et la différenciation des SLECs secondaires sont réduites. En considérant ces données, il est envisageable de penser que les cytokines IL-2 et IL-15 peuvent soutenir le contrôle d'une réinfection par les effecteurs secondaires. Pour répondre à cette question, nous avons évalué les fonctions (sécrétion de cytokines, production de molécules cytotoxiques, «killing» *in vivo*) des effecteurs secondaires P14 et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ à J7 post-réinfection (**Figure 23**).

Avant de caractériser la sécrétion de cytokines par les effecteurs secondaires, nous voulions savoir si les LTm CD8 $^{+}$ P14 et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ de J70 pi présentait un profil cytokinique similaire ou distinct après restimulation *in vitro*. Cette donnée étant particulièrement relevante considérant les différences de fonctions entre T_{EM} et T_{CM}. Ainsi, nous avons pu constater que bien que les fréquences de T_{EM} et T_{CM} ne soient pas identiques entre les cellules P14 et P14 IL2R $\beta^{-/-}$, les LTm CD8 $^{+}$, IL2R β déficients ou non, possèdent un profil de sécrétion cytokinique identique à J70 pi dans la rate (**Figure 23B**). En ce qui concerne la sécrétion de cytokines, par les effecteurs secondaires 7 jours post-réinfection, nous n'avons pas constaté de différences dans la production d'IFN γ et de TNF α entre les LTe CD8 $^{+}$ P14 et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ à J70+7 après restimulation *in vitro* avec du peptide GP₃₃₋₄₁ (0,2 μ g/mL), (**Figure 23A**). On notera que, comme en primo-infection, la fréquence de cellules P14 IL2R $\beta^{-/-}$ sécrétant de l'IL-2 est près de deux fois plus élevée que celle des cellules P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (**Figure 23A**). Encore une fois, nous pouvons relier cette production accrue d'IL-2 à une plus grande fréquence de MPECs, population cellulaire connue pour sécréter plus d'IL-2 que les SLECs²²⁵. Cette production plus élevée d'IL-2 au sein des cellules P14 IL2R $\beta^{-/-}$ se corrèle avec la plus grande proportion de triple producteurs cytokiniques (IFN γ , TNF α et IL-2) parmi ces mêmes cellules (**Figure 23B**). En ce qui concerne les fonctions cytotoxiques des effecteurs secondaires, nous avons constaté une plus faible production de Grz B dans les LTe CD8 $^{+}$ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ par rapport aux LTe CD8 $^{+}$ P14 (**Figure 23C**). Cette réduction s'applique également au Grz A comme en atteste la faible expression, révélée par RTqPCR sur 2.10⁴ LTe CD8 $^{+}$ secondaires, des gènes codant pour ces deux granzymes au sein des LTe CD8 $^{+}$ P14 IL2R $\beta^{-/-}$

par rapport aux LTe CD8⁺ P14 (**Figure 23C**). Il est intéressant toutefois de noter que cette réduction des gènes codant pour les deux granzymes chez les LTe CD8⁺ secondaires IL2Rβ déficients est plus faible que celle observée en primo-infection (**Figure 18**). Cette donnée suggère que les signaux IL-2 et IL-15 dépendants sont moins requis pour l'expression des Grz A et B lors d'une infection secondaire que lors d'une infection primaire. Afin de vérifier si, malgré une production réduite de granzymes, les LTe CD8⁺ secondaires IL2Rβ déficients peuvent éliminer aussi efficacement des cellules cibles que les LTe CD8⁺ secondaires compétents, nous avons effectué un test de « killing » *in vivo* (**Figure 23D**). Nos résultats montrent qu'à 1h après l'injection des cellules cibles, le « killing » *in vivo* des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} est significativement plus faible que celui des cellules P14 (respectivement 57% versus 83%, p=0,01, **Figure 23D**). 1,5h après l'injection des cellules cibles, le « killing » *in vivo* des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} est toujours significativement plus faible que celui des cellules P14 (respectivement 91% versus 99%, p=0,01, **Figure 23D**). Cependant, 3h après l'injection des cellules cibles, le « killing » *in vivo* des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} est identique à celui des cellules P14 (respectivement 99,1% versus 99,9%, p=0,8 **Figure 23D**). Donc en dépit d'une production réduite de granzymes, les effecteurs secondaires P14 IL2Rβ^{-/-} sont capables d'éliminer des cellules cibles *in vivo* (**Figure 23D**). Finalement, les charges virales quantifiées dans la rate étaient identiques à J70+7, que les hôtes B6 aient été transférées avec des LTm CD8⁺ P14 ou P14 IL2Rβ^{-/-} (**Figure 23E**). Contrairement aux données évaluées lors de la primo-infection (**Figure 17**), les charges virales ont été évaluées dans des souris Pfp^{-/-}. Ainsi, nous pouvons clairement conclure que les effecteurs secondaires IL2Rβ déficients contrôlent une réinfection aussi efficacement que les cellules P14 contrôles.

L'ensemble de ces données indique que les fonctions des effecteurs secondaires ne sont pas altérées par l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants. En effet, malgré un nombre absolu plus faible d'effecteurs secondaires et une production réduite de granzymes, les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} parviennent à contrôler et à éliminer la charge virale dans le cadre d'une réinfection. Ainsi, les cytokines IL-2 et IL-15 ne semblent pas être indispensables pour le développement des fonctions des effecteurs secondaires.

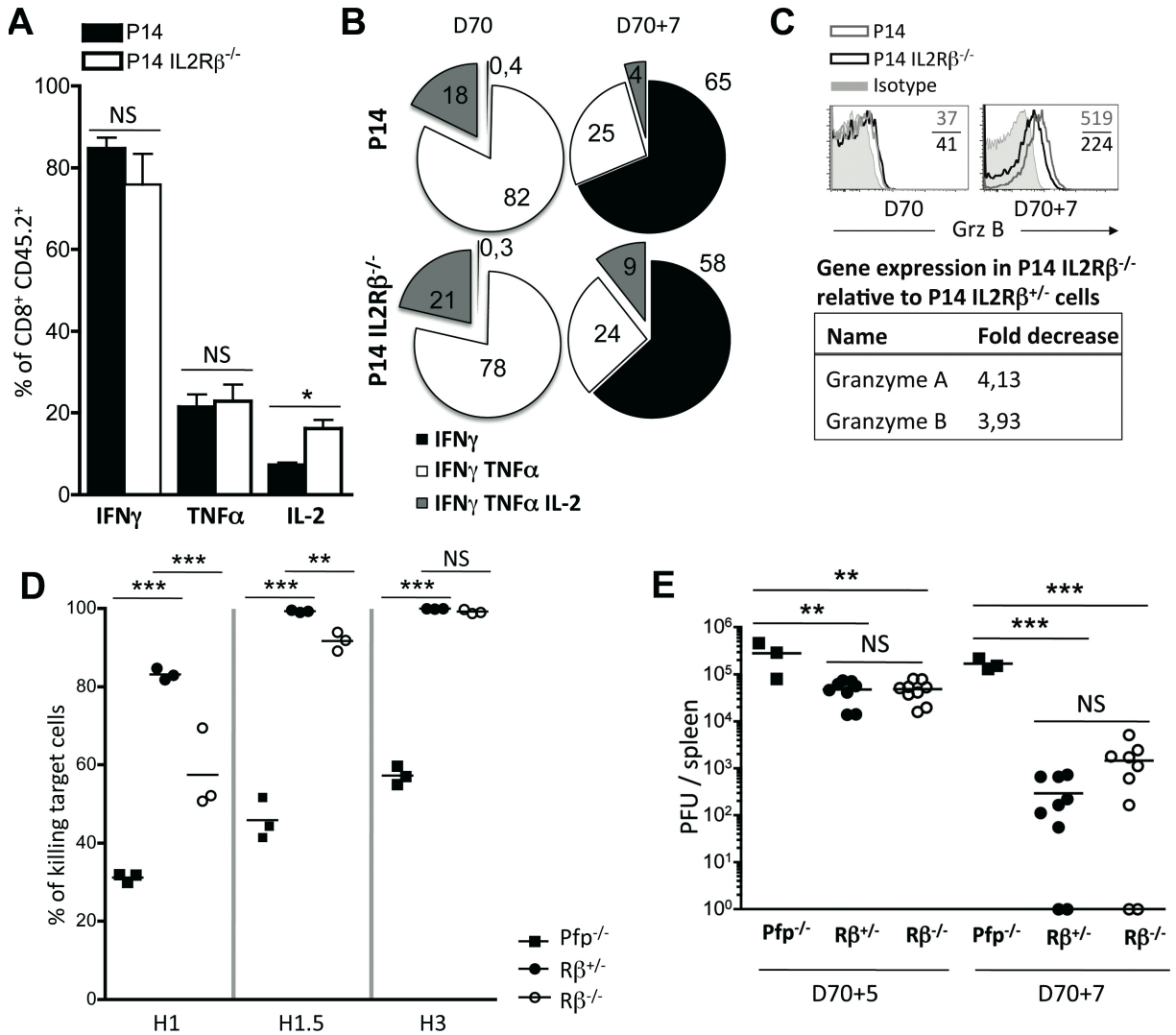


Figure 23 : Les effecteurs secondaires IL2R β déficients contrôlent parfaitement une infection (A) Fréquences de LTe CD8⁺ secondaires P14 (barres noires) et P14 IL2R β ^{-/-} (barres blanches) exprimant de l'IFN γ , du TNF α ou de l'IL-2 à J7 pi après 4h de restimulation *ex vivo* avec du peptide GP₃₃₋₄₁ (résultats cumulés de deux expériences distinctes; n=6 par génotype). (B) Tartes représentant le pourcentage splénique d'effecteurs P14 (en haut) et P14 IL2R β ^{-/-} (en bas) produisant une ou plusieurs cytokines à J70 (avant la réinfection) et J70+7 pi. Les valeurs indiquent la fréquence de chaque phénotype (résultats cumulés de deux expériences distinctes, n=6 par génotype). (C) Expression intracellulaire de Grz B (en haut) dans les P14 (ligne grise) et P14 IL2R β ^{-/-} (ligne noire) à J7 pi dans la rate. L'isotype contrôle est indiqué en gris plein et les nombres correspondent aux MFI (représentatif de trois expériences indépendantes, n=10 par génotype). L'expression des gènes indiqués a été évaluée par RTqPCR (en bas). Les chiffres indiquent le « fold decrease » ou le « fold increase » dans les P14 IL2R β ^{-/-} par rapport au P14 à J7 pi dans la rate (n=4 par génotype). (D) Killing *in vivo* à J7 pi des Pfp^{-/-} (carrés noirs), P14 (ronds noirs) et P14 IL2R β ^{-/-} (ronds blancs) à 1, 1.5 et 3 heures après l'injection des cellules cibles. (E) Titres viraux dans la rate des P14 (ronds noirs) et P14 IL2R β ^{-/-} (ronds blancs) à J5 et J7 pi (n=3-9 par génotype de trois expériences indépendantes). (** p<0.005 *** p<0.0005, NS p \geq 0.05, test t non-pairé)

1.3.3 L'absence de signaux IL-2 et IL-15 lors du priming n'induit pas un «programming» lors de la réponse secondaire

Plusieurs études ont préalablement démontré que les signaux IL-2 présents lors de la primo-infection induisent un «programming» qui conditionne la capacité à s'expandre des LTm CD8⁺ lors d'une infection secondaire^{95, 203}. Nous nous sommes donc demandé si l'abrogation des signaux IL2R β lors de la première semaine de primo-infection ou d'infection secondaire aurait un impact sur le développement des effecteurs secondaires. Afin de répondre à cette question, nous avons traité des souris C57BL/B6 hôtes, préalablement transféré avec 10⁵ cellules P14, avec un anticorps bloquant anti-CD122 (ou anticorps bloquant contrôle, LTF-2) pendant une semaine après l'infection ou la réinfection ou les deux (**Figure 24A**). En ce qui concerne l'infection et la ré-infection, une dose standart de 2.10⁵ PFU de LCMV Armstrong a été injectée aux souris dans chaque cas. Ce protocole expérimental présente l'avantage de tester précisément l'impact combiné des cytokines IL-2 et IL-15 sur le potentiel «programming» initial des LT CD8⁺ mais également sur la nécessité de ces deux molécules lors d'une réponse secondaire. Afin d'être certain de l'efficacité de notre anticorps bloquant anti-CD122, nous avons confirmé que la phosphorylation de STAT5, molécule de signalisation des signaux IL2R β ⁸⁷, était réduite après traitement avec l'anti-CD122 (**Figure 24B**).

Tel qu'attendu, le nombre de cellules P14 à J7 dans la rate est significativement réduit lorsque les LTe CD8⁺ ont reçu un traitement anti-CD122 par rapport aux souris ayant reçu le traitement avec l'anticorps contrôle (respectivement 5,2.10⁶ cellules P14 versus 10.10⁶, p=0,008, **Figure 24C**). De plus, le nombre de SLECs P14 au sein des LTe CD8⁺ traités avec l'anti-CD122 est significativement plus faible que celui des LTe CD8⁺ traités avec l'anticorps contrôle à J7 dans la rate (respectivement 3,1.10⁶ SLECs P14 versus 6,8.10⁶, p=0,005, **Figure 24D**). En ce qui concerne les lymphocytes mémoires, il est intéressant de noter que l'abrogation temporaire des signaux IL2R β pendant la première semaine d'infection, n'affecte pas le nombre de LTm CD8⁺ générés à J70 pi dans la rate (0,35.10⁶ LTm CD8⁺ P14 versus 0,49.10⁶ LTm CD8⁺ P14 + anti-CD122 dans la rate, p=0,48, **Figure 24E**). Nos résultats ne montrent pas non plus de différences significatives dans les fréquences de T_{EM} générés avec ou sans traitement anti-CD122 (34% de T_{EM} P14 versus 36,6% de T_{EM} P14 + anti-CD122 dans

la rate, $p=0,49$, **Figure 24F**). Nous ne constatons pas non plus de différences significatives dans les fréquences de T_{CM} générés avec ou sans traitement anti-CD122 (45,33% de T_{CM} P14 versus 47% de T_{CM} P14 + anti-CD122 dans la rate, $p=0,76$, **Figure 24F**). Nos résultats ne montrent pas non plus de différences significatives dans le nombre de T_{EM} générés avec ou sans traitement anti-CD122 ($1,2 \cdot 10^5$ T_{EM} P14 versus $1,3 \cdot 10^5$ de T_{EM} P14 + anti-CD122 dans la rate, $p=0,81$, **Figure 24G**). Enfin, nous n'avons pas constaté de différences significatives dans le nombre de T_{CM} générés avec ou sans traitement anti-CD122 ($1,4 \cdot 10^5$ T_{CM} P14 versus $2,5 \cdot 10^5$ de T_{EM} P14 + anti-CD122 dans la rate, $p=0,44$, **Figure 24G**).

Finalement, nous avons évalué la capacité des $LTm\ CD8^+$ générés avec traitement anti-CD122 à développer une réponse secondaire (**Figure 25**). Afin de voir si l'action des signaux IL-2 et IL-15 sur l'expansion des effecteurs secondaires s'effectue lors de la primo-infection, lors de l'infection secondaire ou des deux, nous avons mis en place un protocole expérimental particulier (**Figure 25A**). En effet, les nouvelles souris C57BL/6 hôtes adoptivement transférés avec ces $LTm\ CD8^+$ (traitées ou non avec un anti-CD122 lors de la primo-infection) ont reçu ou non un traitement anti CD122 durant la première semaine après la réinfection (**Figure 25A**). Nous avons remarqué que l'absence de signaux IL-2 et IL-15 durant la première semaine de primo-infection n'influe pas sur la capacité des $LTm\ CD8^+$ à se réexpandre efficacement lors d'une infection secondaire comme en atteste les nombres absolus d'effecteurs secondaires à J70+7 ($0,95 \cdot 10^6$ cellules P14 versus $1,04 \cdot 10^6$ cellules P14 dans la rate de souris respectivement traitées avec l'anti-CD122 et l'anticorps bloquant contrôle lors de la primo-infection, $p=0,32$, **Figure 25B**). Nous remarquons également que l'interruption des signaux IL-2 et IL-15 dépendants lors de la réinfection réduit significativement l'expansion secondaire des $LTm\ CD8^+$ à J70+7, ceux-ci ayant été générés ou non en l'absence initiale de signaux IL2R β (respectivement $3,78 \cdot 10^5$ cellules P14 et $3,85 \cdot 10^5$ cellules P14, **Figure 25B**). Nous avons également noté que le traitement anti-CD122 durant l'infection secondaire résulte en une réduction des fréquences de SLECs à J7 pi au sein des groupes souris traitées avec l'anti CD122 lors de la réinfection (74,9% et 78,6% pour les deux groupes traités avec l'anti-CD122 lors de la ré-infection versus 87,8% et 87,5% pour les deux groupes traités avec l'anticorps contrôle toujours lors de la réinfection, **Figure 25C**). Plus précisément, le traitement anti-CD122 durant l'infection secondaire résulte en une réduction du nombre de SLECs à J7 pi au sein des groupes souris traitées avec l'anti CD122 lors de la réinfection

($2,9 \cdot 10^5$ et $3,2 \cdot 10^5$ SLECs pour les deux groupes traités avec l'anti-CD122 lors de la ré-infection versus $8,4 \cdot 10^5$ et $7,4 \cdot 10^5$ SLECs pour les deux groupes traités avec l'anticorps contrôle toujours lors de la réinfection, **Figure 25C**).

L'ensemble de ces données suggère que les signaux IL-2 et IL-15 dépendants sont requis afin de soutenir le développement des SLECs secondaires mais qu'une abrogation transitoire de ces cytokines pendant la primo-infection n'influe pas sur la capacité des LTm CD8⁺ générés à se réexpandre et à se différencier en SLECs.

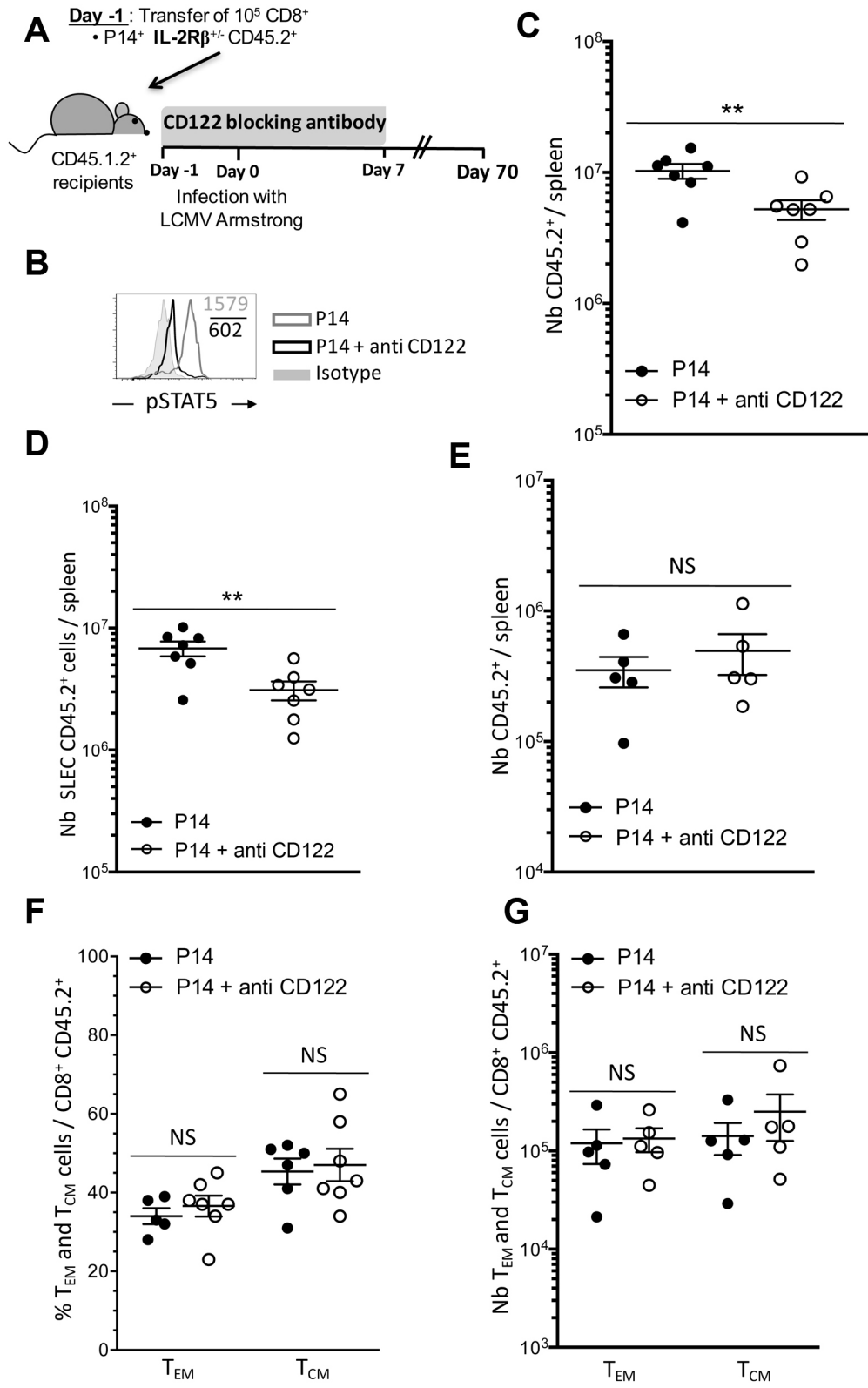


Figure 24 : Bloquer transitoirement les signaux CD122 durant l'infection primaire n'affecte ni le nombre ni la composition des LTm CD8⁺ (A) Schéma expérimental des expériences bloquant les signaux CD122 pendant la phase d'infection primaire. Les souris C57BL/6 CD45.1.2⁺ naïves ont été traitées avec 200 µg d'anti-CD122 (TM-β1) ou de LTF-2 (anticorps contrôle) en intrapéritonéal tout les deux jours de J-1 avant l'injection des LTn CD8⁺ P14 jusqu'à J6 après l'infection. Comme dans la **Figure 14**, les souris C57BL/6 CD45.1.2⁺ naïves receveuses reçoivent 10⁵ P14 CD45.2⁺ et sont infectées le lendemain avec 2.10⁵ PFU de LCMV Armstrong. (B) Marquage intracellulaire de phospho STAT5 (Y694) dans les LTe CD8⁺ P14 traités (ligne noire) ou non (ligne grise) avec l'anti CD122 à J7 post-infection dans la rate. L'isotype est indiqué en gris plein. Les chiffres indiquent les MFI (n=3). (C) Nombre totaux de LTe CD8⁺ P14 traités (cercles blancs) ou non (cercles noirs) avec l'anti CD122 à J7 post-infection dans la rate. Chaque cercle symbolise une souris individuelle et les barres médianes indiquent les nombres moyens. Résultats cumulés de trois expériences indépendantes avec n=7 souris par groupe. (D) Nombres totaux de SLECs primaires dans les LTe CD8⁺ P14 traités (cercles blancs) ou non (cercles noirs) avec l'anti CD122 à J7 post-infection dans la rate. Chaque cercle symbolise une souris individuelle et les barres médianes indiquent les nombres moyens. Résultats cumulés de trois expériences indépendantes avec n=7 souris par groupe. (E) Nombre totaux de LTm CD8⁺ P14 traités (cercles blancs) ou non (cercles noirs) avec l'anti CD122 à J7 post-infection dans la rate. Chaque cercle symbolise une souris individuelle et les barres médianes indiquent les nombres moyens. Résultats cumulés de deux expériences indépendantes avec n=4-5 souris par groupe. (F) Fréquences des T_{EM} et T_{CM} à J70 pi dans la rate parmi les LTm CD8⁺ P14 traités (cercles blancs) ou non (cercles noirs) avec l'anti CD122. Chaque cercle symbolise une souris individuelle et les barres médianes indiquent les nombres moyens. Résultats cumulés de deux expériences indépendantes avec n=5-7 souris par groupe. (G) Nombres totaux de T_{EM} et T_{CM} à J70 pi dans la rate parmi les LTm CD8⁺ P14 traités (cercles blancs) ou non (cercles noirs) avec l'anti CD122. Chaque cercle symbolise une souris individuelle et les barres médianes indiquent les nombres moyens. Résultats cumulés de deux expériences indépendantes avec n=5 souris par groupe. (** p<0.005, NS p≥0.05; test t non-pairé)

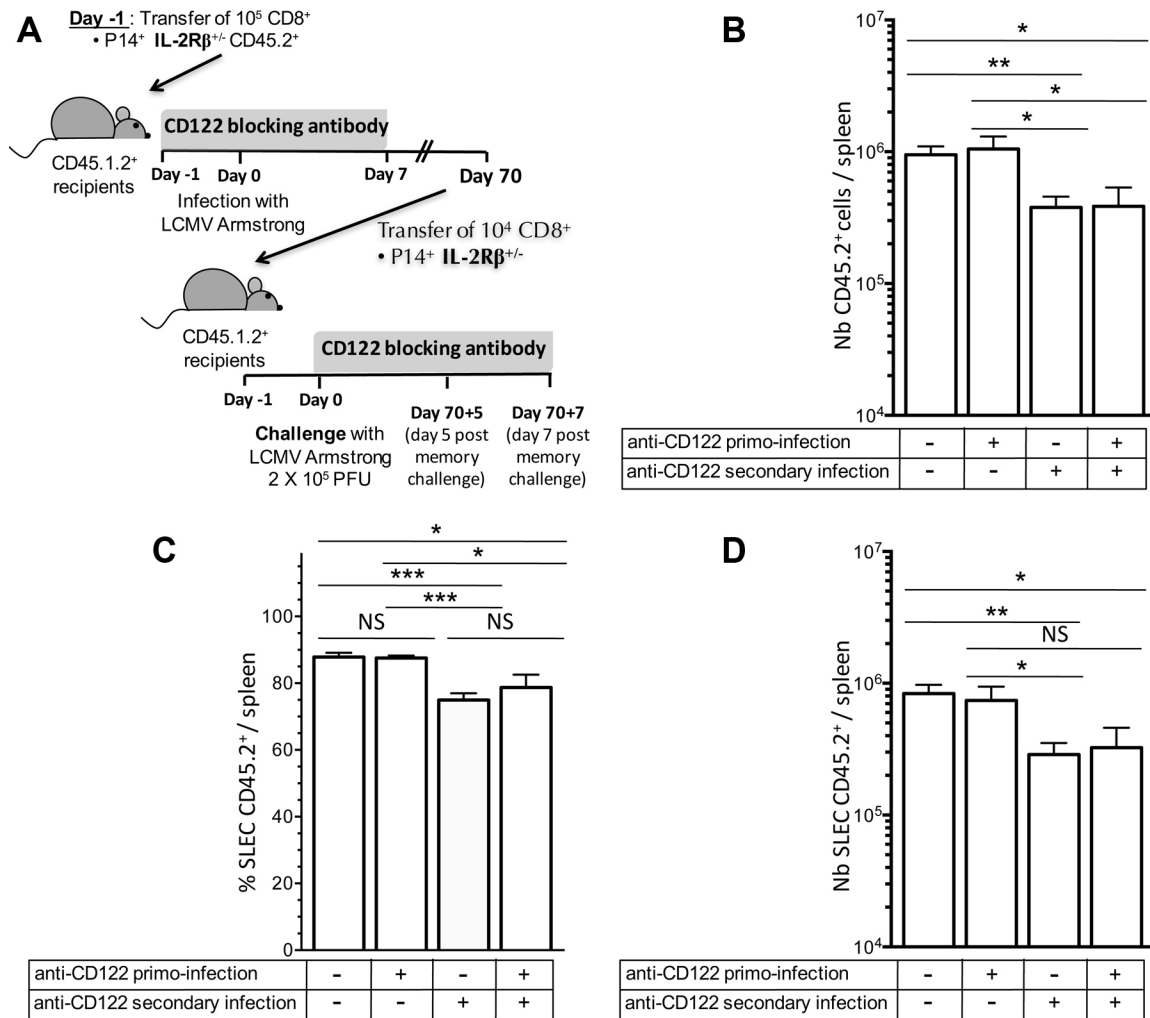


Figure 25 : Bloquer les signaux CD122 durant l'infection secondaire limite l'expansion des SLECs secondaires (A) Schéma expérimental des expériences bloquant les signaux CD122 pendant la phase d'infection primaire et/ou secondaire. 10^4 LTm CD8⁺ de la rate, générés avec ou sans traitement anti-CD122 durant l'infection primaire (**Figure 24**), ont été triés à J70 pi puis injectés à des C57BL/6 CD45.1.2⁺ naïves receveuses. 24h plus tard, ces souris receveuses ont été infectées avec $2 \cdot 10^5$ PFU de LCMV Armstrong. Ces nouvelles souris receveuses ont été traitées avec 200 μ g d'anti-CD122 (TM- β 1) ou de LTF-2 (anticorps contrôle) en intrapéritonéal tout les deux jours de J-1 avant l'injection des LTm CD8⁺ P14 jusqu'à J6 après la ré-infection. (B) Nombres absolus de LTe CD8⁺ P14 secondaires à J7 post-réinfection traités ou non avec l'anti CD122 durant l'infection primaire et/ou l'infection secondaire. Résultats représentatifs de deux expériences indépendantes avec n=5 par groupe. (C) Fréquences de SLECs parmi les LTe CD8⁺ P14 secondaires à J7 post-réinfection traités ou non avec l'anti CD122 durant l'infection primaire et/ou l'infection secondaire. Résultats représentatifs de deux expériences indépendantes avec n=5 par groupe. (D) Nombres absolus de SLECs parmi les LTe CD8⁺ P14 secondaires à J7 post-réinfection traités ou non avec l'anti CD122 durant l'infection primaire et/ou l'infection secondaire. Résultats représentatifs de deux expériences indépendantes avec n=5 par groupe. (* p<0.05, ** p<0.005, NS p \geq 0.05; ANOVA Kruskal-Wallis).

2. Influence de l'IL-21 sur le développement des LTe et LTm CD8⁺ en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants

Mise en contexte

Nous avons vu dans la section 1 de cette partie résultats qu'en l'absence prolongée de signaux IL2R β , le nombre total de LTm CD8⁺ généré était significativement réduit (**Figure 19**). Cette donnée contraste avec un modèle d'abrogation complète des signaux γ_c dépendants où une absence totale de LTm CD8⁺ est constatée et ce dans le même modèle infectieux (LCMV Armstrong)¹⁰⁷. Ceci suggère donc qu'en plus de l'IL-2 et de l'IL-15, au moins une autre cytokine dépendante de la chaîne γ_c est impliquée dans le développement des LTm CD8⁺.

Nous avons vu dans les sections 4 et 6 de l'introduction que l'IL-21 était impliqué dans le développement des réponses LT CD8⁺. En effet, une étude *in vitro* a montré que l'IL-21 augmente la production d'IFN γ et les fonctions cytotoxiques³⁴⁸ des LT CD8⁺ activés. *In vivo*, l'impact de l'IL-21 sur les LTe et LTm CD8⁺ semble être dépendant du contexte infectieux. Par exemple, dans une infection par le virus LCMV Armstrong, l'absence de cette cytokine ou de son récepteur n'altère pas la réponse effectrice primaire^{98, 350}, alors que dans un modèle utilisant VV comme agent pathogène, les LTe CD8⁺ IL-21R^{-/-} prolifèrent moins et ont des fonctions cytotoxiques réduites^{99, 351, 352}. En ce qui concerne les LTm CD8⁺, dans un modèle d'infection par le virus LCMV Armstrong, le nombre de LTm CD8⁺ endogènes, quelque soit leur spécificité antigénique (GP₃₃, NP₃₉₆, GP₂₇₆, NP₂₀₅), n'est pas dépendant des signaux IL-21⁹⁸. A l'opposé, l'IL-21 favorise la survie des LTm CD8⁺ en augmentant l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-2 dans un modèle d'infection VV³⁵². Lors d'une infection LCMV Armstrong beaucoup de signaux inflammatoires (IFNs de type I), en plus des signaux IL-2 et IL-15 pourraient avoir des actions redondantes avec l'IL-21 et ainsi masquer les effets d'une délétion des signaux IL-21 dépendants. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'IL-21 a bien un impact sur la réponse immune LT CD8⁺ en réponse à LCMV Armstrong mais que ses actions sont synergiques et redondantes à celles d'autres cytokines dans ce modèle infectieux.

En dehors de son rôle individuel, l'IL-21 peut agir en synergie avec d'autres cytokines. En effet, *in vitro*, l'IL-21 fonctionne de concert avec l'IL-15 pour promouvoir la prolifération des LT CD8⁺ activés^{99, 348}. De plus, l'IL-21 soutient la maturation des LTm CD8⁺ en agissant en synergie avec l'IL-10²⁷⁰. Compte tenu de ces données, nous émettons l'hypothèse que l'IL-21 soutient le développement et la maintenance des LTe et LTm CD8⁺ en agissant en synergie avec les cytokines IL-2 et IL-15.

2.1 La triple déficience en signaux cytokiniques (IL-2, IL-15 et IL-21) réduit drastiquement l'expansion des effecteurs primaires et leur différenciation en SLECs

2.1.1 Une combinaison de signaux cytokiniques IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants est requise à l'expansion et à la différenciation des effecteurs primaires

Nous émettons l'hypothèse que l'impact de l'IL-21 sur la réponse immune LT CD8⁺ est minimisé à cause de cytokines possédant des fonctions redondantes à celles de l'IL-21. Par exemple, dans une infection LCMV Armstrong, l'IL-21 n'a semble t'il aucun impact sur l'expansion et l'acquisition des fonctions effectrices des LTe CD8⁺⁹⁸. Nous émettons l'hypothèse que les cytokines IL-2 et IL-15 possèdent des fonctions redondantes à l'IL-21 dans ce modèle infectieux et pourraient masquer les effets d'une déficience en IL-21. Afin de voir l'impact des signaux IL-21 sur la réponse LT CD8⁺ en l'absence de signaux IL-2 et IL-15 nous avons appliqué le même protocole expérimental que dans la section 1 de cette partie résultats. En effet, nous avons transféré 10⁵ LTn CD8⁺ P14 ou P14 IL2Rβ^{-/-} ou P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} CD45.2⁺ dans des souris receveuses C57BL/6 CD45.1.2⁺. 20h plus tard ces mêmes souris ont été infectées avec une dose standard de 2.10⁵ PFU de LCMV Armstrong afin de générer une infection virale aigue. Nous avons évalué l'expansion et la différenciation des effecteurs primaires. Nous avons ensuite étudié le développement des LTm CD8⁺ en l'absence signaux IL-2, IL-15 et IL-21.

Il est intéressant de noter que les LTe CD8⁺ triples déficients présentent une expansion initiale (de J0 à J5 pi) identique à celle des cellules P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} (**Figure 26A**). En revanche, au pic de l'expansion à J7, le nombre de LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} est

significativement réduit par rapport à celui des LTe CD8⁺ P14 (1,8.10⁶ cellules P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} versus 17,8.10⁶ cellules P14 dans la rate, p=0,0044) (**Figure 26A**). Nous avons également constaté que le nombre de LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} est significativement plus faible que celle des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} (respectivement 1,8.10⁶ versus 3,5.10⁶ dans la rate à J7 pi, p=0,0092). Ainsi, l'abrogation supplémentaire des signaux IL-21R réduit d'un facteur 2 le nombre d'effecteurs par rapport aux P14 IL2Rβ^{-/-}. Cette donnée suggère que les trois cytokines γ_c dépendantes collaborent à l'expansion des LTe CD8⁺ au pic de la réponse immunitaire. Cependant, l'expansion initiale (de J0 à J5) de ces mêmes LTe CD8⁺ ne semble pas dépendre des signaux cytokiniques IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants. Des expériences supplémentaires sont requises afin de voir si l'expansion réduite des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} à J7 résulte d'un défaut de survie, de prolifération ou des deux. Il est notamment nécessaire d'évaluer le taux de prolifération (marquage Ki-67) ainsi que l'apoptose (marquage Annexin V/7-AAD) à J5 et 7 pi dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} de la rate. De façon intéressante, il a été montré, *in vitro*, que l'IL-21 agit en synergie avec l'IL-15 afin de promouvoir la prolifération de LT CD8⁺ activés⁹⁹. Par ailleurs, une autre équipe a également montré que l'IL-21 pouvait être un facteur de survie, toujours *in vitro*, à des LT CD8⁺ activés³⁴⁹. Nous émettons donc l'hypothèse que l'IL-21, en absence de signaux IL2Rβ, est capable de supporter à la fois la prolifération et la survie des LTe CD8⁺. Enfin, l'absence de différences significatives entre les nombres de LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} et LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} à J10 et J15 pi, suggère que les signaux IL-21, contrairement aux signaux IL2Rβ ne sont pas impliqués dans la phase de contraction des LTe CD8⁺.

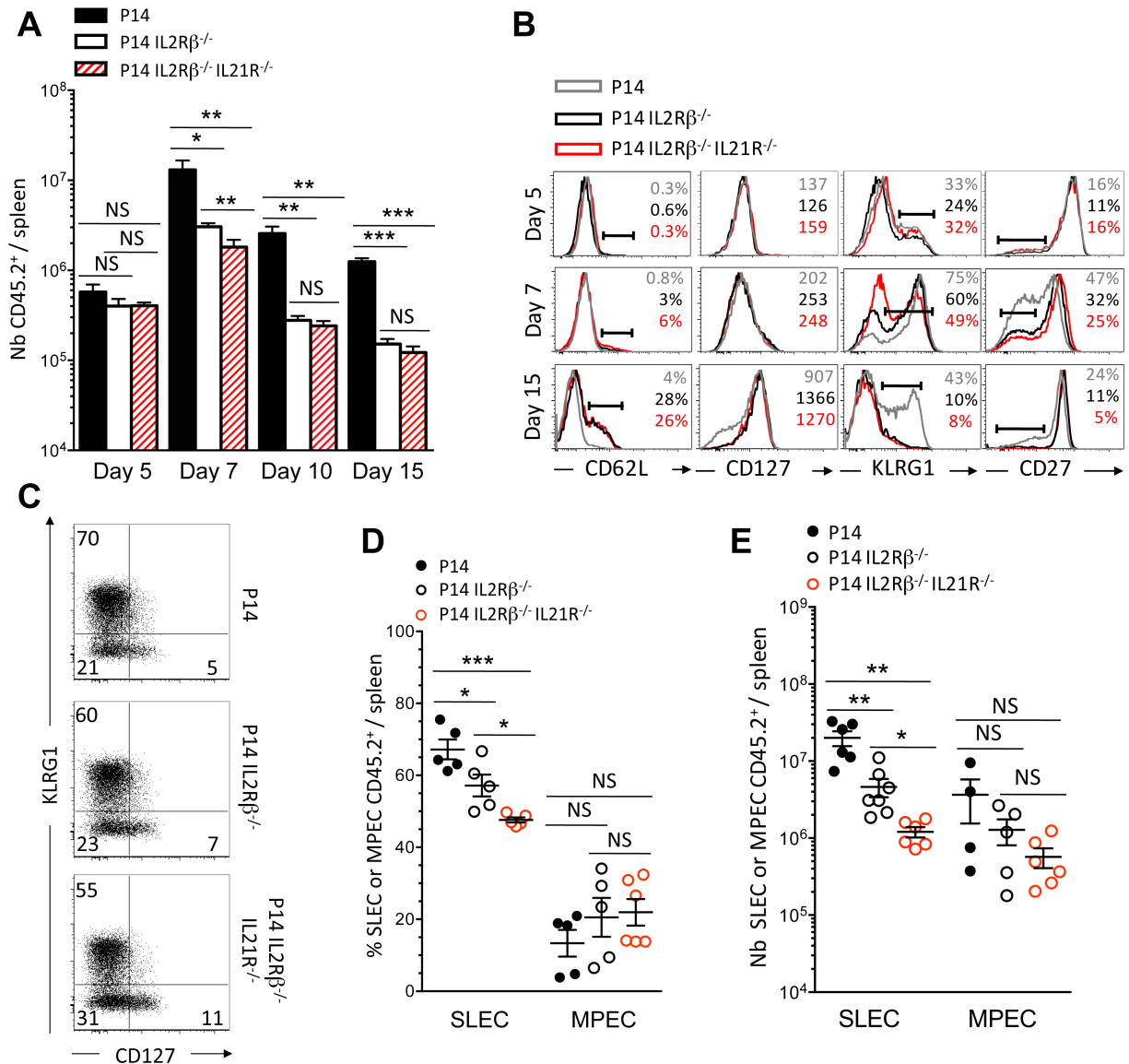


Figure 26 : Une combinaison des signaux IL-2, IL-15 et IL-21 contrôle l'expansion terminale des SLECs (A) Nombres totaux de splénocytes LTe CD8⁺ P14, P14 IL2R $\beta^{-/-}$ et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL-21R $^{-/-}$ à J5, J7, J10 et J15 dans la rate pi (n=4-6 souris par « time-point » provenant de trois expériences distinctes). (B) Expression des marqueurs indiqués à la surface des LTe CD8⁺ P14 (ligne grise), P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (ligne noire) et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL-21R $^{-/-}$ (ligne rouge) de la rate à J5, J7 et J15 pi. Les nombres correspondent au pourcentage de cellules positives pour chaque marqueur. Résultats représentatifs de deux expériences indépendantes (n=6 souris par génotype). Dot plot (C) et (D) Fréquences de SLECs et MPECs parmi les LTe CD8⁺ P14 (cercle noir), P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (cercle blanc) et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL-21R $^{-/-}$ (ronds rouges) de la rate à J7 pi (n=6). (E) Nombres absolus de SLECs et MPECs parmi les LTe CD8⁺ P14 (cercle noir),

P14 IL2R β ^{-/-} (cercle blanc) et P14 IL2R β ^{-/-} IL-21R^{-/-} (ronds rouges) de la rate à J7 pi (n=6). (* p<0.05, ** p<0.005, NS p≥0.05, test t non-pairé)

Nous avons vu dans la section 4 de l'introduction que l'influence de l'impact de l'IL-21 sur la différenciation SLECs/MPECs n'avait pas été étudiée. Cependant, plusieurs études ont démontré qu'*in vitro*, l'IL-21 est capable d'induire l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des SLECs (Blimp-1, T-bet, Id2)^{266, 281, 341, 354}. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'abrogation additionnelle des signaux IL-21 affecterait majoritairement le développement des SLECs. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons observé individuellement l'expression de certains marqueurs de différenciation spécifiques des SLECs/MPECs et des effecteurs terminaux versus les précurseurs mémoires (CD62L, CD27, CD127, KLRG1) à J5, 7 et 15 pi à la surface des LTe CD8⁺ P14, P14 IL2R β ^{-/-} et P14 IL2R β ^{-/-} IL21R^{-/-} de la rate (**Figure 26B**). Nous n'avons remarqué aucune différence phénotypique à J5 pi entre les trois types d'effecteurs suggérant ainsi que les signaux IL-21, tout comme les signaux IL2R β n'influent pas sur la différenciation des LTe CD8⁺ à des temps précoces (J5). En revanche, à J7 et J15 pi, nous avons constaté que les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} IL21R^{-/-} présentaient des expressions de ces marqueurs distinctes à celles des cellules P14 (**Figure 25B**). En effet, tout comme certains LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-}, certains LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} IL21R^{-/-} possèdent, déjà à J7 et plus intensément à J15 pi, une réexpression précoce de marqueurs de LTm CD8⁺ (CD62L^{élevé} CD127^{élevé} KLRG1^{faible} CD27^{élevé}) (**Figure 26B**). Cette donnée corrèle avec une réduction significative des fréquences de SLECs au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} IL21R^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2R β ^{-/-} dans la rate à J7 pi (respectivement 47,6% de SLECs versus 57,16%, p=0,0153, **Figure 26C**). A l'opposé, la proportion de MPECs n'est pas significativement différente dans les cellules P14 IL2R β ^{-/-} IL21R^{-/-} par rapport au cellules P14 IL2R β ^{-/-} (respectivement 21,9% de SLECs versus 20,54%, p=0,83, **Figure 26C**) Ceci suggérant que le développement de la population MPECs n'est pas affectée par l'absence de signaux IL-21. Nous avons aussi observé une réduction du nombre de SLECs dans les cellules CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} IL21R^{-/-} par rapport aux cellules CD8⁺ P14 toujours à J7 pi (respectivement 1,2.10⁶ versus 20.10⁶, p=0,0016, **Figure 26D**). De plus, le nombre de SLECs parmi les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} IL21R^{-/-} à J7 pi est significativement plus

faible que celui des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} (respectivement 1,2.10⁶ versus 4,6.10⁶, p=0,028, **Figure 26D**). En revanche, les nombres de MPECs ne sont significativement pas différents à J7 pi dans la rate entre LTe CD8⁺ P14, P14 IL2Rβ^{-/-} et P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} (respectivement 3,6.10⁶, 1,28.10⁶ et 0,57.10⁶ cellules). L'ensemble de ces données suggère donc que les signaux combinés IL-2, IL-15 et IL-21 sont cruciaux dans la différenciation ou la maintenance des SLECs mais pas des MPECs à J7 pi. Il serait nécessaire pour les prochaines expériences d'évaluer le nombre de SLECs à J5 pi dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} afin d'être certain que les signaux IL-21 affecte la différenciation ou la maintenance des SLECs mais pas leur génération.

Il est possible, comme pour les cellules P14 IL2Rβ^{-/-}, que la différenciation réduite en SLECs dans les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} résulte de modifications dans l'expression de facteurs de transcriptions clés (T-bet/Eomes). En ce sens, nous avons évalué l'expression de T-bet et Eomes, molécules respectivement impliquées dans le développement des SLECs et des MPECs^{229, 253} dans les trois types de LTe CD8⁺ à J7 pi (**Figure 27**). Nous avons détecté une forte augmentation de l'expression Eomes à J7 chez les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14 (**Figure 27A**). Il est même notable que les niveaux d'Eomes sont plus élevés au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} que dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} (**Figure 27A**). En parallèle, les niveaux de T-bet ne sont que faiblement réduits en l'absence de signaux IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants (**Figure 27A**). Parallèlement, nous avons comparé le ratio d'expression Eomes/T-bet dans les cellules P14, P14 IL2Rβ^{-/-} et P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} à J7 pi (**Figure 27B**). Comme préalablement décrit (**Figure 17B**), nous avons relevé que le ratio penchait en faveur d'Eomes au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} en comparaison des cellules P14 contrôles (**Figure 27B**). Mais nous avons aussi noté que le ratio d'expression Eomes/T-bet penchait également en faveur d'Eomes dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} (**Figure 27B**). Un tel ratio d'expression de Eomes/T-bet, en absence de signaux IL2Rβ et IL-21R dépendants, corrèle avec une différenciation préférentielle vers les MPECs plutôt que vers les SLECs. Ces données font écho à des résultats d'une étude *in vitro* où l'IL-21 réprime l'expression d'Eomes dans des LT CD4⁺ Th1³⁵⁴. Des expériences complémentaires sont toutefois nécessaires afin de caractériser, dans les cellules P14 IL2Rβ^{-/-}

IL21R^{-/-}, l'expression d'autres de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LTe CD8⁺ (Blimp-1, Bcl-6 Klf2, Id2, Id3).

Le fait que les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} soient significativement moins nombreux que les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} suggère que les trois cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 collaborent de façon synergique et redondante afin de promouvoir l'expansion terminale des LTe CD8⁺ au pic de la réponse immune. Nous émettons l'hypothèse que ces trois cytokines soutiennent l'expansion terminale en maintenant un taux de prolifération élevé et en limitant l'apoptose parmi les LTe CD8⁺. Des expériences de Ki-67 et d'annexin V 7-AAD sur les lymphocytes P14, P14 IL2Rβ^{-/-} et P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} sont donc requises. Par ailleurs,, le nombre des SLECs est fortement réduit à J7 dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} par rapport aux les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-}. Ceci suggère que les signaux IL-21 participent également, en redondance avec les signaux IL-2 et IL-15 à la différenciation et/ou à la maintenance des SLECs.

2.1.2 Une combinaison de signaux cytokiniques IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants régule l'expression du granzyme B

Nous venons de voir que les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 agissent en synergie afin de soutenir l'expansion des LTe CD8⁺ (**Figure 26**). De plus, ce sont les SLECs qui apparaissent comme étant les plus dépendants des signaux de ces trois cytokines pour leur différenciation et/ou maintenance (**Figure 26C-D**). Nous avons vu dans la section 1 de cette partie résultats que les signaux IL-2 et IL-15 étaient requis afin de produire des niveaux élevés de Grz B (**Figure 18C**). Par ailleurs, une étude *in vitro* a montré que l'IL-21 augmente la production d'IFNγ et les fonctions cytotoxiques³⁴⁸. De plus, dans un modèle utilisant VV comme agent pathogène, les LTe CD8⁺ IL-21R^{-/-} ont des fonctions cytotoxiques réduites^{351, 352}. A l'opposé, dans un modèle d'infection LCMV Armstrong, l'absence individuelle des signaux IL-21 dépendants n'altère pas la capacité des cellules effectrices à produire du Grz B^{98, 350}. Ainsi, afin de voir si les signaux IL-21 coopèrent avec l'IL-2 et l'IL-15 à l'acquisition des fonctions cytotoxiques, nous avons évalué l'expression du Grz B et de la capacité à dégranuler, via un marquage CD107a, à J7 post-infection dans la rate au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} (**Figure 27C**). Nous avons pu constaté que les niveaux de Grz B dans les LTe CD8⁺ P14

IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R $^{-/-}$ étaient plus faibles que dans les LTe CD8 $^{+}$ P14. De plus, les niveaux d'expression de Grz B des cellules P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R $^{-/-}$ sont également légèrement plus faibles que ceux des cellules P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (**Figure 27C**). En revanche, aucune différence n'a été constatée dans la capacité des LTe CD8 $^{+}$ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R $^{-/-}$ à dégranuler par rapport aux LTe CD8 $^{+}$ P14 et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ comme en atteste le marquage CD107a (**Figure 27C**).

L'ensemble de ces données suggère qu'une combinaison des signaux IL-2, IL-15 et IL-21 est requise à la production optimale de Grz B au sein des LTe CD8 $^{+}$ dans un modèle d'infection LCMV Armstrong. Cependant, une forte réduction des niveaux de Grz B ne veut pas forcément dire que les cellules P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R $^{-/-}$ sont incapables de contrôler une infection comme nous l'avons vu avec les LTe CD8 $^{+}$ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (**Figure 18**). Ainsi, un test de « killing » in vivo et une analyse des charges virales dans différents organes (rate, foie, rein) sont nécessaires afin de savoir si les cellules effectrices P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R $^{-/-}$ sont aptes à contrôler une infection LCMV Armstrong.

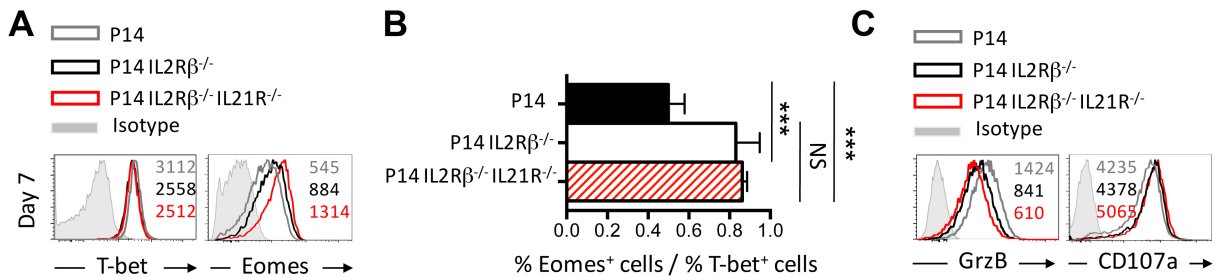


Figure 27 : Les signaux IL-2, IL-15 et IL-21 régulent conjointement l'expression de Eomes et du Grz B (A) Marquage intracellulaire de Eomes et T-bet dans les LTe CD8 $^{+}$ secondaires P14 (ligne grise), P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (ligne noire) et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL-21R $^{-/-}$ (ligne rouge) de la rate à J7 pi. L'isotype contrôle est indiqué en gris plein et les nombres correspondent aux MFI (n=3). (B) Ratio de la fréquence des cellules Eomes $^{+}$ sur celle des cellules T-bet $^{+}$ des LTe CD8 $^{+}$ P14 (barre noire), des P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (barre blanche) et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL-21R $^{-/-}$ (barre rouge) à J7 pi (n=3). (C) Expression intracellulaire de Grz B et CD107a dans les LTe CD8 $^{+}$ P14 (ligne grise), P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (ligne noire) et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL-21R $^{-/-}$ (ligne rouge) à J7 pi. L'isotype contrôle est indiqué en gris plein et les nombres correspondent aux MFI (n=3). (***) p<0.0005, NS p \geq 0.05, test t non-pairé).

2.2 Les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 coopèrent à l'homéostasie des LTm CD8⁺ de type T_{EM}

Au cours de cette section, nous souhaitons évaluer la contribution des signaux IL-21 sur le développement des LTm CD8⁺ en l'absence de signaux IL-2 et IL-15. En ce sens, nous avons comparé la génération de lymphocytes mémoires au sein des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} à celle des cellules P14 et des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} à J70 pi (**Figure 28**). Comme déjà observé lors de la section 1 de la partie résultat (**Figure 19**), le nombre de LTm CD8⁺ généré à J70 en l'absence de signaux IL2Rβ est significativement réduit dans la rate et dans la moelle osseuse (0,3.10⁶ LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} versus 1,1.10⁶ LTm CD8⁺ P14 dans la rate, p=0,04 ; 0,5.10⁴ LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} versus 9,7.10⁴ LTm CD8⁺ P14 dans la moelle osseuse, p=0,04) (**Figure 28A**). Cependant, nous avons mis en évidence que la délétion additionnelle de signaux IL-21 dépendants réduit significativement le nombre de LTm CD8⁺ générés au sein des cellules P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} par rapport aux cellules P14 et même par rapport aux cellules P14 IL2Rβ^{-/-} à J70 dans la rate et la moelle osseuse (0,05.10⁶ LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} versus 0,3.10⁶ LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} dans la rate, p=0,0007 ; 0,1.10⁴ LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} versus 0,5.10⁴ LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} dans la moelle osseuse, p=0,04) (**Figure 27A**). Ainsi, ces données suggèrent que l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21 agissent en synergie pour soutenir la génération et/ou la maintenance des LTm CD8⁺.

Les LTm CD8⁺ de la rate et de la moelle osseuse étant des populations hétérogènes constituées de T_{CM} et T_{EM}. Nous avons voulu voir si la réduction drastique du nombre de LTm CD8⁺ observée dans les cellules P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} par rapport aux cellules P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} affectait les deux sous-types de LTm CD8⁺ (**Figure 28B-D**). Nous avons donc quantifié les proportions et les nombres de T_{CM} et T_{EM} dans les populations cellulaires P14, P14 la section 1 de cette partie résultats (**Figure 20 et 21**), l'absence de signaux IL2Rβ conduit à une réduction significative de la fréquence des T_{EM} dans la rate (33% pour les cellules P14 versus 22,3% pour les P14 IL2Rβ^{-/-}, p=0,01, **Figure 28B-C**). A l'opposé, la proportion de T_{CM} est significativement plus élevée dans les LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} que dans les LTm CD8⁺ P14 (respectivement 76,6% versus 63,7%, p=0,0016). Nous montrons aussi que la fréquence de T_{EM} parmi les LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} est significativement plus

faible que celle des LTm CD8⁺ P14 (respectivement 8,1% versus 33%, p=0,0002, **Figure 28B-C**). De plus, nos résultats montrent que la proportion de T_{EM} est encore plus faible au sein des LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} que dans les LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} (respectivement 8,1% versus 22,3%, p=0,0005, **Figure 28B-C**). A l'opposé, la fréquence de T_{CM} dans les P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} est significativement plus élevée que celles des cellules P14 et des cellules IL2Rβ^{-/-} (respectivement 90,9% versus 63,7% versus 76,6%, **Figure 28B-C**). Nous avons également comparé les nombres de T_{EM} et de T_{CM} générés dans la rate en l'absence ou non de signaux IL2Rβ et IL21R dépendants (**Figure 28D**). Tel qu'attendu, les nombres de T_{CM} et T_{EM} sont significativement plus faibles dans les LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} que dans les LTm CD8⁺ P14 (**Figure 28D**). Nous avons également remarqué que les nombres de T_{CM} et T_{EM} sont significativement plus faibles dans les LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} que dans les LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} (**Figure 28D**). Enfin, nous avons observé que le nombre de T_{EM} a tendance à être plus réduit par l'absence additionnelle d'IL-21 que le nombre de T_{CM}. Ainsi, en l'absence des signaux IL-2, IL-15 et IL-21, la différenciation et/ou la maintenance des T_{EM} est réduite.

L'ensemble de ces données suggère que les trois cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 agissent en synergie pour soutenir l'accumulation des LTm CD8⁺ dans la rate et la moelle osseuse. De plus, nous montrons qu'une combinaison de signaux IL2Rβ et IL21R est essentielle afin de supporter la différenciation et/ou la maintenance des LTm CD8⁺ à phénotype T_{EM}. Nous aimerions quantifier le nombre de T_{EM} et T_{CM} à J100 pi dans les LTm CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} et les comparer à ceux du J70 pi. Nous pensons que les nombres de T_{CM} calculés à J70 et à J100 ne seront pas significativement différents. En revanche, nous croyons que les nombres de T_{EM} calculés à J70 et à J100 seront significativement différents. Cette donnée indiquera clairement que l'IL-21, en redondance de l'IL-2 et l'IL-15, contribue à la maintenance des T_{EM}.

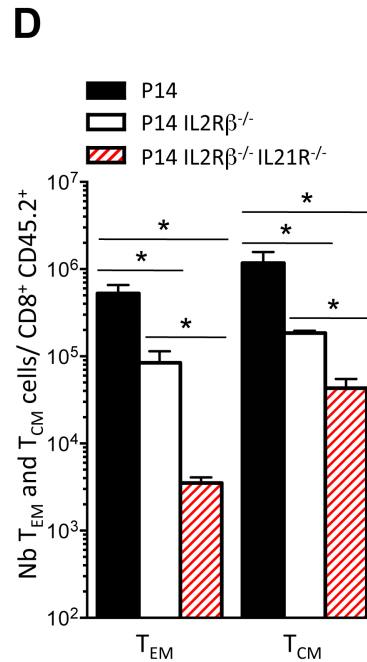
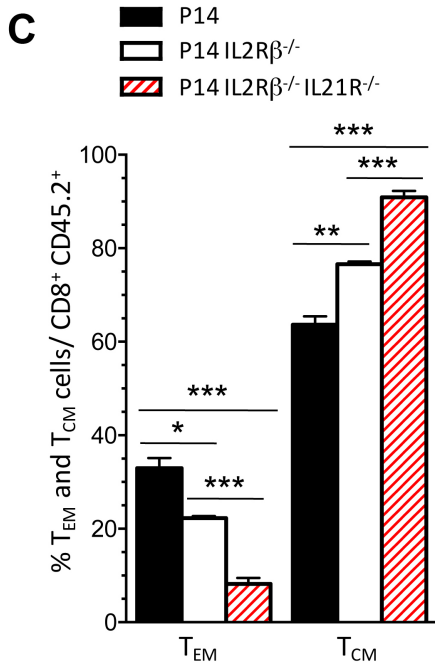
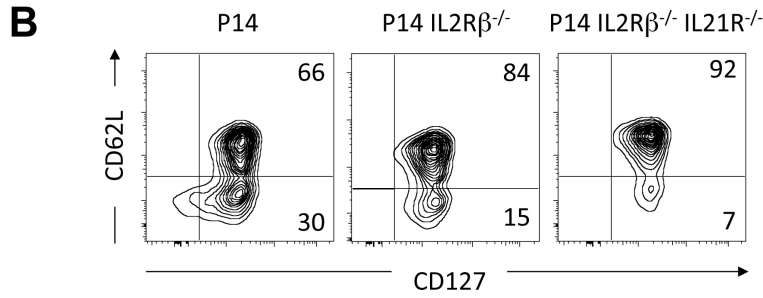
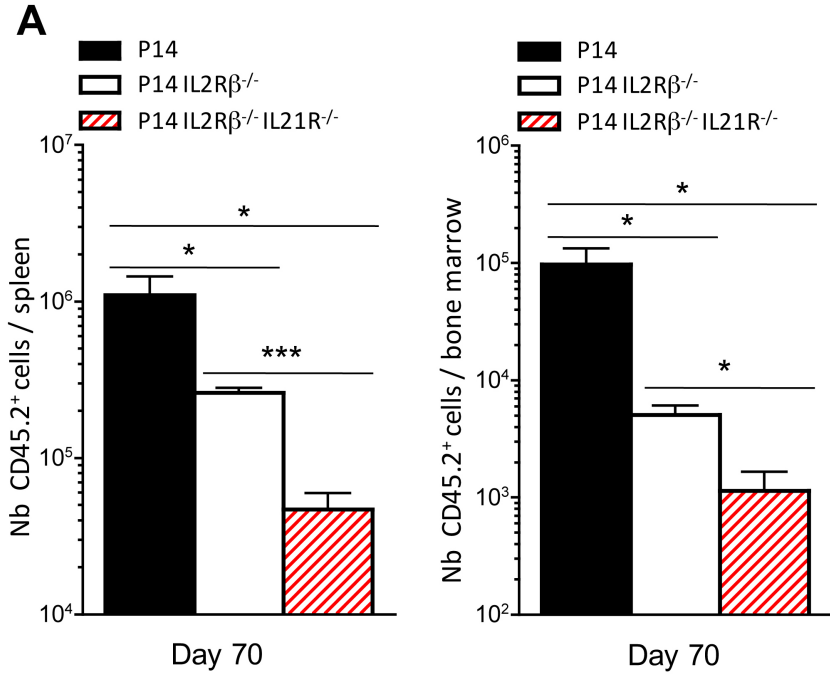


Figure 28 : Une combinaison des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 est à l'origine du développement des T_{EM}. (A) Nombre total de LTm CD8⁺ P14 (barres noires), P14 IL2Rβ^{-/-} (barres blanches) et P14 IL2Rβ^{-/-} IL-21R^{-/-} (barre rouge) dans la rate (à gauche) et la moelle osseuse (à droite) à J70 pi (n=3). (B) Expression de CD62L et CD127 sur les LTm CD8⁺ P14, P14 IL2Rβ^{-/-} et P14 IL2Rβ^{-/-} IL-21R^{-/-} de la rate à J70 pi. Les nombres indiquent les fréquences de cellules dans chaque quadrant (n=3). (C) Fréquence des T_{EM} et des T_{CM} parmi les P14 (barres noires), P14 IL2Rβ^{-/-} (barres blanches) et P14 IL2Rβ^{-/-} IL-21R^{-/-} (barre rouge) de la rate à J70 pi (n=3). (D) Nombres absolus de T_{EM} et de T_{CM} parmi les P14 (barres noires), P14 IL2Rβ^{-/-} (barres blanches) et P14 IL2Rβ^{-/-} IL-21R^{-/-} (barre rouge) de la rate à J70 pi (n=3). (* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005, test t non-pairé).

3. Impact des signaux IL2R β sur la migration des LTe CD8⁺ et sur le développement des T_{RM}

Mise en contexte

Nous avons vu dans les sections 1 et 2 de cette partie résultats qu'en l'absence de signaux IL2R β et IL-21R, les nombres de T_{EM} et T_{CM} étaient fortement réduits (**Figure 21 et 28**). De plus, nous avons suggéré que les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 agissait de manière combinée afin de promouvoir la différenciation et la maintenance des T_{EM} (**Figure 21 et 28**). Cependant, nous ne nous sommes pas encore intéressés à l'impact de ces trois cytokines sur les T_{RM}. En parallèle, nous avons constaté que la génération des MPECs ne nécessitait pas l'acquisition de ces mêmes signaux IL2R β et IL-21R (**Figure 15 et 25**). Etant donné que SLECs et MPECs proviennent de progéniteurs communs, les EECs²³¹, une telle distinction dans la nécessité des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 pour leur développement est très intrigante.

Plusieurs données fournies par la littérature actuelle supportent le fait que les cytokines IL-21 et IL-15 peuvent être impliquées, selon le contexte expérimental, dans l'homéostasie des T_{RM}. Une étude récente a montré que l'absence de signaux IL-21 résulte en une réduction du nombre de LT CD8⁺ dans les tissus non lymphoïdes (poumon, foie, rein, IE et LP) 160 jours après reconstitution de souris irradiées létalement avec des chimères de moelle osseuse contenant un mélange 1 pour 1 de PBMC IL-21R^{+/+} et IL-21R^{-/-415}. A l'opposé, il a été montré, dans la même étude, que dans le cadre d'une infection avec LCMV Armstrong, l'IL-21 n'était pas requise pour le maintien des T_{RM} dans l'épithélium intestinal⁴¹⁵. Un transfert adoptif de cellules P14 dans des souris naïves contrôles ou IL-15^{-/-} a montré que les T_{RM} de la rate sont beaucoup moins dépendants des signaux IL-15 pour leur survie que les T_{CM} et T_{EM} 60 jours après une infection LCMV Armstrong³⁸⁹. A l'opposé, le traitement avec un anti-IL-15+IL-15R de souris infectées avec HSV ou Influenza résulte en une réduction d'un facteur 3 du nombre de T_{RM} de la peau et des poumons après plus de 14 jours post-infection³⁹³. Finalement, il a été montré que les T_{RM} des tissus intestinaux (IELs et LP), issus de cellules P14 transférées dans des souris IL-15^{-/-}, n'avaient pas besoin de l'IL-15 ni pour leur prolifération homéostatique ni pour leur survie 60 jours après une infection LCMV Armstrong⁴¹². En raison des différences

expérimentales entre ces trois études (modèles murins et infectieux et localisation des T_{RM} étudiés), un rôle clair de l'IL-15 sur la maintenance des T_{RM} n'a pu être établi. De plus, aucune étude n'a étudié l'impact de l'IL-15 sur la migration vers les muqueuses des effecteurs. En effet, si l'absence de signaux IL-15 réduit la migration vers les muqueuses, cela pourrait conduire à une réduction du nombre de T_{RM} sans forcément affecter leur maintenance. L'IL-15 tout comme l'IL-21 est capable d'induire l'expression de marqueurs de migration à la surface de lymphocytes T $CD8^{+415, 417}$. Compte-tenu de ces données, nous émettons l'hypothèse que l'IL-15 module le développement et la maintenance des T_{RM} en régulant d'abord la migration de leurs progéniteurs mais également en assurant ensuite leur maintenance sur le long terme.

3.1 L'expression des marqueurs de migration intestinaux sur les LTe $CD8^{+}$ est transitoire et corrèle avec l'écotaxie des effecteurs vers les tissus intestinaux

La circulation des LTn $CD8^{+}$ est restreinte aux organes lymphoïdes secondaires, au sang et à la lymphe²⁰⁸. Cependant, la plupart des infections sont initiées dans les muqueuses²⁰⁹. Ainsi, les LTe $CD8^{+}$ activés doivent migrer dans ces sites infectieux afin d'éliminer complètement le pathogène de l'organisme. Une fois l'infection résolue dans les muqueuses, les LTe $CD8^{+}$ persistants vont se différencier en LTm $CD8^{+}$ résidents ou T_{RM} ³⁶⁴. Préciser les mécanismes et molécules qui contrôlent la migration des LTe $CD8^{+}$ vers les muqueuses est donc essentiel afin de mieux comprendre le développement des T_{RM} .

Une étude récente a établi, dans un modèle de transfert adoptif, que parmi les LTe $CD8^{+}$ P14 spléniques non endogènes, seuls les effecteurs précoces (entre 4 et 5 jours pi avec LCMV Armstrong) possédaient la capacité de migrer vers la muqueuse intestinale³⁷⁸. En effet, dans cet article, des LTn $CD8^{+}$ P14, des LTe $CD8^{+}$ P14 (4,5 et 7 jours pi.) et des LTm $CD8^{+}$ P14 (60 jours pi.) ont été isolés de la rate de souris infectées par tri cellulaire et réinjectés dans de nouvelles souris receveuses non infectées. Une journée après, les nouvelles souris receveuses ont été sacrifiées et le nombre ainsi que la localisation (rate, épithélium de l'intestin) des LT $CD8^{+}$ P14 adoptivement transférés ont été évalués. Les résultats ont montré que seuls les LTe $CD8^{+}$ P14 issus de rate de souris à 4,5 jours pi avaient migré vers l'épithélium intestinal (IE). Ces effecteurs précoces, contrairement aux LTn $CD8^{+}$, aux LTm

CD8⁺ et aux LTe CD8⁺ plus tardifs (jour 7 pi), présentaient une forte expression du marqueur de migration intestinale $\alpha 4\beta 7$. Ainsi, les auteurs de cette étude ont corrélé le « timing » d'expression avec la capacité à migrer vers l'épithélium intestinal. Cependant, il n'a pas été montré, qu'une fois dans l'épithélium intestinal, les LTe CD8⁺ P14 adoptaient un phénotype de lymphocytes résidents en réexprimant à leur surface la molécule CD103, marqueur de résidence des IELs (Intraepithelial Lymphocytes)^{211, 380} mais également en diminuant l'expression de $\alpha 4\beta 7$ ³⁸⁰.

Donc, avant d'évaluer l'impact des signaux IL-15 sur l'expression des marqueurs de migration vers les muqueuses intestinales dans un modèle LCMV Armstrong, nous avons voulu vérifier si les LTe CD8⁺ P14 migrant vers l'intestin présentaient une expression du marqueur de résidence CD103. Pour ce faire, nous avons adoptivement transféré 10⁵ LTn CD8⁺ P14 CD45.2⁺ à des souris hôtes C57BL/6 CD45.1.2⁺. 24h plus tard, les souris receveuses ont été infectées par voie intrapéritonéale avec 2.10⁵ PFU de LCMV Armstrong. L'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et de CCR9, deux marqueurs de migration vers l'intestin^{219, 220}, a été observée par cytométrie en flux à la surface des LTe CD8⁺ à différents temps post-infection (de J0 à J10 pi) (**Figure 29A-B**). Nous avons constaté que l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ sur les cellules P14 débute à J4, est maximale entre J5 et J6 et diminue de J7 à J10 (**Figure 29A-B**). Nos résultats démontrent également que le pic d'expression de CCR9 sur les cellules P14 se situe entre J4 et J6 pi (**Figure 29A**). Il sera cependant nécessaire d'évaluer l'expression de CCR9 sur les LTe CD8⁺ P14 de la rate à J4 pi afin de confirmer ce résultat. Ces données démontrent une fenêtre d'expression réduite des deux marqueurs de migration intestinaux ($\alpha 4\beta 7$ et CCR9) sur les LTe CD8⁺ de la rate. Cette fenêtre d'expression étant située entre 5 et 6 jours pi avec LCMV Armstrong. Ces résultats sont en accord avec ceux de Masopust montrant, dans le même modèle expérimental, que l'expression maximale d' $\alpha 4\beta 7$ sur les LTe CD8⁺ est située entre J4 et J5 pi.

En parallèle, dans le même modèle expérimental, nous avons évalué la cinétique d'apparition des LTe CD8⁺ P14 dans la LP en y quantifiant le nombre de LTe CD8⁺ P14 CD45.2⁺ (**Figure 29C**). Nous n'avons pu commencer à détecter des LTe CD8⁺ P14 dans la LP qu'à partir de J5 post-infection (**Figure 29C**). Cette apparition tardive des cellules P14 dans la LP est en accord non seulement avec le « timing » d'expression splénique d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9

mais également avec la littérature³⁷⁸. Ainsi, l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et de CCR9 apparaît comme un bon marqueur pour identifier les cellules qui migreront vers les tissus intestinaux. Il sera nécessaire, afin de confirmer cette hypothèse, d'évaluer la cinétique d'apparition des cellules P14 dans l'IE. Si celle-ci est similaire à celle de la LP, comme nous l'espérons, nous confirmerons, entre nos mains, que l'expression splénique d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 est un bon marqueur pour identifier les LTe CD8⁺ précoces migrant vers l'ensemble des muqueuses intestinales et pas seulement vers la LP.

Une fois dans les tissus intestinaux, les LTe CD8⁺ diminuent leur expression extracellulaire d' $\alpha 4\beta 7$ et induisent l'expression de CD103, intégrine permettant la maintenance des effecteurs dans ces tissus intestinaux^{378, 380}. Afin de voir si nos LTe CD8⁺ P14 ayant migrés vers les tissus intestinaux sont capables de s'y maintenir, nous avons évalué l'expression de CD103 et $\alpha 4\beta 7$ à J6 et J8 pi dans la rate, la LP et l'IE (**Figure 29D**). Nos résultats montrent que nos LTe CD8⁺ P14 de la LP et des IELs présentent une réduction de l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et une augmentation de l'expression CD103 à leur surface entre J6 et J8 pi (**Figure 29D**). En comparaison, nous avons remarqué une diminution de l'expression de $\alpha 4\beta 7$ dans la rate mais pas une augmentation de l'expression de CD103 (**Figure 29D**). Cette dernière donnée indique que l'expression de CD103 sur les LTe CD8⁺ P14 est liée à une localisation dans la LP et l'IE et non à une différenciation. Il serait également intéressant d'évaluer si l'expression de CCR9 décroît, comme celle d' $\alpha 4\beta 7$, une fois que les cellules ont migré dans les muqueuses intestinales.

Nos résultats démontrent que l'apparition des LTe CD8⁺ P14 à J5 dans la LP se corrèle avec la fenêtre d'expression des marqueurs de migration intestinaux $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sur les LTe CD8⁺ P14 spléniques. En ce sens nous sommes en accord avec la littérature³⁷⁸. De plus, nous montrons qu'après avoir migré dans les tissus épithéliaux, les LTe CD8⁺ P14 commencent à exprimer le marqueur de résidence CD103. Encore une fois, ce résultat est en accord avec la littérature³⁸⁰. L'ensemble de ces données montre que nous sommes capables de reproduire les résultats obtenus précédemment et que nous allons ainsi pouvoir caractériser l'impact des signaux IL-15 dépendants sur la migration des LTe CD8⁺ vers les tissus intestinaux sans aucun biais expérimental.

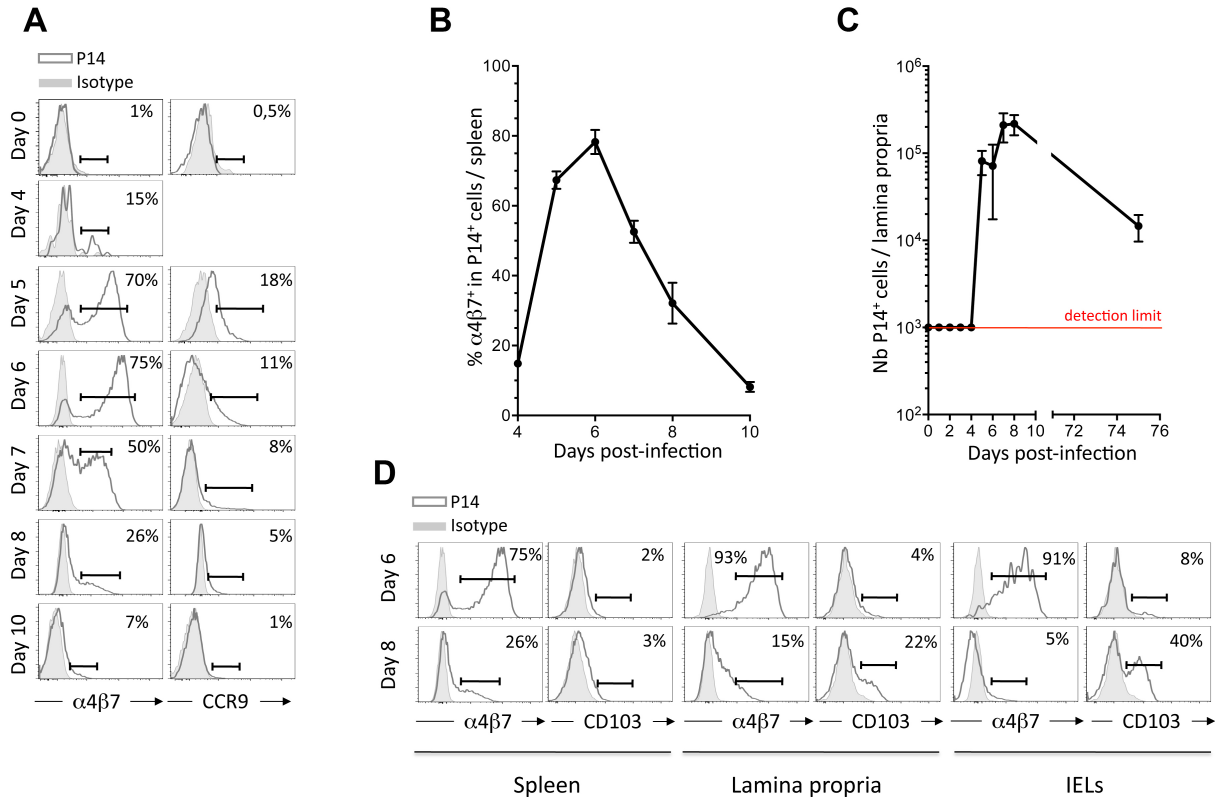


Figure 29 : L'expression des marqueurs de migration intestinaux est transitoire et corrèle avec l'apparition des LTe CD8⁺ P14 dans la lamina propria (A) et (B) Fréquences d'expressions d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sur les LTe CD8⁺ P14 de la rate à différent temps pi. Les nombres correspondent au pourcentage de cellules positives. Résultats représentatifs de six expériences indépendantes. (C) Nombres totaux de LTe CD8⁺ P14 dans la LP (n=2-3 souris par « time-point » provenant de deux expériences distinctes. La ligne rouge « detection limit » indique la limite en dessous de laquelle les cellules LTe CD8⁺ P14 ne sont pas détectables (D) Fréquences d'expressions d' $\alpha 4\beta 7$ et CD103 sur les LTe CD8⁺ P14 de la rate, de la LP et des IELs à J6 et J8 pi. Les nombres correspondent au pourcentage de cellules positives.

3.2 Les signaux IL2R β contrôlent l'expression des marqueurs de migration intestinale

Nous venons de voir que les fréquences de LTe CD8⁺ α 4 β 7⁺ et CCR9⁺ sont les plus importantes dans la rate entre J5 et J6 pi avec LCMV Armstrong (**Figure 29**). Nous venons également de constater que ces proportions maximales d'expression de ces marqueurs de migration corrélaient avec le « timing » d'apparition des LTe CD8⁺ dans la LP (**Figure 29**). Ainsi, l'expression d' α 4 β 7 et de CCR9 apparaît comme un bon marqueur pour identifier les cellules qui migreront vers les tissus intestinaux. Donc pour évaluer l'impact que les signaux IL-15 sur la migration des LTe CD8⁺ spléniques vers la LP et l'IE, nous avons décidé de quantifier l'expression des marqueurs α 4 β 7 et CCR9 dans des conditions où les signaux IL-15 sont abolis.

En ce sens, nous avons injecté 10⁵ LTn CD8⁺ P14 ou P14 IL2R β ^{-/-} CD45.2⁺ à des souris hôtes C57BL/6 CD45.1.2⁺. 24h plus tard, ces souris receveuses ont été infectées avec une dose standard de LCMV Armstrong (2.10⁵ PFU). L'expression de α 4 β 7 et CCR9 à la surface des LTe CD8⁺ spléniques, IL2R β déficients ou non, a été quantifiée de J5 à J10 pi (**Figure 30A**). Nos résultats montrent que, de J5 à J10, les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} présentent la même cinétique d'expression de α 4 β 7 et CCR9 que les LTe CD8⁺ P14 (**Figure 30A**). En effet, l'expression maximale de ces deux marqueurs de migration intestinaux, en l'absence de signaux IL2R β , se situe également à J5 pour diminuer jusqu'à être indétectable à J10 pi dans la rate (**Figure 30A**). Ce résultat suggère que les signaux IL2R β ne régulent pas la cinétique globale d'expression des marqueurs de migration intestinaux. Cependant, il est intéressant de constater que les fréquences d'expression de α 4 β 7 et CCR9 diffèrent en l'absence de signaux IL2R β dépendants à J5 et J7 pi (**Figure 30A-B**). Ainsi, pour la suite des analyses, nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'expression de α 4 β 7 et CCR9 uniquement à J5 et J7 pi. En ce qui concerne α 4 β 7, nous constatons qu'à J5 pi, la fréquence d'expression est significativement plus faible en l'absence des signaux IL2R β (72,2% de cellules α 4 β 7⁺ parmi les LTe CD8⁺ P14 versus 58,7% de cellules α 4 β 7⁺ au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-}, p=0,0024, **Figure 30B**). Cette donnée suggère que les signaux IL2R β favorisent l'expression à J5 du marqueur α 4 β 7 à la surface des LTe CD8⁺. Cependant, nos résultats montrent également

qu'à J7 la proportion de LTe CD8⁺ α4β7⁺ est significativement plus élevée en l'absence de signaux IL2Rβ (49,08% de cellules α4β7⁺ parmi les LTe CD8⁺ P14 versus 63% de cellules α4β7⁺ au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-}, p=0,0078, **Figure 30B**). Cette donnée suggère que les signaux IL2Rβ participent à la diminution de l'expression d'α4β7 à la surface des LTe CD8⁺ entre J5 et J7 pi. Ceci est notamment confirmé par la réduction significative de la fréquence de cellules α4β7⁺ dans les LTe CD8⁺ P14 entre J5 et J7 pi (72,2% de cellules α4β7⁺ parmi les LTe CD8⁺ P14 à J5 versus 49,08% de cellules α4β7⁺ au sein des LTe CD8⁺ P14 à J7 pi, p=0,0001, **Figure 30B**). Alors qu'à l'opposé, les proportions de cellules α4β7⁺ dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} ne sont pas significativement différentes entre J5 et J7 pi (58,7% de cellules α4β7⁺ parmi les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} à J5 versus 63% de cellules α4β7⁺ au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} à J7 pi, p=0,3, **Figure 30B**). Ainsi, ces données sur le marqueur α4β7 suggèrent que les signaux IL2Rβ sont requis pour l'expression maximale à J5 de ce marqueur de migration intestinale mais de J5 à J7, ces mêmes signaux induisent la diminution de l'expression d'α4β7 à la surface des LTe CD8⁺. En ce qui concerne CCR9, nous constatons qu'à J5 pi, la fréquence d'expression n'est pas significativement différente en l'absence des signaux IL2Rβ (21,8% de cellules CCR9⁺ parmi les LTe CD8⁺ P14 versus 26,2% de cellules CCR9⁺ au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-}, p=0,06, **Figure 30B**). Cependant, une tendance nette se dégage et avec plus de souris, il est fort probable que nous démontrerions une expression significativement supérieure de CCR9 à J5 sur les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} par rapport aux LTe CD8⁺ P14. A J7 pi, nous n'avons là encore pas constaté de différence significative au niveau des fréquences de CCR9⁺ entre LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} (respectivement 5,2% de cellules CCR9⁺ versus 17,02% de cellules CCR9⁺, p=0,11, **Figure 30B**). Même si le résultat n'est pas significatif, une tendance permet d'émettre l'hypothèse que, comme avec α4β7, les signaux IL2Rβ participent à la diminution de l'expression de CCR9 à la surface des LTe CD8⁺ entre J5 et J7 pi. Le fait qu'il y ait une réduction significative de la fréquence de cellules CCR9⁺ dans les LTe CD8⁺ P14 entre J5 et J7 pi (21,8% de cellules CCR9⁺ parmi les LTe CD8⁺ P14 à J5 versus 5,2% de cellules CCR9⁺ au sein des LTe CD8⁺ P14 à J7 pi, p=0,0001, **Figure 30B**) est un argument qui vient soutenir cette tendance. De plus, les proportions de cellules CCR9⁺ dans les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} ne sont pas significativement différentes entre J5 et J7 pi (26,2% de cellules CCR9⁺ parmi les

LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} à J5 versus 17,02% de cellules CCR9⁺ au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} à J7 pi, p=0,3, **Figure 30B**). Ces données suggèrent que que les signaux IL2Rβ limite l'expression de CCR9 à J5 pi puis de J5 à J7 pi sur les LTe CD8⁺ de la rate.

Nos données montrent clairement que les signaux IL2Rβ dépendants diminuent l'expression des marqueurs de migration α4β7 et CCR9 sur la surface des LTe CD8⁺ entre J5 et J7 pi dans la rate. Cela pourrait suggérer que les signaux IL2Rβ dépendants sont à l'origine de l'arrêt de la migration vers les tissus intestinaux entre J5 et J7 pi. Cependant, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de prouver ce point. Il serait notamment intéressant, à J5 et J7 pi, d'isoler par tri cellulaire les LTe CD8⁺ P14, IL2Rβ déficients ou non, α4β7⁺ CCR9⁺ d'un côté et les α4β7⁻ CCR9⁻ d'un autre. Une fois triés, nous pourrions transférer les LTe CD8⁺ dans des souris naïves et 24h après le transfert observer la localisation des LTe CD8⁺ α4β7⁺ CCR9⁺ ou α4β7⁻ CCR9⁻. Nous nous attendons à ce que les LTe CD8⁺ P14 α4β7⁺ CCR9⁺, IL2Rβ déficients ou non, migrent vers la LP et l'IE. Ce résultat confirmerait que les cellules α4β7⁺ CCR9⁺ de notre modèle migrent bien vers les tissus intestinaux. De plus cela, indiquerait que la réduction d'expression de α4β7 et CCR9 engendrée par les signaux IL2Rβ limite la migration des LTe CD8⁺.

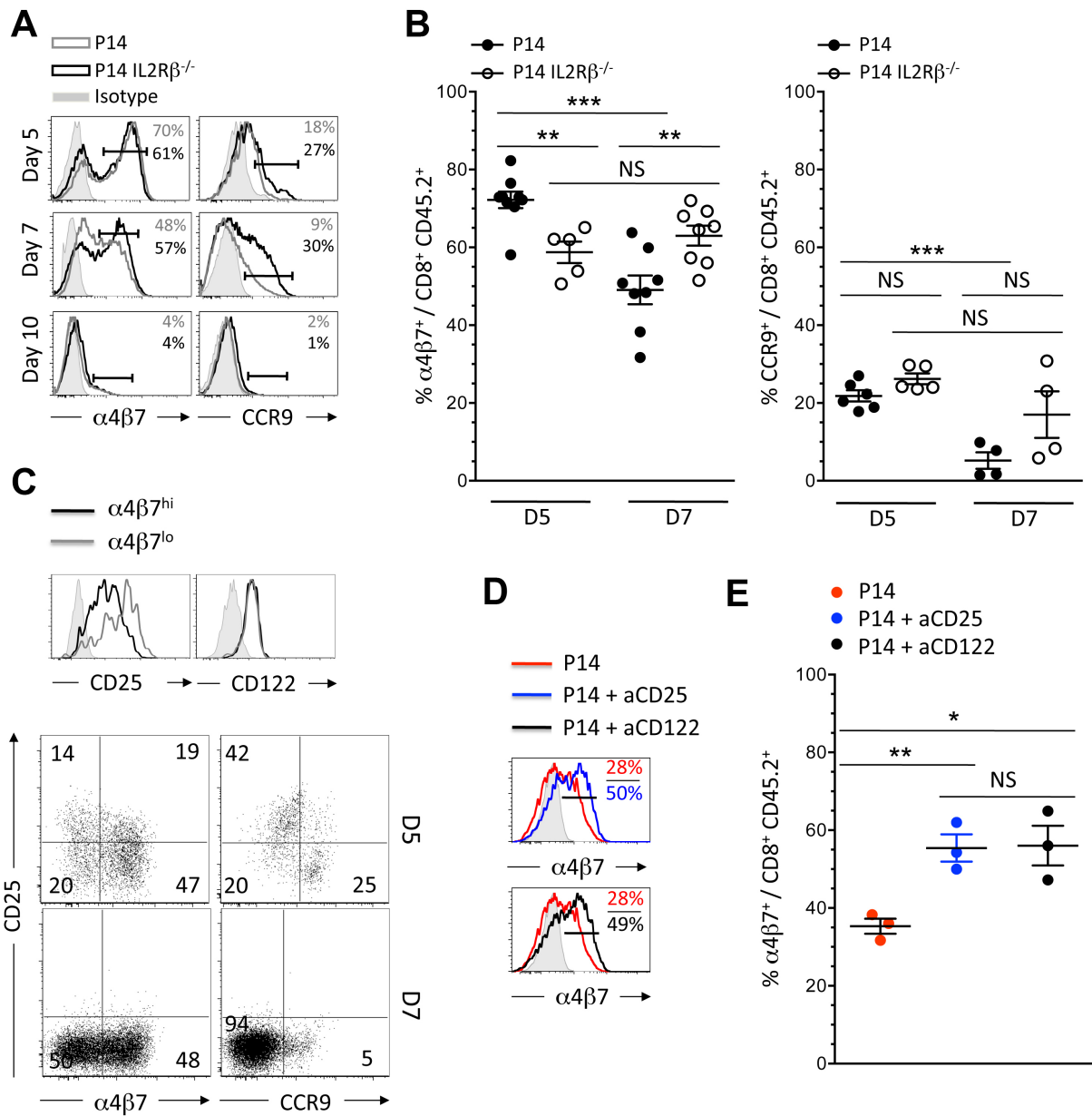


Figure 30 : Les signaux IL2R β régulent l'expression des marqueurs de migration intestinale (A) Fréquences d'expressions d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sur les LTe CD8⁺ P14 (ligne grise) et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (ligne noire) de la rate à J5, J7 et J10 pi. Les nombres correspondent au pourcentage de cellules positives. Résultats représentatifs de trois expériences indépendantes. (B) Histogramme indiquant les fréquences de cellules $\alpha 4\beta 7^{+}$ et CCR9⁺ parmi les LTe CD8⁺ P14 (rond noirs) et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (ronds blancs) de la rate à J5 et J7 pi (résultats cumulés de 5 expériences différentes, n=4 à 8 souris par groupe). (C) Expression extracellulaire de CD25 et CD122 (en haut) sur les LTe CD8⁺ P14 $\alpha 4\beta 7^{hi}$ (ligne grise) et $\alpha 4\beta 7^{lo}$ (ligne noire) de la rate à J5 pi. Expression de CD25, $\alpha 4\beta 7$, CCR9 et CD103 (en bas) sur les LTe CD8⁺ P14 à J5 et J7 pi dans la rate. Résultats représentatifs de trois expériences indépendantes. (D) et (E) Des souris C57BL/6 CD45.1.2⁺ naïves ont été traitées avec 200 μ g d'anti-CD25 (7D4) ou 200 μ g d'anti-

CD122 (TM- β 1) ou de LTF-2 (anticorps contrôle) en intrapéritonéal tout les deux jours de J-1 avant l'injection des LTn CD8⁺ P14 jusqu'à J6 après l'infection et/ou la réinfection. Comme dans la Figure 14, les souris C57BL/6 CD45.1.2⁺ naïves receveuses reçoivent 10⁵ P14 et sont infectées le lendemain avec 2.10⁵ PFU de LCMV Armstrong. (D) Fréquences d'expressions d' α 4 β 7 sur les LTe CD8⁺ P14 non traitées (ligne rouge) ou traités avec un anti CD25 (ligne bleue) ou traités avec un anti CD122 (ligne noire) à J7 post-infection dans la rate. L'isotype est indiqué en gris plein. Les chiffres indiquent les proportions de cellules α 4 β 7⁺ (n=3). (E) Histogramme indiquant les fréquences de cellules α 4 β 7⁺ parmi les LTe CD8⁺ P14 (rond rouges), les LTe CD8⁺ P14 traités avec un anti-CD25 (ronds bleus) et les LTe CD8⁺ P14 traités avec un anti-CD122 (ronds noirs) à J7 pi dans la rate (n=3). (* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005, NS>0,05 test t non-pairé).

Nous avons vu dans la section 2 de l'introduction que les signaux IL2R β transmettent les signaux à la fois de l'IL-2 mais également de l'IL-15. Ainsi, nous ne pouvons dire si la réduction d'expression de α 4 β 7 et CCR9 observée sur les LTe CD8⁺ P14 entre J5 et J7 pi est dépendante de l'IL-2, l'IL-15 ou les deux (**Figure 30B**). De la même manière, nous ne pouvons conclure si c'est l'IL-2 ou l'IL-15 qui induit une expression maximale de α 4 β 7 à J5 sur les LTe CD8⁺ (**Figure 30B**). Vu que la migration des LTe CD8⁺ vers les tissus intestinaux s'effectue entre J5 et J6 pi dans notre modèle, nous avons voulu identifier laquelle des deux cytokines (ou les deux) réduit l'expression de α 4 β 7 entre J5 et J7 pi. Ainsi, afin de déterminer précisément l'influence individuelle de l'IL-2 et de l'IL-15 sur la diminution des pourcentages de cellules α 4 β 7⁺ entre J5 et J7 pi, nous avons quantifié l'expression de CD25 et CD122 parmi les cellules α 4 β 7⁺ et α 4 β 7⁻ à J5 post-infection (**Figure 30C**). Nous avons remarqué que les cellules α 4 β 7⁺ présentent des niveaux de CD25 plus faibles que les cellules α 4 β 7⁻ (**Figure 30C, panel du haut**). Nous n'avons en revanche constaté aucune différence d'expression de CD122 entre α 4 β 7⁺ et α 4 β 7⁻ (**Figure 30C, panel du haut**). Pour compléter ces datas, nous avons montré que les LTe CD8⁺ P14 CD25⁺ de la rate à J5 n'expriment que peu ou pas les marqueurs de migrations intestinaux α 4 β 7 et CCR9 (**Figure 30C, panel du bas**). Ces données suggèrent que ce sont les signaux IL-2 et non IL-15 qui induisent une réduction des fréquences de cellules α 4 β 7⁺ et/ou CCR9⁺ de J5 à J7 sur les LTe CD8⁺. Afin de confirmer ces résultats, nous avons décidé de faire une expérience où les signaux, soit IL-2 soit IL-2 et IL-15, seraient bloqués de J0 à J7 pi. Nous avons donc injecté 10⁵ LTn CD8⁺ P14 ou P14 IL2R β ^{-/-} CD45.2⁺ à des souris hôtes C57BL/6 CD45.1.2⁺. 24h plus tard, ces souris receveuses ont été infectées avec une dose standard de LCMV Armstrong (2.10⁵ PFU). De J-1 avant l'infection à J6 pi, des

souris receveuses ont été traités ou non avec, soit un anti-CD25 ou un anti-CD122 (**Figure 30D-E**). Nous avons ensuite quantifié les fréquences de LTe CD8⁺ α 4 β 7⁺ à J7 pi dans les souris traitées ou non avec un anticorps bloquant (**Figure 30D-E**). Le blocage des signaux IL-2 dépendants augmente le pourcentage de cellules P14 α 4 β 7⁺ de 35% à 55,4% (p=0,0074, **Figure 30D-E**). En revanche, le blocage des signaux CD122 ne montre pas d'accroissement de la proportion de cellules P14 α 4 β 7⁺ à J7 par rapport au blocage des signaux CD25 (respectivement 56,03% versus 55,4% de cellules α 4 β 7⁺, p=0,92, **Figure 30D-E**).

Ainsi, nos données suggèrent que l'IL-2 semble être la cytokine qui diminue l'expression du marqueur de migration intestinale α 4 β 7 sur les LTe CD8⁺. L'IL-15, de son côté, n'apparaît pas comme impliquée dans la migration des effecteurs LTe CD8⁺ vers les tissus intestinaux. Nous n'avons pour le moment pas procédé à ces mêmes analyses sur l'expression de CCR9 mais il sera indispensable de le faire dans de futures expériences.

3.3 Les signaux IL-2 limitent l'expression des marqueurs de migration et de résidence intestinales

Nous venons de mettre en évidence *in vivo* que les signaux IL-2 semblent diminuer l'expression d' α 4 β 7 sur les LTe CD8⁺ de J5 à J7 pi. Afin de voir, si cet effet de l'IL-2 est direct, nous avons testé *in vitro* son impact sur l'expression des marqueurs de migration α 4 β 7 et CCR9 mais également sur le marqueur de résidence intestinale CD103. Nous avons stimulé, dans du RPMIc, 2.10⁴ P14 naïfs avec 2.10⁴ cCD chargées avec 0,1 μ M de peptide GP₃₃₋₄₁ dans une plaque 96 puits à fond conique. Après 48h de stimulation, les cellules P14 activées ont été récoltées, regroupées et lavées avec du RPMIc. Elles ont ensuite été déposées en nombres égaux dans différents puits d'une plaque 96 puits à fond plat. Les puits ont reçus ou non de l'IL-2 à diverses concentrations (0,1 U/mL ou 5 U/mL). Dans le but d'induire l'expression d' α 4 β 7 et CCR9 sur les LT CD8⁺ activés *in vitro*, les cellules ont été mises en culture, 48h après la stimulation initiale avec de l'acide rétinoïque (RA) à 500 nM^{421, 422}. Afin de maintenir, les LT CD8⁺ activés en prolifération et ce 48h après leur stimulation, une dose de peptide GP₃₃₋₄₁ (0,1 μ M) est rajoutée au milieu de culture. 96h après la stimulation et 48h après l'ajout ou non d'IL-2 et/ou de RA, l'expression extracellulaire de α 4 β 7, CCR9, CD103 et CD25 est quantifiée sur les P14. Nous avons remarqué que plus la concentration d'IL-2 dans le milieu

de culture augmente, plus la fréquence d' $\alpha 4\beta 7$ sur les cellules P14 diminue (57% de cellules $\alpha 4\beta 7^+$ pour une concentration de 0,1U/mL versus 27% de cellules $\alpha 4\beta 7^+$ pour une concentration de 5U/mL d'IL-2, **Figure 31A**). En ce qui concerne CCR9, on retrouve également une réduction, même si moins forte, de la fréquence de cellules P14 CCR9⁺ lorsque l'on augmente la concentration d'IL-2 (85% de cellules $\alpha 4\beta 7^+$ pour une concentration de 0,1U/mL versus 74% de cellules $\alpha 4\beta 7^+$ pour une concentration de 5U/mL d'IL-2, **Figure 31A**). Finalement, il est fort intéressant de constater que lorsque la concentration d'IL-2 augmente, la fréquence de cellules P14 CD103⁺ diminue (48% de cellules CD103⁺ pour une concentration de 0,1U/mL versus 15% de cellules CD103⁺ pour une concentration de 5U/mL d'IL-2, **Figure 31A**). L'ensemble de ces données *in vitro* confirme 1) que l'IL-2 diminue l'expression des marqueurs de migration $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 mais aussi l'expression du marqueur de résidence CD103, 2) que l'IL-2 exerce son effet de manière directe. Le fait que l'IL-2 diminue l'expression de CD103 suggère que cette cytokine peut également agir sur la résidence des LTe CD8⁺ dans les tissus intestinaux. Ainsi, l'IL-2 peut potentiellement agir *in vivo* sur les effecteurs en limitant leur migration mais également en réduisant leur faculté à se maintenir dans les tissus intestinaux.

Les résultats que nous avons décrit dans les **Figures 30 et 31A** ont été obtenus avec des LT CD8⁺ transgéniques transférés adoptivement à des souris naïves ou cultivés *in vitro*. Nous avons voulu observer si ces résultats étaient encore valides si l'on étudiait uniquement l'expression des marqueurs de migration intestinale sur des LTe CD8⁺ endogènes (**Figure 31B-C**). Pour ce faire, nous avons infecté 4 souris C57BL/6 avec 2.10^5 PFU de LCMV Armstrong. A J4 pi, les ces souris ont été sacrifiées et leurs rates prélevées. 1/6 de chaque rate a été mis en culture *ex vivo* dans du RPMiC. Dans le milieu de culture a été rajouté ou non de l'IL-2 (5 U/mL) et de RA (500 nM). Du peptide GP₃₃₋₄₁ (0,1 μ M) a été rajouté afin de maintenir les LTe CD8⁺ en prolifération. Les fréquences d'expression d' $\alpha 4\beta 7$ sur les LTe CD8⁺ CD44^{élevé} ont été quantifiées selon les différentes conditions après 48h de mise en culture *ex vivo* (**Figure 31B-C**). Tel qu'attendu, l'ajout d'IL-2 réduit la fréquence de cellules CD8⁺ CD44^{élevé} $\alpha 4\beta 7^+$ dans la condition Pep (peptide)+IL-2 par rapport à la condition où il y avait seulement du peptide d'ajouté (respectivement 13,98% de cellules $\alpha 4\beta 7^+$ versus 63,83% de cellules $\alpha 4\beta 7^+$, p=0,0001, **Figure 31B-C**). De la même manière, l'ajout d'IL-2 réduit la

fréquence de cellules CD8⁺ CD44^{élevé} α4β7⁺ dans la condition Pep+IL-2+RA par rapport à la condition où il y avait Pep+RA (respectivement 58,65% de cellules α4β7⁺ versus 74,68% de cellules α4β7⁺, p=0,0001, **Figure 31B-C**).

Nos données, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, montrent que l'IL-2 est la cytokine qui induit la diminution de l'expression des marqueurs de migration intestinale entre J5 et J7 pi à la surface des LTe CD8⁺. De plus, nous avons montré qu'*in vitro*, l'IL-2 peut également réduire l'expression du marqueur de résidence CD103. Ces résultats suggèrent un nouveau rôle de l'IL-2 dans l'homéostasie des LTe CD8⁺. Nous pensons que l'IL-15 était capable de réguler l'expression des marqueurs de migration vers les tissus intestinaux. Pour le moment nos données ne semblent pas indiquer que l'IL-15 est capable de contrôler l'expression d'α4β7. Cependant, d'autres expériences sont nécessaires afin de confirmer ces résultats. Il serait notamment intéressant d'effectuer une expérience *in vitro* et *in vivo* similaire à celle de la **Figure 31** en utilisant l'IL-15 plutôt que l'IL-2. Nous pourrions alors définitivement conclure sur l'impact de l'IL-15 sur l'expression des marqueurs de migration intestinale.

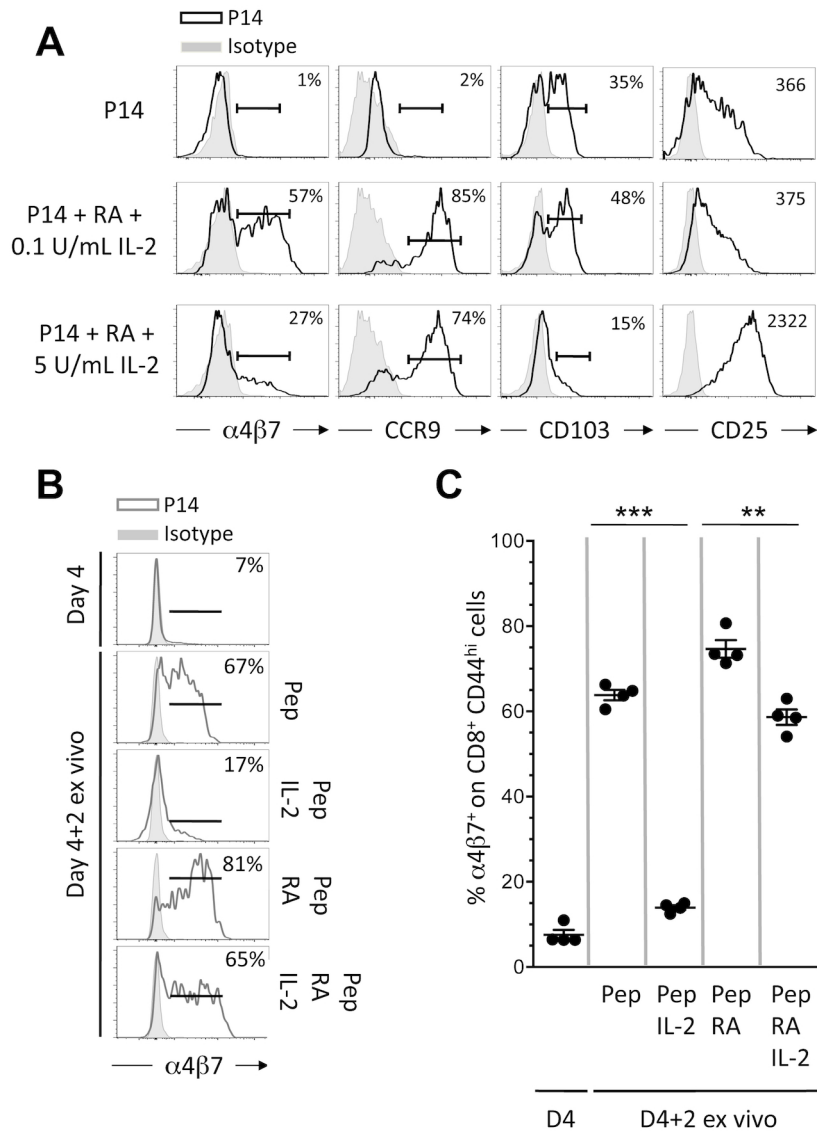


Figure 31 : Les signaux IL-2 limitent l'expression des marqueurs de migration intestinale sur les LTn CD8⁺. (A) 2.10^4 LTn CD8⁺ P14 ont été stimulés *in vitro* avec 2.10^4 cCD chargées avec du peptide GP₃₃₋₄₁ (0,1 μ M). 48h après l'activation des LT CD8⁺ P14, les lymphocytes ont été lavés, regroupés et redistribués dans des nouveaux puits de culture. A ces puits ont été rajoutés ou non de l'IL-2 (0,1 ou 5 U/mL) et de l'acide rétinoïque (RA) (500 nM). Du peptide GP₃₃₋₄₁ (0,1 μ M) a été rajouté afin de maintenir les LT CD8⁺ activés en prolifération. Les expressions de CXCR3, $\alpha 4\beta 7$, CCR9, CD103 et CD25 ont été évaluées selon les conditions. Les nombres correspondent au pourcentage de cellules positives ou à la MFI pour chaque marqueur. Résultats représentatifs de quatre expériences. (B) et (C) Quatre souris C57BL/6 naïves ont été infectées avec 2.10^5 PFU LCMV Armstrong. A J4 pi, ces souris ont été sacrifiées et leurs rates prélevées. 1/6 de chaque rate a été mis en culture *ex vivo* dans du RPMIc. Dans le milieu de culture a été rajouté ou non de l'IL-2 (5 U/mL) et de l'acide rétinoïque (RA) (500 nM). Du peptide GP₃₃₋₄₁ (0,1 μ M) a été rajouté afin de maintenir les LTn CD8⁺ en prolifération. Les fréquences d'expression d' $\alpha 4\beta 7$ sur les LTn CD8⁺ CD44^{élevé} ont été quantifiées selon les différentes conditions après 48h de mise en culture. Les nombres

correspondent au pourcentage de cellules positives pour $\alpha 4\beta 7$. (** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, NS $> 0,05$ test t non-pairé).

3.4 Les signaux IL2R β contrôlent l'expression des marqueurs de migration intestinale sur les EECs et les SLECs

Les SLECs ont été décrits comme des cellules à courte durée de vie et destinées à mourir alors que les MPECs seraient plus les précurseurs des futurs LTm CD8^{+225, 230}. Cette distinction doit toutefois être nuancée car de l'apoptose a également été observée dans les MPECs¹⁸⁵ et il n'est pas exclu que certains SLECs deviennent des LTm CD8⁺⁴²⁶. Il est important de noter que les LTm CD8⁺ décrits lors des études traitant du devenir des SLECs et MPECs ont été identifiés dans des organes lymphoïdes (majoritairement la rate) et ne permettant de distinguer que les T_{CM} et les T_{EM}. En effet, il n'a aucunement été fait mention des T_{RM} dans ces études. Ainsi, nous ne savons pas si les MPECs, les SLECs voir même les EECs contiennent des progéniteurs de T_{RM}. Il est donc pertinent et nécessaire d'évaluer s'il existe des précurseurs de T_{RM} au sein des trois types d'effecteurs (EECs, SLECs et MPECs). Pour ce faire, nous avons étudié l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 à la surface des différents sous-types de LTe CD8⁺ à J5 et J7 pi avec LCMV Armstrong (**Figure 32**).

Nous avons vu dans les sections 1 et 2 de cette partie résultats que les cytokines signalisant via IL2R β soutenaient l'expansion et la différenciation des SLECs à J7 pi (**Figure 15, 16 et 26**). Nous nous sommes donc demandé si l'augmentation d'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9, observée en l'absence de signaux IL2R β , à J7 pi (**Figure 30**) n'était pas juste une conséquence d'une différenciation accrue d'un sous-type d'effecteurs (MPECs, SLECs) exprimant plus $\alpha 4\beta 7$ et CCR9. Il serait également possible que les signaux IL2R β limitent la différenciation d'un sous-type d'effecteurs (MPECs, SLECs) exprimant moins $\alpha 4\beta 7$ et CCR9. Ainsi, afin de répondre à ces questions, nous avons observé l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 à la surface de sous-types de LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} à J5 et J7 pi (**Figure 32**).

Nous avons premièrement observé les fréquences de EECs, SLECs et MPECs dans la rate parmi les LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2R β ^{-/-} de J5 à J15 pi (**Figure 32A**). Nous avons pu ainsi quantifier les proportions des trois sous-types d'effecteurs LTe CD8⁺, IL2R β déficients ou non, au moment où les marqueurs $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sont exprimés (**Figure 32A**). Nous avons pu remarquer qu'à J5 pi, nous n'avons que des SLECs et des EECs et aucune différence n'est

observable entre les proportions de SLECs ou EECs P14 et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (**Figure 32A**). Ces données montrent également que les MPECs apparaissent plus tardivement, à J7 pi, ce qui est en accord avec la littérature²³⁰. De plus, tel qu'attendu, nous voyons que de J7 à J15 les proportions de SLECs P14 IL2R $\beta^{-/-}$ sont plus faibles que celles des SLECs P14 (**Figure 32A**). A l'opposé, là encore tel qu'attendu, les fréquences de MPECs sont toujours plus élevées dans les LTe CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ que dans les LTe CD8⁺ P14 (**Figure 32A**). L'ensemble de ces données suggère qu'au moins les proportions des SLECs et MPECs sont distinctes à partir de J7 pi en présence ou en absence de signaux IL2R β (**Figure 32A**). Ainsi, il apparaît donc important d'évaluer l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sur les différents sous-types d'effecteurs IL2R β déficients ou non.

Nous avons donc quantifié les fréquences de EECs, SLECs et MPECs $\alpha 4\beta 7^{+}$ et CCR9⁺ à J5 et J7 pi parmi les LTe CD8⁺ IL2R β déficients ou non (**Figure 32B-C**). Nous n'avons évidemment évalué les fréquences de MPECs $\alpha 4\beta 7^{+}$ et CCR9⁺ qu'à J7 pi car cette population effectrice n'est pas présente à J5 pi. Nos résultats montrent qu'à J5 pi, les EECs et les SLECs expriment $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sur les LTe CD8⁺ P14 (**Figure 32B-C**). Cependant, il est fort intéressant de noter que plus de 90% des SLECs expriment $\alpha 4\beta 7$ alors que la fréquence de EECs exprimant $\alpha 4\beta 7$ est de 60%. Nous n'avons en revanche pas constaté de différence de fréquences de cellules CCR9⁺ entre les SLECs et les EECs à J5 pi (**Figure 32B-C**). Ces données suggèrent que les SLECs J5 ainsi qu'une partie des EECs J5 vont migrer vers les tissus intestinaux. Il serait intéressant de confirmer cette suggestion en isolant par tri cellulaire les SLECs J5 et les EECs J5 $\alpha 4\beta 7^{+}$ et $\alpha 4\beta 7^{-}$ parmi les LTe CD8⁺ P14. Une fois triées, ces trois populations cellulaires devront être transférées dans des souris naïves et leur localisation évaluée 24h après le transfert. Nous nous attendons à ce que tout les SLECs J5 et les EECs J5 $\alpha 4\beta 7^{+}$ aient migré vers les tissus intestinaux mais que les EECs J5 $\alpha 4\beta 7^{-}$ soient restés dans la rate.

Tel qu'attendu, les fréquences de SLECs et EECs $\alpha 4\beta 7^{+}$ et CCR9⁺, parmi les LTe CD8⁺ P14, diminuent de J5 à J7 pi (**Figure 32B-C**). Cependant, ces fréquences restent plus élevées que celles MPECs LTe CD8⁺ P14 à J7 (**Figure 32B-C**). Ces résultats montrent que les trois sous-types d'effecteurs LTe CD8⁺ (EECs, SLECs et MPECs) présentent des fréquences d'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 distinctes, ce qui suggèrent que ces populations cellulaires ne

vont pas migrer de la même façon vers les tissus intestinaux. Il serait pertinent de confirmer cette donnée en étudiant la migration des SLECs, MPECs et EECs J7 de la même façon que nous l'avons proposé pour les EECs et SLECs J5. Cette donnée est vraiment importante à obtenir car si nous montrons que les MPECs de la rate ne migrent pas vers la LP ou l'IE, ceci suggèrera que ce sont dans les SLECs ou dans les EECs que se situent les progéniteurs des T_{RM} . Dans ce cas là, deux hypothèses sont envisageables. La première est que les SLECs, étant donné leur forte expression d' $\alpha 4\beta 7^+$ à J5, contiennent les progéniteurs des T_{RM} . La seconde hypothèse est que les EECs qui expriment $\alpha 4\beta 7^+$ à J5 et qui vont migrer vers les tissus intestinaux se différencieront dans la LP et l'IE en MPECs qui deviendront les progéniteurs des T_{RM} . Une étude récente supporte cette seconde hypothèse en démontrant qu'une fois dans les tissus intestinaux, ce sont les MPECs qui survivent au long terme et non les SLECs³⁸².

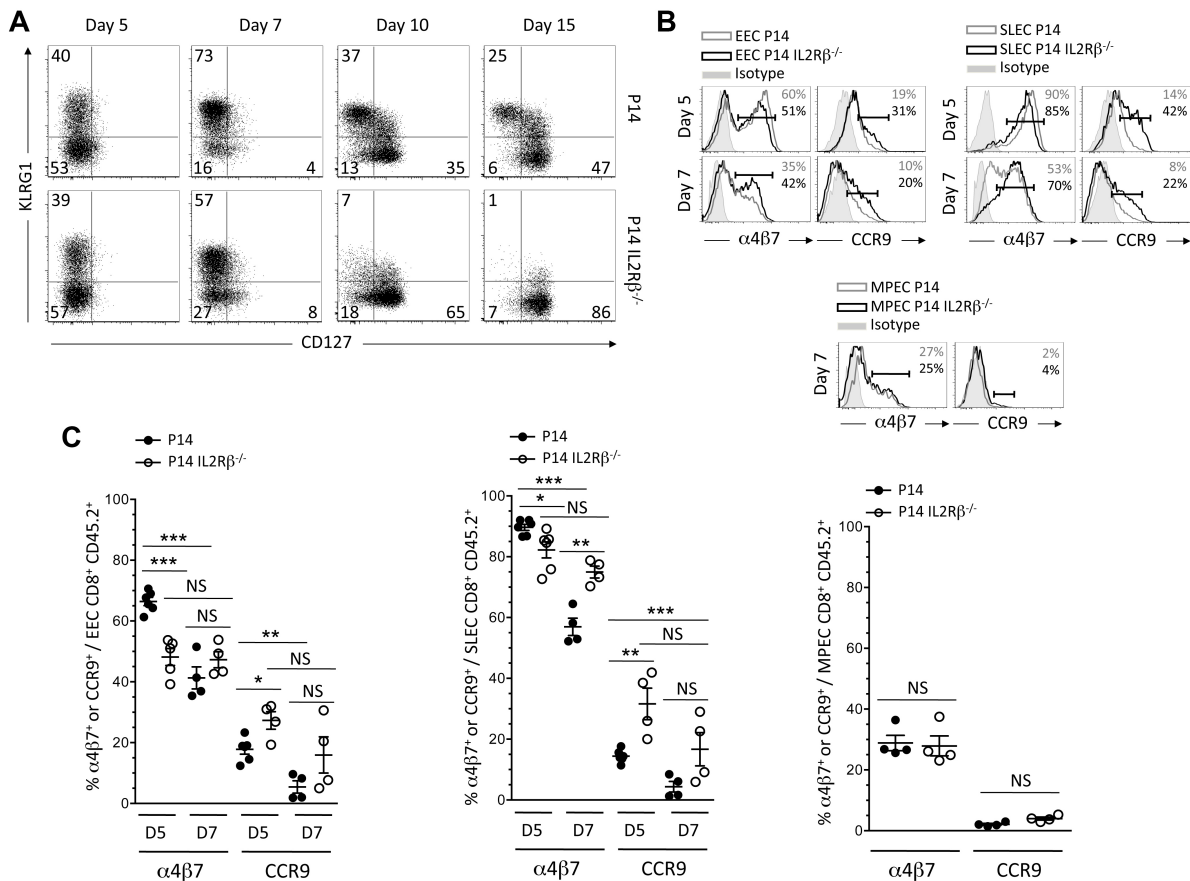


Figure 32 : Les signaux IL-2 limitent l'expression des marqueurs de migration intestinale sur les EECs et les SLECs. (A) Fréquences des EECs, SLECs et MPECs, basées sur les expressions distinctes de CD127 et KLRG1, au sein des LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} de la rate à différents temps pi. Les nombres indiquent les fréquences de cellules dans chaque quadrant. Résultats représentatifs de trois expériences avec n=4-10 souris par génotype par « time-point ». (B) Expression des marqueurs indiqués à la surface des EECs, SLECs et MPECs P14 (ligne grise) et P14 IL2Rβ^{-/-} (ligne noire) de la rate à J5 et J7 pi. Les nombres correspondent au pourcentage de cellules positives pour chaque marqueur (résultat représentatif de deux expériences, n=4-5 souris par génotype). (C) Fréquences individuelles de cellules α4β7⁺ et CCR9⁺ parmi les EECs, SLECs et MPECs P14 (cercle noir) et P14 IL2Rβ^{-/-} (cercle blanc) de la rate à J5 et J7 pi. Données compilées de deux expériences (n=4-5 souris par génotype). (* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005, NS>0,05 test t non-pairé).

Nous venons de voir que les EECs, SLECs et MPECs ne présentent pas les mêmes fréquences d'expression d'α4β7 et CCR9 à leurs surfaces à J5 et à J7. Ainsi, compte-tenu des différences de proportions de SLECs et MPECs entre les LTe CD8⁺ P14 et P14 IL2Rβ^{-/-} à J7 pi (**Figure 32A**), il était nécessaire d'évaluer la fréquence de EECs, SLECs et MPECs α4β7⁺ et CCR9⁺ en présence ou en absence de signaux IL2Rβ (**Figure 32B-C**). Nous avons constaté que l'absence de signaux IL2Rβ limite significativement la fréquence de EECs α4β7⁺ à J5 pi (48,16% de EECs P14 IL2Rβ^{-/-} α4β7⁺ versus 66,42% de EECs P14 α4β7⁺, p=0,0002, **Figure 32C**). De la même manière, la proportion de SLECs α4β7⁺ à J5 pi est significativement plus faible en l'absence de signaux IL2Rβ (82,25% de EECs P14 IL2Rβ^{-/-} α4β7⁺ versus 89,65% de EECs P14 α4β7⁺, p=0,02, **Figure 32C**). Cette donnée fait écho à la **Figure 30B** où nous avons remarqué que l'absence de signaux IL-2 et IL-15 réduisait significativement la fréquence de LTe CD8⁺ α4β7⁺ à J5 pi. Ici, nous confirmons donc ce résultat et montrons donc en plus que les signaux IL2Rβ sont nécessaires à l'expression d'α4β7 sur les EECs et les SLECs à J5 pi. En ce qui concerne CCR9, nous avons noté que la fréquence de EECs CCR9⁺ est significativement plus élevée à J5 en l'absence de signaux IL2Rβ (27,30% de EECs P14 IL2Rβ^{-/-} CCR9⁺ versus 89,65% de EECs P14 CCR9⁺, p=0,01, **Figure 32C**). De la même manière, la proportion de SLECs CCR9⁺ à J5 pi est significativement plus élevée en l'absence de signaux IL2Rβ (31,60% de EECs P14 IL2Rβ^{-/-} CCR9⁺ versus 14,42% de EECs P14 CCR9⁺, p=0,0036, **Figure 32C**). Cette donnée fait écho à la **Figure 30B** où nous avons remarqué que l'absence de signaux IL-2 et IL-15 avait tendance à augmenter la fréquence de LTe CD8⁺ CCR9⁺ à J5 pi. Ici, nous confirmons donc ce résultat et montrons en plus que les

signaux IL2R β limitent l'expression de CCR9 sur les EECs et les SLECs à J5 pi. Nos données suggèrent qu'à J5 pi, l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sont régulées par les mêmes signaux. Cependant, là où les signaux IL2R β semblent promouvoir l'expression d' $\alpha 4\beta 7$, ces mêmes signaux limitent l'expression de CCR9.

Nous avons vu dans la **Figure 30B**, que les signaux IL2R β diminuaient l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 entre J5 et J7 pi. Nous nous sommes donc demandés si ce résultat était une conséquence des proportions altérées de MPECs et de SLECs en absence de signaux IL2R β à J7 pi (**Figure 32A**). Pour répondre à cette question, nous avons donc évalué l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sur les EECs, SLEC et MPECs, IL2R β déficients ou non, à J7 pi (**Figure 32B-C**). Nous avons remarqué, à J7 pi, que la fréquence de EECs P14 IL2R $\beta^{-/-}$ $\alpha 4\beta 7^{+}$ n'était pas significativement différente de celle des EECs P14 $\alpha 4\beta 7^{+}$ (47,28% de EECs P14 IL2R $\beta^{-/-}$ $\alpha 4\beta 7^{+}$ versus 41,30% de EECs P14 $\alpha 4\beta 7^{+}$, $p=0,23$, **Figure 32C**). De la même manière, nos résultats montrent, à J7 pi, que la fréquence de EECs P14 IL2R $\beta^{-/-}$ CCR9 $^{+}$ n'était pas significativement différente de celle des EECs P14 CCR9 $^{+}$ (15,95% de EECs P14 IL2R $\beta^{-/-}$ CCR9 $^{+}$ versus 5,44% de EECs P14 CCR9 $^{+}$, $p=0,14$, **Figure 32C**). Ces données semblent donc montrer que les signaux IL2R β n'ont pas d'impact sur les fréquences de EECs $\alpha 4\beta 7^{+}$ et CCR9 $^{+}$ à J7 pi. Cependant, nous constatons tout de même une tendance montrant des proportions plus élevées de ces deux marqueurs de migration en l'absence de signaux IL2R β . Il est fort probable qu'avec des expériences supplémentaires, nous prouvions que les signaux IL2R β limitent l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sur les EECs entre J5 et J7 pi. Le fait que les fréquences de EECs P14 $\alpha 4\beta 7^{+}$ ou CCR9 $^{+}$ soient significativement plus faibles à J7 qu'à J5 pi vient soutenir cette théorie (**Figure 32C**). En ce qui concerne les SLECs, nous avons remarqué, à J7 pi, que la fréquence de SLECs P14 IL2R $\beta^{-/-}$ $\alpha 4\beta 7^{+}$ était significativement plus élevée que celle des SLECs P14 $\alpha 4\beta 7^{+}$ (74,98% de SLECs P14 IL2R $\beta^{-/-}$ $\alpha 4\beta 7^{+}$ versus 56,95% de SLECs P14 $\alpha 4\beta 7^{+}$, $p=0,002$, **Figure 32C**). De la même manière, nos résultats montrent, à J7 pi, que la fréquence de SLECs P14 IL2R $\beta^{-/-}$ CCR9 $^{+}$ était significativement plus élevée que celle des SLECs P14 CCR9 $^{+}$ (16,67% de SLECs P14 IL2R $\beta^{-/-}$ CCR9 $^{+}$ versus 4,35% de SLECs P14 CCR9 $^{+}$, $p=0,04$, **Figure 32C**). Nos résultats prouvent donc que les signaux IL2R β limitent l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 sur les SLECs entre J5 et J7 pi. Le fait que les

fréquences de SLECs P14 $\alpha 4\beta 7^+$ ou $CCR9^+$ soient significativement plus faibles à J7 qu'à J5 pi vient, encore une fois, soutenir notre argument (**Figure 32C**). En ce qui concerne les MPECs, nous n'avons constaté à J7 aucune différence significative dans les proportions de MPECs $\alpha 4\beta 7^+$ ou $CCR9^+$ entre MPECs P14 ou P14 $IL2R\beta^{-/-}$ à J7 pi (**Figure 32C**).

L'ensemble des données de cette **Figure 32** montre que les EECs, SLECs et MPECs présentent un profil d'expression des marqueurs de migration intestinale distinct aussi bien à J5 qu'à J7 pi. Cette information permet de compléter un aspect non étudié pour le moment sur les différents sous-types de LTe $CD8^+$, c'est à dire leur profil de migration. Bien évidemment, il faudra effectuer des expériences de transfert adoptif de EECs, SLECs et MPECs $\alpha 4\beta 7^+$ et $\alpha 4\beta 7^-$ afin de pouvoir conclure sur la capacité à migrer dans les tissus intestinaux de ces différents sous-types de LTe $CD8^+$. Nous montrons également que l'augmentation des fréquences de LTe $CD8^+ \alpha 4\beta 7^+$ et $CCR9^+$, en l'absence de signaux $IL2R\beta$ et entre J5 et J7 pi, n'est pas une conséquence d'une différenciation altérée. En effet, nous montrons que les signaux $IL2R\beta$ contrôlent l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et $CCR9$ uniquement sur les SLECs et les EECs. Toutefois, des expériences complémentaires sont à effectuer afin de prouver significativement notre point en ce qui concerne les EECs.

3.5 L'absence de signaux IL2R β réduit le développement de lymphocytes résidents mémoires (T_{RM})

Au cours de la section 1 de cette partie résultats, nous avons démontré que l'absence de signaux IL2R β dépendants résultait en une diminution du nombre de LTm CD8⁺ (**Figure 19**). De plus, la maintenance des T_{EM} était altérée et la différenciation des T_{CM} était accélérée (**Figure 20-21**). Ces données prouvent que les signaux IL2R β ont une influence majeure sur plusieurs types de LTm CD8⁺. En ce qui concerne les T_{RM}, l'impact de ces cytokines n'a été que peu ou pas évalué. En effet, à ce jour, aucune étude n'a été faite sur une potentielle implication de l'IL-2 dans le développement et le maintien des T_{RM}. Pour l'IL-15, il semblerait que les T_{RM} de la rate n'en requièrent pas pour leur maintien³⁸⁹ alors que ceux de la peau et des poumons en soient dépendants dans une infection HSV³⁹⁰. Ces informations suggèrent que les T_{RM} dans les organes non lymphoïdes requièrent l'IL-15 pour leur maintenance. A l'opposé, il a été montré que les T_{RM} des tissus intestinaux (IE et LP), issus de P14 transférés dans des souris IL-15^{-/-}, n'avaient pas besoin de l'IL-15 ni pour leur prolifération homéostatique ni pour leur survie⁴¹². Afin de réconcilier ces rapports contradictoires, nous avons étudié le développement des T_{RM} dans la LP en l'absence de signaux IL2R β (**Figure 33**).

Nous avons remarqué que 75 jours après l'infection, le nombre de T_{RM} P14 IL2R β ^{-/-} dans la LP était plus faible que celui des P14 contrôles (**Figure 33A**). En effet, malgré une absence de significativité, on constate une nette tendance à une réduction de l'accumulation des T_{RM} en absence des signaux IL-2 et IL-15 combinés (1,46.10⁴ pour les LTm CD8⁺ P14 versus 5.10³ pour les LTm CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-}, p=0,2, **Figure 33A**). Comme décrit, dans la section 5 dans l'introduction, parmi les T_{RM}, il existe au moins deux phénotypes, des T_{RM} CD103⁺ et des T_{RM} CD103⁻³⁹². Il était donc intéressant d'observer si l'abrogation des signaux IL2R β modifiait les proportions de ces deux types de T_{RM}. Nous avons constaté qu'en absence de signaux IL-2 et IL-15, les fréquences de T_{RM} CD103⁺ dans la LP est accrue alors qu'à l'opposé celle des CD103⁻ diminue (**Figure 33B-C**).

L'ensemble de ces données suggère, même si d'autres expériences sont nécessaires, que les signaux IL2R β sont requis pour le développement des T_{RM} des tissus intestinaux. De

plus, l'absence de signaux IL-2 et IL-15 modifie la composition du « pool » de T_{RM} en favorisant l'accumulation des T_{RM} $CD103^+$.

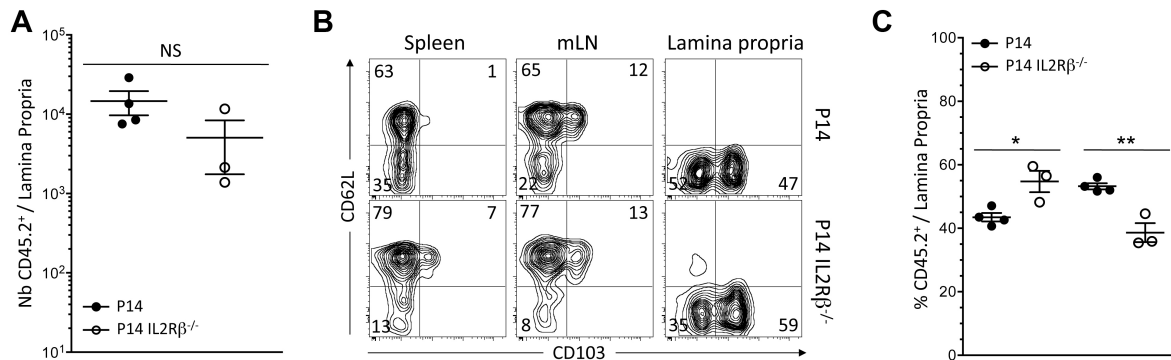


Figure 33 : Les signaux IL-2 et IL-15 conditionnent l'accumulation optimale des T_{RM} de la LP et en particulier des T_{RM} $CD103^+$. (A) Nombre absolu de T_{RM} P14 (cercles noirs) et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (cercles blancs) dans la LP à J75 pi. Chaque cercle symbolise une souris individuelle (n=3 souris par génotype) (B) Expression de CD62L et CD103 sur les LTm CD8⁺ P14 et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ de la rate, des mLN et de la LP à J75 pi. Les nombres indiquent les fréquences de cellules dans chaque quadrant (n=3). (C) Fréquence des T_{RM} $CD103^+$ et $CD103^-$ parmi les cellules P14 (cercles noirs) et P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (cercles blancs) de la LP à J75 pi (n=3). (* p < 0.05, ** p < 0.005, NS p \geq 0.05, test t non-pairé).

Chapitre 4 : DISCUSSION

Préambule

Nous avons vu au cours de l'introduction que plusieurs cytokines de la famille γ_c étaient individuellement impliquées dans le développement de réponses humorales⁹⁴ et cellulaires¹⁰⁷. En effet, comme nous l'avons détaillé au cours des sections 4 et 6 de l'introduction, plusieurs aspects du développement des LTe et LTm CD8⁺ (expansion, différenciation, survie, maintenance et acquisition des fonctions effectrices) sont modulés par certaines cytokines dépendantes de la chaîne γ_c telles que l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21^{98, 102, 265, 309, 310}.

Il est toutefois intéressant de noter qu'à travers la littérature, plusieurs indices suggèrent que les cytokines IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21 sont capables d'agir en synergie et ainsi d'avoir des rôles complémentaires ou redondants sur le développement d'une réponse immune LT CD8⁺. Premièrement, ces quatre molécules partagent la même chaîne γ sur leur récepteur spécifique^{85, 87}. De plus, les cytokines IL-2 et IL-15 possèdent également la même chaîne IL2R β ¹²⁸. Deuxièmement, ces quatre cytokines utilisent des voies de signalisation similaires (JAK/STAT et PI3K/Akt)^{334, 336, 342, 343, 349}. Troisièmement, les structures quaternaires respectives des complexes IL-2/IL-2R et IL-15/IL-15R sont quasiment identiques³⁵⁵. Fonctionnellement parlant, quelques études ont mis en lumière des rôles combinés des cytokines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21 dans le développement d'une réponse LT CD8⁺. En effet, il a notamment été montré *in vitro* que l'IL-15 et l'IL-21 agissent en synergie afin d'augmenter la prolifération des LT CD8⁺ activés^{99, 348}. De plus, toujours *in vitro*, l'IL-7 et l'IL-21 collabore à une sécrétion optimale des cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α) ainsi qu'à l'acquisition des fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺ à l'encontre de cellules tumorales⁴¹⁶. *In vivo*, en absence combinée de signaux IL-2 et IL-15, la proportion de SLECs, 8 jours après une infection LCMV Armstrong, est significativement plus faible qu'en absence individuelle de l'une ou l'autre cytokine⁹⁷. Finalement, une délétion individuelle d'IL-2, IL-7, IL-15 ou IL-21 ne conduit qu'à une réduction partielle et non complète du nombre de LTm CD8⁺ alors qu'une abrogation totale des signaux γ_c dépendants résulte en une absence totale de

LTm CD8^{+97, 98, 107, 203, 230, 246, 309, 333, 339, 351, 352}. L'ensemble de ces données suggère donc des fonctions synergiques et redondantes de ces cytokines dans la génération d'une réponse immune LT CD8⁺.

Ainsi, au cours de cette thèse, je me suis attaché à mettre en évidence les rôles redondants et synergiques des cytokines de la famille γ_c dans une réponse immune LT CD8⁺ à un pathogène viral (LCMV Armstrong). Pour ce faire, nous avons utilisé deux modèles murins novateurs qui abrogent spécifiquement les signaux IL2R β et IL21R sur des LT CD8⁺ possédant un TCR transgénique P14. Ces deux modèles permettent, contrairement aux modèles IL2R $\alpha^{-/-}$, IL-15^{-/-} et IL-21R^{-/-}⁹⁷, d'étudier l'impact de l'absence de signaux combinés IL-2, IL-15 et IL-21, au cours d'une infection LCMV Armstrong, uniquement sur les LT CD8⁺ P14 sans affecter l'influence de ces cytokines sur d'autres types cellulaires. En effet, ces modèles empêchent la signalisation via IL2R $\beta\gamma$, ce qui n'est pas le cas des approches expérimentales utilisant des souris ou cellules IL2R $\alpha^{-/-}$. De plus, nos modèles, préservent aussi la survie, la maturation et la présentation antigénique des cCD, connues pour être altérées dans des hôtes IL-15^{-/-}^{356, 357}.

Au cours de cette discussion, nous détaillerons l'impact combiné des trois cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sur plusieurs phases de la réponse immune LT CD8⁺ à l'encontre de l'agent viral LCMV Armstrong. Premièrement, nous décrirons les influences synergiques ou redondantes de l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21 sur différents aspects de la réponse effectrice primaire. Deuxièmement, nous commenterons les effets résultants d'une délétion combinée des signaux IL-2, IL-15 et IL-21 sur la génération et la maintenance des LTm CD8⁺ et de leurs sous-types. Troisièmement, nous discuterons de l'importance des signaux IL-2 et IL-15 sur le développement d'une réponse secondaire. Finalement, nous détaillerons de la nécessité des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sur la fonctionnalité des LTe CD8⁺ primaires et secondaires.

1. Réponse effectrice primaire

1.1 Expansion

Après la reconnaissance de leur Ag spécifique sur des cCD matures, les LTn CD8⁺ s'activent et prolifèrent de façon intensive (entre 15 et 20 divisions) afin de générer un nombre de LTe CD8⁺ suffisant au développement optimal de la réponse immune^{27, 29, 130}. Les implications individuelles des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 dans ces processus ont été décrites à plusieurs reprises à travers la littérature. L'IL-2 apparaît comme nécessaire à l'expansion terminale des LTe CD8⁺^{97, 203, 325, 326}. En effet, suite à une infection avec LCMV Armstrong, l'expansion primaire des LTe CD8⁺ endogènes est trois fois moins importante dans la rate de souris IL-2^{-/-} par rapport aux souris contrôles au pic de la réponse (Jour 7)³²⁵. De plus, l'absence de signalisation via la chaîne IL2R α conduit à une réduction d'un facteur 2 du nombre de LTe CD8⁺ au pic de la réponse et cela dans le même contexte infectieux^{97, 203}. Des résultats similaires ont été rapportés dans des études portant sur l'expansion des LTe CD8⁺ IL2R α ^{-/-} dans le cadre d'infection avec *Lm* ou VV³²⁷. En ce qui concerne l'IL-15, son rôle dans le développement de l'expansion des LTe CD8⁺ demeure controversée et semble dépendre du modèle expérimental^{104, 105, 106, 333, 339, 340}. En effet, il semble que dans des infections LCMV ou *Lm*^{105, 106, 333}, l'IL-15 n'ait pas d'impact alors que dans une infection VSV ou dans un modèle de vaccination via des cCD, l'IL-15 apparaît comme indispensable à la prolifération terminale des LTe CD8⁺^{104, 339}. Finalement, des études *in vitro* ont montré que l'IL-21 agit en synergie avec l'IL-15 pour augmenter la prolifération des LT CD8⁺ activés^{99, 348}. *In vivo*, dans une infection LCMV Armstrong, l'absence de l'IL-21 ou de son récepteur n'altère pas l'expansion primaire^{98, 350}, alors que dans un modèle utilisant VV comme agent pathogène, les LTe CD8⁺ IL-21R^{-/-} présentent une prolifération réduite^{99, 351, 352}.

A travers nos expériences, nous confirmons que dans un modèle LCMV Armstrong, l'expansion initiale (de J0 à J5) n'est pas altérée par l'absence de signaux IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants (**Figure 14 et 26**). En effet, les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} présentent des niveaux de prolifération et de mortalité similaires aux LTe CD8⁺ P14 entre J0 et J5 (**Figure 14**). Ces résultats étaient attendus car notre laboratoire avait préalablement démontré, dans le même

contexte expérimental, que la délétion complète de signaux γ_c dépendants n'affectait pas l'expansion initiale des LTe CD8⁺¹⁰⁷.

Bien que l'expansion initiale (de J0 à J5) des LTe CD8⁺ ne soit pas dépendante des signaux combinés IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants, ce n'est pas le cas de l'expansion terminale (de J5 à J7). En effet, en l'absence de signaux IL2R β , nous avons constaté une réduction significative du nombre d'effecteurs LTe CD8⁺ au pic de la réponse (**Figure 14 et 26**). Cette expansion réduite est la conséquence à la fois d'une prolifération moindre et d'un défaut de survie (**Figure 14**). Ces données sont en accord avec la littérature où plusieurs équipes ont préalablement montré que l'IL-2 soutien l'expansion terminale des LTe CD8^{+97, 326, 327, 423}. Cependant, nous avons également clarifié l'impact de l'IL-15 sur cette phase de la réponse en montrant que les signaux IL-15 dépendants étaient nécessaires à l'expansion terminale des effecteurs LT CD8⁺ (**Figure 14**). En dehors de sa capacité à supporter la survie des LTe CD8⁺ à la fin de la phase d'expansion^{102, 340}, le rôle de l'IL-15 portait à débat. En effet, certains auteurs suggéraient que cette cytokine supportait l'expansion des LTe CD8^{+339, 340} alors que d'autres soutenaient que non^{105, 106}. De plus, l'impact des cytokines IL-2 et IL-15 sur l'expansion des effecteurs n'est pas seulement redondant, il est également additif. En effet, dans un modèle d'infection LCMV Armstrong, une déficience en signaux IL-2 réduit le nombre de LTe CD8⁺ d'un facteur 2^{97, 203} alors que la déficience combinée en signaux IL-2 et IL-15 réduit le nombre de LTe CD8⁺ d'un facteur 3,5 (**Figure 14**). Enfin, nous avons aussi montré que la cytokine IL-21 possède également un rôle synergique à celui des cytokines IL-2 et IL-15 dans la promotion d'une expansion terminale des effecteurs (**Figure 26**). En effet, l'expansion des LTe CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R $^{-/-}$ est réduite d'un facteur 2 par rapport à celle des P14 IL2R $\beta^{-/-}$ au pic de la réponse (**Figure 26**). En ce qui concerne le rôle de l'IL-21 sur l'expansion terminale des LTe CD8⁺ en absence de signaux IL2R β , nous devons encore déterminer si l'IL-21 soutien la survie, la prolifération ou les deux. De façon intéressante, il a été montré, *in vitro*, que l'IL-21 agit en synergie avec l'IL-15 afin de promouvoir la prolifération de LT CD8⁺ activés⁹⁹. Par ailleurs, une autre équipe a également montré que l'IL-21 pouvait être un facteur de survie, toujours *in vitro*, à des LT CD8⁺ activés³⁴⁹. Nous

émettons donc l'hypothèse que l'IL-21, en absence de signaux IL2R β , est capable de supporter à la fois la prolifération et la survie des LTe CD8 $^+$.

L'ensemble de ces données suggère donc que les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 contribuent de manière additive à l'expansion terminale des LTe CD8 $^+$. Ainsi, l'impact de la délétion des signaux d'une de ces cytokines sur l'expansion terminale peut-être compensé par les signaux des deux autres. Ceci pourrait expliquer pourquoi, en l'absence de signaux IL-21, aucune réduction significative du nombre de LTe CD8 $^+$ au pic de la réponse n'est observée dans un modèle d'infection LCMV Armstrong identique au notre⁹⁸. L'expansion initiale des LTe CD8 $^+$ apparaît comme étant indépendante de ces trois cytokines de la famille γ_c . Ceci est cohérent avec la notion que l'expansion des LTe CD8 $^+$ est initiée par la reconnaissance de l'antigène et par les cytokines inflammatoires présentes lors du « priming »^{130, 176, 177, 427}. Finalement, nous supposons que les cytokines inflammatoires collaborent avec les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 afin de promouvoir une expansion soutenue des LTe CD8 $^{+35, 176, 177}$.

1.2 Développement des SLECs et MPECs au sein des LTe CD8 $^+$

Comme nous l'avons détaillé au cours de la section 3 de l'introduction, la population de LTe CD8 $^+$ est hétérogène. Il existe au moins quatre types d'effecteurs différents distingués par leurs expressions de KLRG1 et CD127^{185, 225}. Parmi ces quatre types de LTe CD8 $^+$, trois d'entre eux présentent un intérêt particulier. Premièrement, les EECs (KLRG1^{faible} CD127^{faible}) qui sont considérés comme des cellules progénitrices aptes à générer des SLECs (KLRG1^{élevé} CD127^{faible}) et des MPECs (KLRG1^{faible} CD127^{élevé})²³¹. Deuxièmement, les SLECs qui constituent une population effectrice à durée de vie limitée et destinée à mourir^{185, 225, 230}. Troisièmement, les MPECs qui représentent une catégorie cellulaire contenant les précurseurs des futurs LTm CD8 $^{+185, 230, 231}$. Au cours de la réponse effectrice LT CD8 $^+$, plusieurs facteurs influencent la prolifération, la survie des LTe CD8 $^+$ ainsi que le développement des SLECs et des MPECs. En effet, un contact prolongé avec l'antigène oriente la différenciation des LTe CD8 $^+$ vers un phénotype SLEC^{225, 428}. A l'opposé, une stimulation antigénique limitée favorise le développement des MPECs^{225, 428}. Par ailleurs, la présence de cytokines inflammatoires telles que l'IL-12 ou les IFNs de type I lors de la réponse effectrice est associée à une

augmentation du développement des SLECs^{35, 184, 185, 250}. Finalement, les cytokines dépendantes de la famille γ_c , en particulier les cytokines IL-2, IL-7 et IL-15, sont aussi connues à travers la littérature pour influencer la prolifération, la survie et la différenciation des SLECs/MPECs^{97, 102, 107, 250, 265}. L'IL-7 améliore la survie des MPECs dans un modèle d'infection *Lm-OVA*¹⁰². L'IL-2 et l'IL-15 sont connus pour soutenir la prolifération, la différenciation et la survie des SLECs^{97, 102, 107, 203, 250, 265, 340}. A travers la littérature, il n'a pas été montré que l'IL-21 avait un rôle sur la différenciation des LTe CD8⁺ en SLECs et en MPECs. Cependant, l'IL-21 a été montrée comme étant capable d'induire *in vitro* l'expression de facteurs de transcription nécessaires au développement des SLECs (Blimp-1, T-bet, Id2)^{266, 281, 341, 354}.

L'impact de déficiences combinées en signaux IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants sur le développement des SLECs et MPECs n'a pas été étudié à travers la littérature. A travers nos expériences, plusieurs résultats fournissent un éclairage intéressant sur les rôles de ces trois cytokines dans le développement et la maintenance des SLECs ou MPECs. Au cours de cette partie de la discussion nous détaillerons les contributions combinées des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sur l'expansion, la différenciation et la migration des SLECs et MPECs.

1.2.1 Expansion des SLECs et MPECs

Nous avons vu dans la première partie de cette discussion que les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 n'influaient pas sur l'expansion initiale des LTe CD8⁺ (**Figure 14 et 26**). Cependant, ces trois cytokines sont nécessaires à l'expansion terminale des LTe CD8⁺ (**Figure 14 et 26**). Nous avons donc observé si cette expansion terminale réduite des LTe CD8⁺ totaux en l'absence de signaux IL-2, IL-15 et IL-21 se reflétait sur les SLECs et MPECs. Nous avons pu constater qu'en l'absence de signaux IL2R β , les SLECs présentaient une expansion terminale significativement réduite à J7 pi (**Figure 15**). Nous avons même montré que cette expansion réduite des SLECs à J7 pi résultait au moins d'un déficit prolifératif en l'absence de signaux combinés IL-2 et IL-15 (**Figure 16**). Compte tenu du fait que la littérature soutient que les signaux IL2R β supportent la survie des SLECs^{102, 340}, nous pensons que nos SLECs IL2R β ^{-/-} présentent une apoptose accrue à J7 pi par rapport aux SLECs contrôles. A l'opposé, l'expansion des MPECs n'était pas affectée par la déficience combinée en signaux IL-2 et IL-

15 dépendants (**Figure 15**). Ces résultats sont en accord avec la notion que l'IL-2 et l'IL-15 régulent la prolifération et la survie des SLECs^{97, 265, 327, 340}. Cependant, nous avons également pour la première fois montré que l'IL-21 possède un rôle de soutien dans l'expansion terminale des SLECs mais pas dans celle des MPECs (**Figure 26**). En effet, l'absence additive des signaux IL-21R aux signaux IL2R β a comme conséquence de réduire le nombre de SLECs au pic de la réponse d'un facteur 3,8 par rapport aux SLECs P14 IL2R β ^{-/-} (**Figure 26**). A l'opposé, l'expansion des MPECs n'est pas significativement altérée par la triple déficience cytokinique (IL-2, IL-15 et IL-21) (**Figure 26**). Là encore, il serait intéressant d'évaluer la prolifération et l'apoptose des SLECs P14 IL2R β ^{-/-} IL-21R^{-/-} afin de définir précisément l'impact d'une combinaison de ces trois cytokines sur l'expansion terminale des SLECs.

Mes résultats montrent qu'une combinaison des trois cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 est essentielle à l'expansion terminale des SLECs au pic de la réponse. Finalement, nos expériences démontrent clairement que l'expansion de la population MPEC n'est pas dépendante des signaux combinés de ces trois cytokines. Par ces données, nous confirmons ce que d'autres ont préalablement montré. C'est à dire que les signaux IL-2 et IL-15 sont nécessaires à la prolifération et à la survie des SLECs^{97, 265, 327, 340}. Mais nous montrons également que l'IL-21 agit en synergie des cytokines IL-2 et IL-15 afin de promouvoir une expansion terminale des SLECs. Cependant, bien que l'expansion terminale des SLECs soit significativement altérée en l'absence de signaux IL-2, IL-15 et IL-21, le nombre de SLECs reste quand même conséquent. Ceci confirme l'idée que le développement et la maintenance des SLECs est un programme multifactoriel impliquant de nombreux acteurs distincts aptes à compenser la déficience ponctuelle ou continue de certains d'entre eux. Dans notre modèle d'infection LCMV Armstrong, nous pouvons supposer qu'en absence de signaux IL-2, IL-15 et IL-21, l'expansion des SLECs pourrait être, entre autres, supportée par les cytokines inflammatoires que sont les IFNs de type I.

1.2.2 Différenciation des SLECs et MPECs

Un des objectifs de cette thèse était d'évaluer l'impact combiné des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sur la différenciation des SLECs et des MPECs. Les résultats d'une précédente

étude suggéraient qu'en absence combinée de signaux IL-2 et IL-15, la proportion de SLECs, 8 jours après infection avec LCMV Armstrong, était plus faible qu'en absence individuelle de l'une ou l'autre de ces cytokines⁹⁷. Cependant, cette étude présentait des limites au niveau du modèle expérimental murin puisque des LTn CD8⁺ CD25^{-/-} étaient transférés dans des souris IL-15^{-/-} comme nous l'avons détaillé dans la section 4 de l'introduction. En ce qui concerne l'IL-21, il n'a pas été démontré que cette cytokine influait sur la différenciation des LTe CD8⁺ en SLECs ou en MPECs. Mais il a été montré *in vitro* que l'IL-21 induit l'expression de facteurs de transcriptions impliqués *in vivo* dans le développement des SLECs (T-bet, Blimp-1 et Id2)^{266, 281, 341, 354}. Ces données suggèrent, qu'*in vivo*, l'IL-21 pourrait favoriser la génération des SLECs en contrôlant les niveaux de différents facteurs de transcription clés. Nos résultats ont démontré que les LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} présentaient une proportion de SLECs significativement réduite par rapport aux LTe CD8⁺ P14 au pic de la réponse (**Figure 15 et 26**). De plus, nous avons également prouvé que l'IL-21 contribue à la différenciation des SLECs en synergie des signaux IL-2 et IL-15 (**Figure 26**).

Nos résultats suggèrent que les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 favorisent la différenciation des LTe CD8⁺ en modifiant leur programme transcriptionnel (**Figure 17 et 27**). En effet, nous avons constaté qu'en absence de signaux IL-2 et IL-15, la transcription des gènes associés au développement des SLECs était réduite (*Tbx21*, *Prdm1*) (**Figure 17**). A l'opposé, la transcription des gènes associés au développement des MPECs (*Eomes*, *Bcl6*, *Klf2*) était accrue (**Figure 17**). Ces données se traduisant notamment par une plus forte expression d'*Eomes* au sein des LTe CD8⁺ inaptes à intégrer des signaux IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants (**Figure 17 et 27**). En corrélation avec cette observation, nous avons démontré un accroissement du ratio d'expression *Eomes*/T-bet en absence des signaux IL-2, IL-15 et IL-21 au pic de la réponse immune (**Figure 17 et 27**). Nous n'avons pas déterminé précisément comment ces cytokines régulent la balance d'expression de T-bet et *Eomes*. Cependant, il est probable que ce soit par l'inhibition, par phosphorylation, de Foxo1 via la voie PI3K/Akt. Foxo1 étant connu pour limiter la différenciation terminale des LTe CD8⁺ médiée par T-bet et connu également pour soutenir l'expression de gènes associés au développement mémoire (*Eomes*, *IL7Rα*, *Klf2* et *CCR7*)^{262, 283}.

Au cours de cette section, nous avons montré que les signaux IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants sont requis pour le développement des SLECs. Cependant, dans notre modèle infectieux, même en l'absence de ces cytokines, il y a toujours une génération importante de SLECs au pic de la réponse immune. Ceci confirme de précédentes études suggérant que le développement des SLECs est régulé par de multiples facteurs (la durée de la stimulation antigénique, l'inflammation, les cytokines de la famille γ_c). Tous ces éléments se complètent et sont redondants afin de promouvoir la différenciation terminale des LTe CD8⁺. En effet, les expressions des facteurs de transcription impliqués dans le développement des SLECs et des MPECs sont régulées par toutes ces composantes. Finalement, les facteurs de transcription, eux-mêmes, possèdent des fonctions redondantes et modulent ainsi la différenciation des LTe CD8⁺. Par exemple, une étude récente montre que le défaut de différenciation en SLECs résultant d'une déficience en Blimp-1 peut être relativement compensé par une surexpression de T-bet²⁶⁷. Donc, par nos résultats, nous montrons que les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 agissent en synergie afin de soutenir la différenciation optimale des SLECs. En ce sens, ces trois cytokines de la famille γ_c font partie intégrante d'un programme multifactoriel requis pour la différenciation terminale des LTe CD8⁺.

1.2.3 Migration des effecteurs LT CD8⁺

Afin de pleinement éliminer un pathogène, les LTe CD8⁺ doivent migrer vers les muqueuses, lieux d'initiation de la plupart des infections. Plusieurs études ont commencé à étudier à quel moment de la réponse immune LT CD8⁺ s'effectue cette migration. Par exemple, l'équipe de Masopust a établi que la fenêtre de migration des LTe CD8⁺ spléniques vers les tissus intestinaux (IE et LP), suite à une infection LCMV Armstrong, est située entre 4 et 7 jours post-infection³⁷⁸. De plus, cette étude a suggéré que ces effecteurs qui migraient vers l'IE et la LP devaient contenir les précurseurs des T_{RM}. Ainsi, comprendre les mécanismes régulant la migration des LTe CD8⁺ spléniques est essentiel non seulement pour mieux appréhender comment les infections sont éliminées dans les muqueuses mais aussi pour mieux identifier les effecteurs qui deviendront potentiellement des T_{RM}. Certaines cytokines de la famille γ_c sont capables de moduler l'expression de marqueurs de migration dépendamment du contexte. En effet, l'IL-21 promeut l'expression de $\alpha 4\beta 7$, marqueur de migration vers

l'intestin, *in vitro* et *in vivo* sur des LTe CD8⁺⁴¹⁵. Par ailleurs, il a été démontré que l'IL-15 favorise l'expression des ligands aux P- et E-selectin sur les LTm CD8⁺ facilitant ainsi la migration vers les tissus inflammés⁴¹⁷. Cependant, aucun rôle de l'IL-2 sur la migration n'a été clairement montré à ce jour. Nous avons vu au cours de cette thèse que les signaux IL2R β régulaient différents aspects de la réponse effectrice LT CD8⁺ (prolifération, survie, expression de molécules cytotoxiques). Nous avons donc émis l'hypothèse que les signaux IL2R β pouvaient également réguler la migration des LTe CD8⁺. La fenêtre de migration, vers l'IE et la LP, des LTe CD8⁺, dans un modèle d'infection LCMV Armstrong, se situe entre 4 et 7 jours pi est une fenêtre de temps qui correspond également au moment où les signaux IL2R β ont un impact sur les LTe CD8⁺ (entre J5 et J7 pi). Cette indication vient soutenir l'hypothèse que les signaux IL2R β pourraient réguler la migration des LTe CD8⁺.

Nous avons premièrement suivi, jusqu'à J10 pi, l'expression des marqueurs de migration intestinale α 4 β 7 et CCR9 sur nos LTe CD8⁺ spléniques et confirmé que leur expression est maximale entre J5 et J6 pi (**Figure 29**). Cette expression maximale de ces deux marqueurs de migration intestinale corrèle avec la cinétique d'apparition de nos LTe CD8⁺ dans la LP (**Figure 29**). Il serait très pertinent d'effectuer une cinétique d'apparition des LTe CD8⁺ dans l'IE afin de confirmer nos données. Nous avons également observé si une fois dans la LP, nos LTe CD8⁺ étaient voués à s'y maintenir. En regardant l'expression du marqueur de résidence intestinale CD103, nous avons confirmé qu'une partie de nos LTe CD8⁺ présentaient un phénotype de lymphocytes résidents des tissus intestinaux (**Figure 29**). Nous aimerions, pour l'avenir, effectuer une cinétique plus longue de l'expression du marqueur CD103 dans la LP et sur les IELs afin de voir si tout les LTe CD8⁺ survivant à la phase de contraction vont le réexprimer ou non. Nous pensons que parmi les lymphocytes qui auront survécu à la phase de contraction, ceux qui l'exprimaient déjà vont maintenir son expression mais d'autres ne l'exprimeront et persisteront tout de même dans les tissus intestinaux. Cette idée s'appuie notamment sur l'existence de T_{RM} CD103⁻³⁹².

Nous avons ensuite remarqué que l'expression des marqueurs de migration à J5 et à J7 pi sur nos LTe CD8⁺ splénique était différente en l'absence de signaux IL2R β (**Figure 30**).

Nous avons constaté une expression d' $\alpha 4\beta 7$ significativement réduite à J5 en l'absence de signaux IL2R β (**Figure 30**). A l'opposé, nous avons constaté une tendance à une expression supérieure de CCR9 à J5 en l'absence de signaux IL2R β (**Figure 30**). Ces deux données suggèrent les signaux IL2R β régulent distinctement l'expression de ces deux marqueurs de migration avant à J5 pi. Puisque la chaîne IL2R β transmet les signaux des cytokines IL-2 et IL-15, il serait intéressant de voir si l'une ou l'autre des deux cytokines est responsable de cette régulation distincte de ces deux marqueurs à J5 pi. Nous avons ensuite remarqué que l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 était significativement plus élevée à J7 pi en l'absence des signaux IL2R β (**Figure 30**). Nous avons clairement démontré *in vitro* et *in vivo* que c'était la cytokine IL-2 transmettant ses signaux via IL2R β qui était responsable de la diminution d'expression des marqueurs de migration intestinale étudiée (**Figure 30 et 31**). Ces données suggèrent que l'IL-2, en plus de ses rôles déjà évoqués, possède la capacité de limiter l'expression de marqueur de migration sur les LTe CD8⁺ spléniques. Ce potentiel nouveau rôle de l'IL-2 appel à être confirmé notamment en prouvant que la diminution d'expression des marqueurs de migration se traduit par une réduction ou une absence de migration de ces cellules. Pour ce faire, nous pourrions tester la capacité à migrer *in vitro*, en effectuant des tests de migration en transwell. Nous pourrions également tester cette capacité à migrer *in vivo*. Pour ce faire, nous proposons de trier des LTe P14 CD8⁺ spléniques de J5 pi puis de les cultiver pendant 48h *ex vivo* avec ou sans IL-2 à 5U/mL (protocole similaire à celui utilisé pour la **Figure 31 B-C**). Après 48h de culture avec ou sans IL-2 et après avoir mesuré l'expression d' $\alpha 4\beta 7$ et CCR9, les cellules devront être retransférées à des souris C57BL/6 naïves. 24h après le transfert, les souris seront sacrifiées et la localisation des cellules transférées sera évaluée. Nous nous attendons à ce que les LTe CD8⁺ traités avec ed l'IL-2 n'ait pas migré vers les tissus intestinaux. Bien que l'IL-2 soit clairement impliquée comme cytokine modulant l'expression des marqueurs de migration intestinale, nous ne pouvons pas exclure un rôle de l'IL-15 sur ce sujet. Ainsi, nous voudrions tester *in vitro* la capacité de l'IL-15 à réguler l'expression d' $\alpha 4\beta 7$, CCR9 et CD103 comme nous l'avons vu dans la **Figure 31A**. Si l'IL-15 favorise l'expression d' $\alpha 4\beta 7$, CCR9 et CD103, cela montrera que les deux cytokines IL-2 et IL-15 possèdent des fonctions opposées dans la migration des LTe CD8⁺ vers les tissus intestinaux.

Nous avons également évalué l'expression des marqueurs de migration intestinale sur les différents sous-types de LTe CD8⁺ (EECs, SLECs et MPECs) (**Figure 32**). Nous avons montré que ces trois sous-types d'effecteurs présentent des profils de migration bien distincts. En effet, la grande majorité des SLECs expriment $\alpha 4\beta 7$ à J5 pi et presque 60% l'expriment encore à J7 pi (**Figure 32**). $\alpha 4\beta 7$ est exprimé sur 60% des EECs à J5 pi et est encore exprimé sur 35% des EECs à J7 pi (**Figure 32**). Les MPECs eux ne sont pas présents à J5 et seulement à peine 20% d'entre eux expriment $\alpha 4\beta 7$ (**Figure 32**). Ces données suggèrent que les cellules les plus aptes à migrer vers les tissus intestinaux et donc à contenir les précurseurs des T_{RM} sont les SLECs et EECs de J5 pi. Il serait fort intéressant de trier des SLECs, EECs et MPECs à J5 et J7 pi et les réinjecter dans des souris naïves. 24h après le transfert, il sera intéressant d'évaluer la localisation de ces différents sous-types d'effecteurs. Nous croyons qu'une partie des SLECs et EECs de J5 et J7 auront migré vers les tissus intestinaux mais que ce ne sera pas le cas pour les MPECs de J7 pi. Une étude récente a montré que c'étaient les MPECs des tissus intestinaux qui persistaient et devenaient des T_{RM}³⁸². A la vue de nos résultats, nous ne pensons pas que ce sont les MPECs de la rate qui migrent vers les tissus intestinaux. Ainsi, nous pensons que s'il doit y avoir des MPECs dans les tissus intestinaux, ils doivent être dérivés des SLECs ou EECs $\alpha 4\beta 7^+$ à J5 pi. Afin de confirmer cette idée, nous pensons isoler par tri cellulaire les SLECs et EECs $\alpha 4\beta 7^+$ de J5 pi et les transférer séparément dans des souris C57BL/6 « match infected » (J5 pi) et regarder la différenciation et le maintien des SLECs et EECs transférés. Nous croyons que les SLECs seront morts par apoptose et n'auront donc pas persisté alors que les EECs se seront en partie différenciés MPECs et auront persistés. Finalement, nous avons montré que l'IL-2 décroît principalement l'expression des marqueurs de migration intestinale sur les SLECs (**Figure 32**). Cette donnée montre encore une fois l'importance de la cytokine IL-2 sur l'homéostasie des SLECs.

2. Phase mémoire

2.1 Génération, maintenance et survie des LTm CD8⁺

Nous avons préalablement montré qu'une abrogation complète des signaux γ_c dépendants conduit à une absence totale de LTm CD8⁺¹⁰⁷. A l'opposé, une délétion individuelle d'une seule cytokine (IL-2, IL-7, IL-15 ou IL-21) résulte en une réduction du nombre de LTm CD8⁺. Ainsi, l'une des hypothèses de travail lors de cette thèse était que les cytokines de la famille γ_c possèdent des rôles synergiques et redondants dans l'établissement et la maintenance des LTm CD8⁺. Nos données montrent que les signaux IL2R β améliorent la survie des LTe CD8⁺ lors de la phase de contraction (**Figure 19**) et confirment ainsi les fonctions anti-apoptotiques de l'IL-15 à cette phase de la réponse immunitaire^{97, 102, 105, 185, 340}. Nos résultats démontrent également qu'en l'absence des signaux IL-2 et IL-15 dépendants la maintenance des LTm CD8⁺ est fortement réduite (**Figure 19 et 33**). Cette information confirme l'importance des signaux IL-7 dans la génération des LTm CD8⁺^{103, 309} mais confirme aussi l'incapacité de l'IL-7 à compenser la perte de signaux IL-15³³³. Finalement, nous avons également mis en évidence qu'en absence de signaux IL2R β , la cytokine IL-21 contribue à la maintenance des LTm CD8⁺ (**Figure 28**). Ce résultat permet de mieux appréhender le rôle précis de l'IL-21 dans la génération de LTm CD8⁺ alors que la littérature semblait divisée. En effet, dans un modèle d'infection LCMV Armstrong, le nombre de LTm CD8⁺ endogènes générés pour chaque épitope (GP₃₃, NP₃₉₆, GP₂₇₆, NP₂₀₅) n'est pas dépendant des signaux IL-21⁹⁸. En revanche, après une infection avec Adenovirus ou VV, le pool de LTm CD8⁺ est réduit dans les souris IL-21R^{-/-} par rapport aux souris contrôles^{351, 352}. Ainsi, nos expériences sur le développement des LTm CD8⁺ au sein des cellules P14 IL2R β ^{-/-} IL21R^{-/-} suggèrent que les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 agissent en synergie afin de générer les LTm CD8⁺ (**Figure 28**). En ce sens, nous sommes en accord avec les études démontrant que l'IL-21 possède des rôles synergiques *in vitro* avec l'IL-15 sur la prolifération des LT CD8⁺ activés^{99, 348} et *in vivo* avec l'IL-10 sur la maturation des LTm CD8⁺²⁷⁰. L'ensemble de nos données prouve que les cytokines famille γ_c présentent des fonctions synergiques et redondantes dans l'établissement et la maintenance des LTm CD8⁺.

A travers la littérature, il a été préalablement montré que l'IL-7 et l'IL-15 favorisaient la survie des LTm CD8⁺ en augmentant l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2^{100, 246, 335, 368}. L'IL-21 a également été décrite, dans un modèle d'infection VV, comme étant capable de soutenir la survie des LTm CD8⁺ en augmentant l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-2³⁵². Ces informations suggèrent que Bcl-2 est la molécule dépendante des cytokines de la famille γ_c qui assure la survie des LTm CD8⁺. Cependant, nous avons précédemment démontré que, malgré un transgène forçant l'expression de Bcl-2, les LTe CD8⁺ $\gamma_c^{-/-}$ ne pouvaient pas générer de LTm CD8⁺¹⁰⁷. Cette donnée fait écho à une étude indiquant que la présence de Bcl-2 ne semble pas suffisante pour restaurer la survie dépendante des LTm CD8⁺³⁰⁹. Ainsi, cela suggère que les cytokines de la famille γ_c assurent la maintenance des LTm CD8⁺ par des mécanismes Bcl-2 dépendants et indépendants. Nos résultats montrent qu'en absence de signaux IL2R β dépendants, les niveaux d'expression de Bcl-2 sont plus faibles confirmant ainsi que l'IL-15 peut délivrer des signaux de survie Bcl-2 dépendants (**Figure 19**)³⁶⁸. Finalement, nous avons montré que les signaux IL2R β étaient nécessaires à l'augmentation de la masse mitochondriale, caractéristique requise pour la mise en place d'un métabolisme spécifique des LTm CD8⁺³⁷³. Des études supplémentaires sont requises afin d'évaluer précisément la survie et la maintenance des LTm CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R^{-/-}. Nous aimerions par exemple voir si la maintenance, entre J70 et J100, des LTm CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R^{-/-} est identique à celle des LTm CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$. Pour ce faire, nous proposons d'effectuer une expérience où du BRDU serait injecté, de J70 à J100 pi, à des souris contenant des LTm CD8⁺ P14, LTm CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ et LTm CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R^{-/-}. Nous pourrions évaluer la prolifération homéostatique des LTm CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ et LTm CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R^{-/-} en comparaison des LTm CD8⁺ P14. Nous souhaitons également examiner la survie des LTm CD8⁺ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R^{-/-} à J70 pi. Pour ce faire, il serait nécessaire d'évaluer l'expression des molécules anti et pro apoptotiques (Bcl-2 et Bim). La littérature a montré dans modèle d'infection par VV, que l'IL-21 semble promouvoir la survie des LTm CD8⁺ en augmentant l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-2³⁵². Nous nous attendons donc à ce que l'absence additionnelle d'IL-21 en plus des signaux IL2R β réduisent encore plus significativement la survie des LTm CD8⁺. Malgré tout,

les données obtenues lors de cette thèse confirment que les cytokines de la famille γ_c assurent la génération, la survie et la maintenance par des mécanismes Bcl-2 dépendants et indépendants.

2.2 Différenciation et maintenance des LTm CD8⁺

Comme pour les populations effectrices, le pool de LTm CD8⁺ est hétérogène et constitué d'au moins trois types de lymphocytes mémoires : T_{CM} (CD62L^{élevé} CCR7^{élevé} CD127^{élevé} CD44^{élevé} CD27^{élevé}), T_{EM} (CD62L^{faible} CCR7^{faible} CD127^{élevé} CD44^{élevé} CD27^{faible}) et T_{RM} (CD62L^{faible} CCR7^{faible} CD44^{élevé} CD69^{élevé} CD103^{élevé}). Plusieurs études ont suggéré que les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 étaient impliquées dans la génération et la maintenance de ces sous-types de LTm CD8⁺. En effet, après une infection LCMV Armstrong, les LTm CD8⁺ IL-2R α ^{-/-} présentent une proportion augmentée de T_{CM} et une proportion plus réduite de T_{EM} en comparaison des LTm CD8⁺ contrôles^{97, 203}. L'IL-15 apparaît comme indispensable à la maintenance des T_{CM} et T_{EM} comme en atteste la réduction du nombre de ces sous-types de LTm CD8⁺ en l'absence de signaux IL-15 dépendants^{333, 339, 369}. L'impact de l'IL-15 sur les T_{RM} est sujet à controverse^{381, 386, 389, 393}. Il semblerait que les T_{RM} de la rate ne requièrent pas d'IL-15 pour leur maintien³⁸¹ alors que ceux de la peau et des poumons en soient dépendants dans une infection HSV³⁹³. Ces données suggèrent que les T_{RM} des organes non lymphoïdes requièrent l'IL-15 pour leur maintenance. Cependant, il a été montré que les T_{RM} des tissus intestinaux (IELs et LP), issus de cellules P14 transférés des souris IL-15^{-/-}, n'avaient pas besoin d'IL-15 ni pour leur prolifération homéostatique ni pour leur survie⁴¹². Afin de clarifier l'implication de l'IL-15 sur l'homéostasie des T_{RM}, nous avons étudié le développement des T_{RM} au sein des LTm CD8⁺ P14 IL2R β dans les tissus intestinaux. En ce qui concerne l'IL-21, son rôle sur le développement des sous-types de LTm CD8⁺ semble dépendre du contexte expérimental. Dans un modèle non infectieux, l'IL-21 conditionne l'accumulation des T_{EM} et T_{RM} alors que suite à une infection LCMV Armstrong, cette cytokine n'apparaît pas comme requise pour le maintien des trois sous-types de LTm CD8⁺⁴¹⁵. Tous ces éléments indiquent une forte implication des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 dans la génération et la maintenance des LTm CD8⁺.

Nos résultats indiquent qu'en l'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15, les fréquences de T_{EM} sont significativement plus faibles (**Figure 20 et 21**). A l'opposé, les proportions de T_{CM} sont accrues parmi les LTm CD8⁺ IL2Rβ^{-/-} déficients (**Figure 20 et 21**). Ces données sont en accord avec le développement plus soutenu des T_{CM} au sein de LTm CD8⁺ IL2Rα^{-97, 327}. De plus, nous avons constaté que les signaux IL2Rβ ne contrôlaient pas uniquement la différenciation des T_{EM} mais également leur maintenance (**Figure 21**). Au contraire, ces mêmes signaux n'apparaissent pas comme étant requis pour la maintenance des T_{CM} (**Figure 21**). Nous montrons donc ici que les signaux IL-15 (et/ou IL-2) ne sont pas requis pour la maintenance des T_{CM}. Ce résultat est en contradiction avec de précédentes études suggérant que l'IL-15 était nécessaire à la survie des T_{CM}^{333, 339, 369}. Ces études ont été faites dans des modèles murins IL-15^{-/-} et IL15Rα^{-/-} alors que nous avons utilisé un modèle expérimental utilisant des LTn CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} transférés dans des souris C57BL/6 immunocompétentes. Ces différences expérimentales offrent des pistes de réflexion afin de comprendre ces distinctions sur le rôle de l'IL-15 dans la maintenance des T_{CM}. Il est également intéressant de noter que l'absence supplémentaire d'IL-21 en plus des signaux IL-2 et IL-15 résulte en une abolition presque complète du phénotype T_{EM} au sein des LTm CD8⁺ (**Figure 28**). Cette donnée indique que la différenciation des T_{EM} est assurée par une synergie des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21. En ce qui concerne les T_{RM}, bien que le résultat ne soit pas encore significatif, nous constatons une tendance suggérant que les T_{RM} de la LP sont dépendants des signaux IL2Rβ pour leur maintenance (**Figure 33**). De plus, les signaux IL-2 et IL-15 combinés sont requis pour le développement des T_{RM} CD103⁻ dans la LP. Au contraire, les T_{RM} CD103⁺ ne nécessitent pas de signaux IL-2 et IL-15 pour leur différenciation (**Figure 33**). Cette donnée est en accord avec une étude récente montrant que les T_{RM} CD103⁺ sont dépendants de signaux TGFβ pour leur développement³⁹². Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le développement et/ou la maintenance des T_{RM} CD103⁻ est dépendante des signaux IL2Rβ. Finalement, de plus amples expériences sont nécessaires afin 1) de confirmer significativement cette tendance dans notre modèle infectieux 2) d'étudier la réquisition de l'IL-15 pour la maintenance des T_{RM} CD103⁺ et CD103⁻ dans les tissus intestinaux et 3) d'explorer si les T_{RM} IL2Rβ déficients fournissent une protection aussi efficace que celle des T_{RM} IL2Rβ compétents dans le cadre d'une infection secondaire. Nous

pourrions également étudier l'impact de l'IL-21 sur le développement des T_{RM} . Ce serait d'autant plus intéressant car une étude récente a montré que les signaux IL-21, malgré qu'ils favorisent l'expression d' $\alpha 4\beta 7$, n'étaient pas nécessaires au développement des T_{RM} dans un modèle LCMV Armstrong contrairement à un modèle non infectieux⁴¹⁵. Ceci nous laisse penser, que comme nous l'avons démontré pour les SLECs, l'impact de l'IL-21 sur le développement des T_{RM} dans une infection LCMV Armstrong est masqué par les fonctions redondantes d'autres cytokines γ_c .

Nos résultats suggèrent que les différents LTm $CD8^+$ sont régulés différemment et possèdent des réseaux distincts de facteurs de transcription contrôlant leur développement et leur maintenance. Ici, nous proposons que l'IL-2 et l'IL-15 soutiennent la différenciation des T_{EM} en limitant l'activation de la voie signalétique dépendante de Foxo1 (et la transcription d'Eomes) tout en favorisant l'activation de la voie mTORC1 de manière Akt dépendante, comme suggéré pour les SLECs^{261, 283}. Parallèlement, les signaux IL2R β peuvent promouvoir l'expression de Blimp-1, favorisant non seulement la quantité de LTm $CD8^+$ généré mais aussi les caractéristiques phénotypiques de ces cellules^{269, 271}. A l'opposé, les signaux IL-2 et IL-15 peuvent restreindre la différenciation des T_{CM} en limitant, directement ou indirectement, la transcription de *Klf2*, *Eomes* et *Bcl-6*^{278, 402, 429}. L'ensemble de ces résultats suggère que les signaux IL-2 et IL-15 modulent des voies de signalisation multiples qui régulent en retour divers facteurs de transcription contrôlant le devenir des différents sous-types de LTm $CD8^+$. Pour élargir, cette question il sera important d'évaluer l'expression des facteurs de transcription cités ici dans les LTm $CD8^+$ déficients à la fois en signaux IL2R β et IL-21R. En conséquence de la plus grande proportion de T_{CM} au sein des LTm $CD8^+$ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ IL21R $^{-/-}$ par rapport aux LTm $CD8^+$ P14 IL2R $\beta^{-/-}$ à J70 pi, nous nous attendons à une expression encore plus marquée des facteurs de transcription favorisant la différenciation des LTm $CD8^+$ en T_{CM} .

3. Réponse secondaire

3.1 Expansion des effecteurs secondaires

Nous avons vu dans la section 5 de l'introduction que les LTm CD8⁺ possèdent plusieurs spécificités qui leur permettent de contrôler rapidement et efficacement une nouvelle exposition à leur antigène spécifique. L'une d'entre elles est une capacité à s'expandre rapidement suite à une restimulation antigénique³⁵⁹. L'influence des cytokines de la famille γ_c et en particulier de l'IL-2 et l'IL-15 sur l'expansion secondaire des LTe CD8⁺ issus des LTm CD8⁺ a été particulièrement étudiée. En effet, plusieurs études, avec LCMV comme modèle infectieux, ont suggéré que des signaux IL-2 lors du « priming » de la réponse primaire étaient requis afin de programmer l'expansion des effecteurs secondaires^{97, 203, 322}. Selon ces études, ce programming est essentiel à la survie et à l'accumulation des LTe CD8⁺ mais pas à leur prolifération. A l'opposé, ces signaux IL-2 durant la phase d'activation ne semblent pas être requis pour l'expansion des effecteurs secondaires lors d'une infection à *Lm*³²⁷. En ce qui concerne l'IL-15, diverses études ont conclues que les LTm CD8⁺ IL-15^{-/-} étaient tout à fait capables de s'expandre lors d'une réponse secondaire^{97, 105, 310, 333}. Cependant, compte-tenu des fonctions redondantes de l'IL-2 et l'IL-15 sur l'expansion des effecteurs primaires, il ne faut pas exclure un rôle de l'IL-15 dans l'expansion des effecteurs secondaires. Ainsi, nous avons trouvé cela pertinent de clarifier l'impact précis des cytokines IL-2 et IL-15 sur l'expansion des effecteurs secondaires. Pour ce faire, nous avons 1) prévenu toute forme de redondance entre les signaux cytokiniques IL-2 et IL-15, 2) évité toute possibilité de signalisation via l'hétérodimère IL2R β / γ_c , 3) éliminé la contribution de l'IL-2 paracrine sécrétées par d'autres types cellulaires, 4) conservé intact l'architecture des organes lymphoïdes et la présentation antigénique et 5) testé la réponse secondaire avec le même agent infectieux dans une souris naïve.

Nos résultats démontrent que les LTe CD8⁺ secondaires IL2R β déficients présentent une expansion tout à fait identique à celle des lymphocytes contrôles à J5 post-réinfection (**Figure 22**). Cependant, comme lors de la réponse primaire, l'expansion terminale des LTe CD8⁺ secondaires semble dépendante des signaux IL2R β (**Figure 22**). De plus, comme lors de

la primo-infection, les LTe CD8⁺ IL2Rβ^{-/-} secondaires prolifèrent moins et possèdent une expression accrue de la molécule pro-apoptotique Bim (**Figure 22**). Ainsi, ces données laissent penser que les effecteurs primaires et secondaires requièrent les mêmes signaux cytokiniques pour leur expansion. Toutefois, les effecteurs secondaires apparaissent comme étant plus dépendants de l'IL-2 et l'IL-15 que les effecteurs primaires car le nombre d'effecteurs secondaires à J70+7 est réduit d'un facteur 4,7 en absence de signaux IL2Rβ alors que lors de la réponse primaire à J7, le facteur de réduction était de 3,5.

Nous avons également voulu voir si l'expansion réduite des effecteurs secondaires IL2Rβ déficients résultait d'un programming comme suggéré par l'équipe de Bevan²⁰³ ou si les signaux IL-2 et IL-15 étaient requis lors de la réinfection. Pour ce faire, nous avons bloqué les signaux CD122, via un anticorps bloquant, soit durant la première semaine d'infection soit durant la première semaine de réinfection (**Figures 24-25**). Nous n'avons constaté aucune différence significative d'expansion secondaire des LTm CD8⁺ qu'ils aient été privés ou non de signaux IL2Rβ lors du priming initial (**Figure 25**). En revanche, nos résultats prouvent que les signaux CD122 sont nécessaires lors de l'initiation de la réponse secondaire afin de promouvoir l'expansion terminale des LTe CD8⁺ (**Figure 25**). Ces informations suggèrent que l'IL-2 et l'IL-15, deux cytokines aux effets redondants, ne peuvent induire de manière permanente des signaux programmant l'expansion des effecteurs secondaires. En effet, une absence initiale des signaux de ces deux cytokines n'influe pas sur l'expansion secondaire. Donc, l'IL-2 et l'IL-15 ne peuvent moduler l'expansion des LTe CD8⁺ que par une signalisation constante.

3.2 Différenciation des effecteurs secondaires

Nous avons discuté plus haut de l'impact de l'IL-2 et de l'IL-15 sur la différenciation des LTe CD8⁺ primaires. Nous avons notamment montré que ces deux cytokines favorisaient la différenciation des SLECs en modulant le réseau de facteurs de transcription associé à la différenciation des LTe CD8⁺ (**Figure 17**). Nous avons donc voulu voir si les signaux IL2Rβ régulaient de la même manière le développement des SLECs au sein des effecteurs secondaires. Nos résultats indiquent que sept jours après la réinfection, les fréquences et

nombre de SLECs secondaires sont significativement réduits en l'absence combinée de signaux IL-2 et IL-15 dépendants (**Figure 22**). De plus, nous montrons clairement, comme lors de la primo-infection, qu'en absence de signaux IL2R β , que la transcription de gènes associés au développement des SLECs est réduite (*Tbx21*, *Prdm1*) alors que celle de gènes associés au développement des MPECs (*Eomes*, *Bcl6*, *Klf2*) était accrue (**Figure 22**). Ces régulations semblables de la différenciation des LTe CD8⁺ primaires et secondaires suggèrent que les générations des SLECs et des MPECs sont régulées par les mêmes signaux cytokiniques et les mêmes facteurs de transcription que ce soit lors de la primo-infection ou lors de la réinfection. Il est notable également que l'absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants lors de la primo-infection ne module pas la différenciation des LTe CD8⁺ secondaires en SLECs ou en MPECs (**Figure 25**). Cette donnée indique que ces deux cytokines ne peuvent induire une différenciation particulière sur le long terme. Donc, l'IL-2 et l'IL-15 ne peuvent moduler la différenciation des LTe CD8⁺ que par une signalisation constante. Finalement, encore comme lors de la primo-infection, même en absence de signaux IL2R β , les LTe CD8⁺ se développent majoritairement en SLECs indiquant que l'IL-2 et l'IL-15 ne sont pas les seuls facteurs favorisant la génération des SLECs secondaires. Nous pouvons penser, encore une fois, que des facteurs comme la durée de la stimulation antigénique ou des cytokines inflammatoires modulent également la différenciation des effecteurs secondaires. Cette suggestion renforce l'idée que les générations de SLECs et de MPECs sont régulées par les mêmes facteurs lors des infections primaires et secondaires.

4. Fonctions effectrices des LTe CD8⁺ primaires et secondaires

Nous avons préalablement montré que les cytokines IL-2, IL-15 et même IL-21 conditionnaient l'expansion tardive des effecteurs LT CD8⁺ ainsi que leur différenciation. Par la suite, nous avons également constaté que les mêmes signaux IL-2 et IL-15 dépendants régulaient l'expansion et la différenciation des LTe CD8⁺ secondaires. Il était donc naturel de penser que les signaux IL2R β et IL21R pouvaient moduler l'acquisition des fonctions effectrices des LTe CD8⁺ primaires et secondaires. A travers la littérature, plusieurs études appuient cette idée. En effet, l'IL-2 contribue à augmenter *in vivo* la transcription de gènes codant pour des molécules cytotoxiques (Grz A, Grz B et perforine) lors d'infection LCMV⁹⁷,

^{250, 265}. De plus, dans un modèle de vaccination via des cCD chargées avec un peptide immunogène, l'IL-15 a été montré comme améliorant la capacité des effecteurs primaires à éliminer des cellules cibles¹⁰⁴. Finalement, au cours d'infection avec VV, l'IL-21 supporte l'acquisition complète des fonctions cytotoxiques des LTe CD8⁺ primaires^{99, 351, 352}. En ce qui concerne les effecteurs secondaires, l'IL-15 favorise l'expression optimale du Grz B au pic de la réponse secondaire^{105, 310}.

Nos résultats ont démontré une réduction de la transcription des gènes codant pour le Grz A et le Grz B au sein des LTe CD8⁺ IL2R β déficients primaires et secondaires au pic de la réponse (**Figure 18 et 23**). Cette transcription génique réduite se traduit par des niveaux de Grz B intracellulaire plus faible dans les effecteurs primaires et secondaires en absence de signaux IL-2 et IL-15 dépendants (**Figure 18 et 23**). Il est notable également qu'en l'absence additionnelle d'IL-21, les niveaux de Grz B dans les LTe CD8⁺ primaires sont encore plus réduits suggérant que l'IL-21 peut soutenir *in vivo* l'expression de cette molécule cytotoxique dans modèle d'infection LCMV (**Figure 27**). En revanche, nous n'avons pas constaté d'impact sur les niveaux de perforine des LTe CD8⁺ primaires cela suggérant que les signaux indépendants de l'IL-2 et l'IL-15 sont suffisants pour induire la synthèse de cette molécule (**Figure 18**). De plus, la capacité à dégranuler des effecteurs primaires ne semble pas être affectée par l'absence de signaux IL-2, IL-15 et IL-21 (**Figure 18 et 27**). Enfin, nos résultats montrent que la sécrétion de cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α) au sein des LTe CD8⁺ primaires et secondaires au pic de la réponse ne sont pas dépendants des signaux IL2R β (**Figure 18 et 23**).

Malgré des réductions significatives d'expression de molécules Grz A et Grz B, les LTe CD8⁺ IL2R β déficients primaires et secondaires sont tout à fait capables de contrôler l'infection comme en atteste les charges virales dans la rate (**Figure 18 et 23**). Nous avons confirmé cette donnée en montrant que les LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} primaires et secondaires sont tout aussi capables d'éliminer des cellules cibles *in vivo* que les LTe CD8⁺ P14 (**Figure 18 et 23**). Ces données suggèrent que les niveaux réduits de Grz au sein des LTe CD8⁺ P14 IL2R β ^{-/-} primaires et secondaires sont suffisants pour contrôler une infection virale. Il serait

intéressant d'évaluer la capacité des LTe CD8⁺ P14 IL2Rβ^{-/-} IL21R^{-/-} primaires à contrôler l'infection LCMV. Etant donné que les LTe CD8⁺ γ_c^{-/-} primaires éliminent efficacement ce pathogène LCMV Armstrong¹⁰⁷, nous nous attendons à ce que les effecteurs triplement déficients (IL-2, IL-15 et IL-21) contrôlent également cette infection.

Nos résultats montrent que, comme pour l'expansion et la différenciation, l'acquisition des fonctions effectrices des LTe CD8⁺ primaires et secondaires est régulée par les mêmes signaux. Notamment, nous avons vu que les signaux IL2Rβ augmentaient la transcription de gènes codant pour les granzymes. A ce jour la signalisation précise permettant à l'IL-2 et à l'IL-15 de favoriser la transcription du Grz A et du Grz B n'ont pas été mis en évidence. Cependant, il est fort probable que des facteurs de transcription tels que T-bet et Blimp-1 soient impliqués. En effet, ces deux molécules, modulées comme nous l'avons montré par les signaux IL2Rβ, sont connus pour influencer l'expression du Grz B^{186, 269, 271}. Fait intéressant, nos données sont en accord avec l'idée qu'une expansion incomplète des LTe CD8⁺ primaires ne résulte pas en une altération de l'acquisition des fonctions effectrices^{428, 430}. Avec les données observées au cours de nos expériences, nous pouvons penser que cette notion s'applique également aux effecteurs secondaires.

5. Conclusions et perspectives

Au cours de cette thèse intitulée « Rôles combinés des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 dans le développement et le maintien des lymphocytes CD8⁺ mémoires », nous avons grandement participé à l'avancement des connaissances sur l'impact des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 non seulement sur les LTm CD8⁺ mais également sur les effecteurs LT CD8⁺ qu'ils soient primaires ou secondaires. Grâce à nos modèles d'études particuliers nous avons pour la première fois mis clairement en évidence plusieurs éléments d'intérêts majeurs :

- 1) Les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 collaborent à l'expansion terminale des SLECs après une infection LCMV Armstrong. Il est certain que l'IL-2 et l'IL-15 soutiennent

la prolifération et la survie des SLECs. Nous pensons que l'IL-21 agit également de cette façon mais cela reste à prouver.

- 2) L'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21 supportent de manière redondante la différenciation des SLECs en modulant l'expression de facteurs de transcription clés.
- 3) La cytokine IL-2 limite l'expression de marqueurs de migration intestinale sur les SLECs et modifie potentiellement la migration de cette population effectrice (**Figure 35**). L'impact de l'IL-15 et l'IL-21 sur la migration des SLECs reste à étudier.
- 4) L'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21 collaborent au développement d'un nombre maximal de LTm CD8⁺ (**Figure 34**).
- 5) L'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21 soutiennent l'homéostasie de la population mémoire T_{EM}. Nous avons pour le moment clairement montré que les signaux combinés IL-2 et IL-15 dépendants supportent le développement et la maintenance des T_{EM} (**Figure 34**). L'action exacte de l'IL-21 sur les T_{EM} reste à démontrer (**Figure 34**).
- 6) Les T_{RM} CD103⁻ sont dépendants des signaux IL2Rβ pour leur développement et/ou maintenance (**Figure 35**). L'impact de l'IL-21 sur le développement et/ou la maintenance des T_{RM} reste à étudier.
- 7) L'expansion et les fonctions des effecteurs secondaires sont régulées par des signaux identiques à ceux des effecteurs primaires

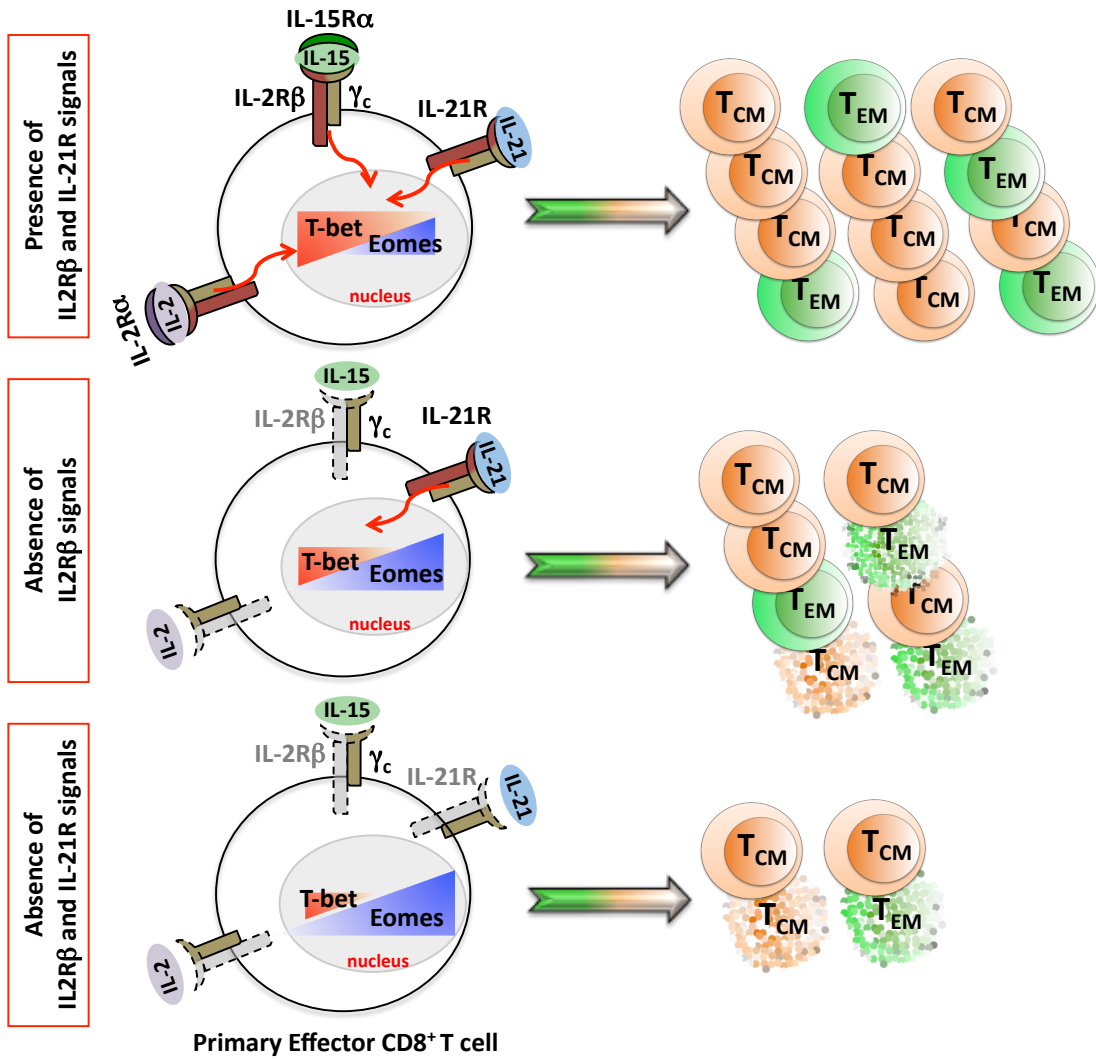


Figure 34 : Schéma représentant l'impact combiné des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sur la génération de T_{EM} et T_{CM}.

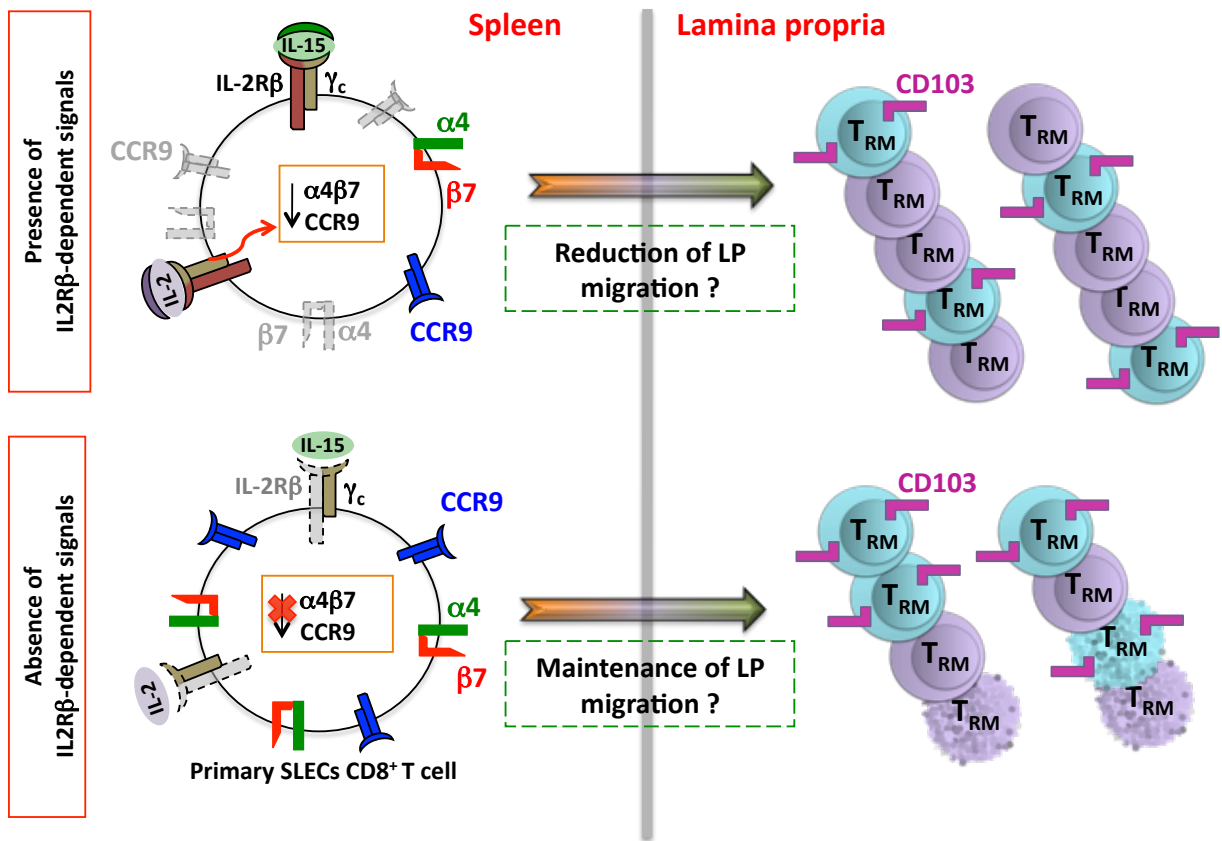


Figure 35 : Schéma représentant l'impact combiné des cytokines IL-2 et IL-15 sur la génération de T_{RM} $CD103^+$ et $CD103^-$.

Mes données ont été obtenues grâce à l'utilisation de modèles murins originaux dans le cadre d'une infection aigue avec le virus LCMV Armstrong. Les différentes souris transgéniques ont permis de mettre en lumière des rôles redondants mais également synergiques de trois cytokines (IL-2, IL-15 et IL-21) sur le développement et la maintenance des LTe $CD8^+$ et LTm $CD8^+$. Cependant, bien que nos modèles murins soient novateurs, ils présentent également quelques limites. En effet, nous ne pouvons, au cours de nos expériences, détailler précisément si l'absence combinée de plusieurs signaux cytokiniques (IL-2 et IL-15) n'a pas pour conséquence d'amplifier les fonctions d'autres cytokines (IL-21). Par exemple, nous avons constaté que l'absence additionnelle de l'IL-21 induit une réduction de l'expansion terminale des SLECs plus importante qu'en l'absence des signaux IL2R β . Nous pouvons donc dire avec certitude que l'IL-21 collabore avec les signaux IL2R β à

l'expansion terminale des SLECs. Mais, nous ne pouvons pas affirmer que son rôle dans ce phénomène est aussi majeur que ce que nos figures démontrent. Il est possible que les fonctions de l'IL-21 sur les SLECs soient amplifiées par l'absence de signaux IL2R β . Cette réflexion peut également être appliquée sur l'impact de l'IL-21 sur le développement des T_{EM} en l'absence de signaux IL2R β . Pour répondre à cette question, il serait utile d'étudier l'impact d'une déficience unique en signaux IL-21 sur la réponse LT CD8⁺ dans notre modèle expérimental en effectuant un transfert adoptif de cellules LTn CD8⁺ P14 IL-21R^{-/-}.

A travers nos expériences, nous avons toujours utilisé le virus LCMV Armstrong comme modèle infectieux. Ce virus possède la particularité de générer une forte inflammation dépendante des IFNs de type I¹⁸⁸ et une réponse LT CD8⁺ indépendante d'une aide LT CD4⁺⁴⁶. Afin de confirmer nos résultats, il serait intéressant de voir s'ils sont reproductibles en utilisant d'autres modèles infectieux. Je pense notamment à la possibilité d'utiliser les mêmes modèles transgéniques murins mais en prenant comme modèle infectieux *Lm-GP₃₃*. Finalement, nous avons vu que même en l'absence signaux IL-2, IL-15 et IL-21 dépendants, nous avons constaté que des LTe continuaient à s'expandre et à se différencier en SLECs/MPECs. Cette donnée nous a permis d'émettre l'hypothèse que les signaux inflammatoires, induits par le LCMV Armstrong, collaboraient avec les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 afin de promouvoir une expansion terminale soutenue des LTe CD8^{+176, 177}. Compte-tenu de cette hypothèse, il serait pertinent d'évaluer l'impact combiné des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sur le développement complet d'une réponse LT CD8⁺ dans un modèle où les signaux inflammatoires (IFNs de type I et IL-12) seraient beaucoup moins présents. Je pense notamment à un modèle expérimental d'immunisation avec des cCD présentant l'antigène GP₃₃₋₄₁. Nous pourrions ainsi voir à travers ce modèle si les fonctions des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sont bien plus majeures en l'absence de signaux inflammatoires aptes à compenser leur déficience.

Suite à ces observations la question qui se pose est comment nos données s'intègrent par rapport aux résultats obtenus dans d'autres modèles expérimentaux. L'importance des signaux IL-15 dans l'expansion terminale des LTe CD8⁺ est controversée. Il semble

notamment que dans des modèles LCMV ou *Lm*^{105, 106, 333}, l'IL-15 n'influence pas l'expansion terminale des LTe CD8⁺ alors que dans une infection VSV ou un modèle de vaccination, cette cytokine est requise^{104, 339}. Nos résultats prouvent que l'IL-2 et l'IL-15 collaborent afin de promouvoir l'expansion terminale des LTe CD8⁺. De plus, il semble qu'en leur absence, il est envisageable que des cytokines inflammatoires (IFNs de type I et IL-12) contribuent à soutenir l'expansion terminale des LTe CD8⁺. Nos données réconcilient donc les différentes études de la littérature quant au rôle de l'IL-15 dans l'expansion terminale des LTe CD8⁺. En effet, en l'absence de signaux IL-15, les signaux IL-2, IL-21 voir même inflammatoires peuvent compenser et soutenir l'expansion terminale des LTe CD8⁺. Cependant, lorsque les niveaux d'inflammation sont moindres, comme dans un modèle de vaccination, l'impact des cytokines de la famille γ_c et donc de l'IL-15 apparaît comme plus critique. A ce moment et dans ce contexte expérimental, la perte de l'IL-15 est beaucoup plus préjudiciable à l'expansion terminale des LTe CD8⁺. En ce qui concerne l'IL-21, son absence ou celle de son récepteur dans une infection LCMV Armstrong n'affecte pas la réponse effectrice primaire⁹⁸. A l'opposé, dans un modèle utilisant VV comme agent pathogène, les LTe CD8⁺ IL-21R^{-/-} prolifèrent moins^{99, 351}. Encore une fois, nos résultats réconcilient plusieurs études en montrant que l'IL-21 agit de manière redondante aux cytokines IL-2 et IL-15 afin de promouvoir l'expansion des LTe CD8⁺. L'absence de signaux IL-21 dépendants pouvant être compensée par les fonctions redondantes de l'IL-2 et l'IL-15 et même de certains signaux inflammatoires.

En ce qui concerne le développement et la maintenance des LTm CD8⁺, plusieurs études ont préalablement montré et ce dans divers modèles expérimentaux que la délétion individuelle d'IL-2, d'IL-15, d'IL-7 ou d'IL-21 résulte en une réduction du nombre de LTm CD8⁺^{97, 98, 203, 230, 246, 309, 333, 339, 351, 352}. En revanche, dans le cadre d'une abrogation complète des signaux γ_c dépendants, une absence totale de LTm CD8⁺ est observée¹⁰⁷. Nos résultats font le lien entre ces deux informations en montrant clairement qu'au moins les cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 collaborent au développement des LTm CD8⁺. Nous allons même plus loin en montrant que c'est la population T_{EM} dont le développement et la maintenance sont le plus affectés par la déficience en signaux IL-2, IL-15 et IL-21.

Cette thèse aura ouvert la voie à une meilleure compréhension de comment sont générés et maintenus les différents sous-types de LTm CD8⁺ (T_{CM}, T_{EM} et T_{RM}). Etant donné que ces LTm CD8⁺ sont les cellules générées lors des protocoles vaccinaux, avoir une meilleure compréhension des mécanismes assurant leur génération et leur survie permettra de développer des vaccins plus efficaces notamment contre les maladies chroniques. Il va être notamment très important de continuer à caractériser l'impact des cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 sur les T_{RM}. En effet, de part leur localisation, les T_{RM} sont plus difficiles à étudier. L'obtention de biopsies de tissus contenant assez de cellules pour pouvoir identifier ces T_{RM} représente, pour le moment, un obstacle majeur dans l'étude de ces cellules chez l'humain. Ainsi, les modèles murins représentent actuellement la meilleure opportunité pour améliorer nos connaissances au sujet de ces lymphocytes résidents mémoires.

Avec les données de cette thèse ainsi que celles d'études à venir, nous pourrions sélectionner le sous-type de LTm CD8⁺ que nous souhaitons développer selon le protocole vaccinal. Par exemple, nous pourrions utiliser des combinaisons de cytokines γ_c comme adjuvants thérapeutiques afin d'amplifier l'expansion de LTe CD8⁺. A l'opposé, nous pourrions également utiliser des inhibiteurs de signaux de cytokines γ_c afin de promouvoir le développement de T_{RM} ou de T_{CM}. En effet compte-tenu de leurs caractéristiques propres, il peut s'avérer utile, selon le site d'infection du pathogène, de développer plutôt des T_{RM} que des T_{CM}. Ces approches pourraient être associées aux protocoles antiviraux déjà en place. Ces derniers combinent des médicaments antiviraux avec l'ajout ou non de cytokines pro-inflammatoires (thérapie antivirale pour VIH, ribavirin et IFN α pour l'hépatite C)^{431, 432}.

Nous ouvrons également la porte à une façon de réguler la migration des effecteurs ce qui peut être relevant médicalement parlant dans le cas de maladies du tractus intestinal tels que les maladies de Crohn ou les colites ulcéraives. Dans ces maladies, il y a une migration importante de lymphocytes vers la muqueuse intestinale conduisant à une inflammation majeure du tractus gastrointestinal⁴³³. Bien que des anti-intégrines tels que le Natalizumab soient déjà utilisés, des combinaisons de cytokines de la famille γ_c pourraient être utilisées en complément.

Bibliographie

1. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* **327**, 291-295 (2010).
2. O'Neill, L.A., Golenbock, D. & Bowie, A.G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 453-460 (2013).
3. Mitchison, N.A. T-cell-B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol* **4**, 308-312 (2004).
4. Li, Z., Woo, C.J., Iglesias-Ussel, M.D., Ronai, D. & Scharff, M.D. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev* **18**, 1-11 (2004).
5. Odegard, V.H. & Schatz, D.G. Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* **6**, 573-583 (2006).
6. Jiang, S. & Dong, C. A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev* **252**, 5-11 (2013).
7. Swain, S.L., McKinsty, K.K. & Strutt, T.M. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* **12**, 136-148 (2012).
8. Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L. & Glimcher, L.H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* **21**, 713-758 (2003).
9. Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T. & Grusby, M.J. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* **4**, 313-319 (1996).
10. Zheng, W. & Flavell, R.A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-596 (1997).
11. Schmitt, E., Klein, M. & Bopp, T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol* **35**, 61-68 (2014).
12. Stassen, M., Schmitt, E. & Bopp, T. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann NY Acad Sci* **1247**, 56-68 (2012).
13. Chen, Z., Laurence, A. & O'Shea, J.J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* **19**, 400-408 (2007).

14. Vogelzang, A. *et al.* A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* **29**, 127-137 (2008).
15. Yu, D. *et al.* The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* **31**, 457-468 (2009).
16. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
17. Paul, W.E. & Seder, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**, 241-251 (1994).
18. Stevens, T.L. *et al.* Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* **334**, 255-258 (1988).
19. Kovanen, P.E. & Leonard, W.J. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev* **202**, 67-83 (2004).
20. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 485-517 (2009).
21. McHeyzer-Williams, L.J., Pelletier, N., Mark, L., Fazilleau, N. & McHeyzer-Williams, M.G. Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity. *Curr Opin Immunol* **21**, 266-273 (2009).
22. King, C., Tangye, S.G. & Mackay, C.R. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol* **26**, 741-766 (2008).
23. Shevach, E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* **30**, 636-645 (2009).
24. Shrikant, P.A. *et al.* Regulating functional cell fates in CD8 T cells. *Immunol Res* **46**, 12-22 (2010).
25. Harty, J.T., Tvinnereim, A.R. & White, D.W. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* **18**, 275-308 (2000).
26. Wong, P. & Pamer, E.G. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol* **21**, 29-70 (2003).
27. Butz, E.A. & Bevan, M.J. Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* **8**, 167-175 (1998).

28. Homann, D., Teyton, L. & Oldstone, M.B. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8⁺ but declining CD4⁺ T-cell memory. *Nat Med* **7**, 913-919 (2001).
29. Murali-Krishna, K. *et al.* Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**, 177-187 (1998).
30. Graham, M.B. & Braciale, T.J. Resistance to and recovery from lethal influenza virus infection in B lymphocyte-deficient mice. *J Exp Med* **186**, 2063-2068 (1997).
31. Topham, D.J., Tripp, R.A. & Doherty, P.C. CD8⁺ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J Immunol* **159**, 5197-5200 (1997).
32. Cannon, M.J., Openshaw, P.J. & Askonas, B.A. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med* **168**, 1163-1168 (1988).
33. Guidotti, L.G., Matzke, B., Schaller, H. & Chisari, F.V. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* **69**, 6158-6169 (1995).
34. Guidotti, L.G. *et al.* Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **4**, 25-36 (1996).
35. Keppler, S.J., Rosenits, K., Koegl, T., Vucikujja, S. & Aichele, P. Signal 3 cytokines as modulators of primary immune responses during infections: the interplay of type I IFN and IL-12 in CD8 T cell responses. *PLoS One* **7**, e40865 (2012).
36. Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Goebel, W. & Cossart, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* **60**, 1263-1267 (1992).
37. Mittrucker, H.W., Kohler, A., Mak, T.W. & Kaufmann, S.H. Critical role of CD28 in protective immunity against *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* **163**, 6769-6776 (1999).
38. Kerksiek, K.M. & Pamer, E.G. T cell responses to bacterial infection. *Curr Opin Immunol* **11**, 400-405 (1999).
39. Muller, I., Cobbold, S.P., Waldmann, H. & Kaufmann, S.H. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in vivo depletion of L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cells. *Infect Immun* **55**, 2037-2041 (1987).
40. De Libero, G., Flesch, I. & Kaufmann, S.H. Mycobacteria-reactive Lyt-2⁺ T cell lines. *Eur J Immunol* **18**, 59-66 (1988).
41. Schofield, L. *et al.* Gamma interferon, CD8⁺ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* **330**, 664-666 (1987).

42. Weiss, W.R., Sedegah, M., Beaudoin, R.L., Miller, L.H. & Good, M.F. CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 573-576 (1988).
43. Ely, K.H., Kasper, L.H. & Khan, I.A. Augmentation of the CD8+ T cell response by IFN-gamma in IL-12-deficient mice during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* **162**, 5449-5454 (1999).
44. Khan, I.A., Ely, K.H. & Kasper, L.H. Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol* **152**, 1856-1860 (1994).
45. 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).
46. 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).
47. Cousens, L.P. *et al.* Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J Exp Med* **189**, 1315-1328 (1999).
48. 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).
49. Meyer, B.J., de la Torre, J.C. & Southern, P.J. Arenaviruses: genomic RNAs, transcription, and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **262**, 139-157 (2002).
50. Buchmeier, M.J., Lewicki, H.A., Tomori, O. & Johnson, K.M. Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus react with pathogenic arenaviruses. *Nature* **288**, 486-487 (1980).
51. Oldstone, M.B. Biology and pathogenesis of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **263**, 83-117 (2002).
52. Ahmed, R., Salmi, A., Butler, L.D., Chiller, J.M. & Oldstone, M.B. Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J Exp Med* **160**, 521-540 (1984).
53. Muckenfuss, R.S. Clinical Observations and Laboratory Investigations on the 1933 Epidemic of Encephalitis in St. Louis. *Bull N Y Acad Med* **10**, 444-453 (1934).

54. Barton, L.L., Mets, M.B. & Beauchamp, C.L. Lymphocytic choriomeningitis virus: emerging fetal teratogen. *Am J Obstet Gynecol* **187**, 1715-1716 (2002).
55. Barton, L.L. & Mets, M.B. Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery. *Clin Infect Dis* **33**, 370-374 (2001).
56. Jamieson, D.J., Kourtis, A.P., Bell, M. & Rasmussen, S.A. Lymphocytic choriomeningitis virus: an emerging obstetric pathogen? *Am J Obstet Gynecol* **194**, 1532-1536 (2006).
57. Wright, R. *et al.* Congenital lymphocytic choriomeningitis virus syndrome: a disease that mimics congenital toxoplasmosis or Cytomegalovirus infection. *Pediatrics* **100**, E9 (1997).
58. Barton, L.L. & Mets, M.B. Lymphocytic choriomeningitis virus: pediatric pathogen and fetal teratogen. *Pediatr Infect Dis J* **18**, 540-541 (1999).
59. Borrow, P., Martinez-Sobrido, L. & de la Torre, J.C. Inhibition of the type I interferon antiviral response during arenavirus infection. *Viruses* **2**, 2443-2480 (2010).
60. Borrow, P., Tishon, A. & Oldstone, M.B. Infection of lymphocytes by a virus that aborts cytotoxic T lymphocyte activity and establishes persistent infection. *J Exp Med* **174**, 203-212 (1991).
61. Matloubian, M., Kolhekar, S.R., Somasundaram, T. & Ahmed, R. Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **67**, 7340-7349 (1993).
62. Cao, W. *et al.* Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**, 2079-2081 (1998).
63. Spiropoulou, C.F., Kunz, S., Rollin, P.E., Campbell, K.P. & Oldstone, M.B. New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J Virol* **76**, 5140-5146 (2002).
64. Henry, M.D. & Campbell, K.P. Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 625-631 (1996).
65. Jung, A. *et al.* Lymphocytoid choriomeningitis virus activates plasmacytoid dendritic cells and induces a cytotoxic T-cell response via MyD88. *J Virol* **82**, 196-206 (2008).
66. Walsh, K.B. *et al.* Toll-like receptor 7 is required for effective adaptive immune responses that prevent persistent virus infection. *Cell Host Microbe* **11**, 643-653 (2012).

67. Zhou, S. *et al.* Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection of CNS glial cells results in TLR2-MyD88/Mal-dependent inflammatory responses. *J Neuroimmunol* **194**, 70-82 (2008).
68. Zhou, S. *et al.* Induction and inhibition of type I interferon responses by distinct components of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **84**, 9452-9462 (2010).
69. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373-384 (2010).
70. Ishii, K.J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C. & Akira, S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* **3**, 352-363 (2008).
71. Biron, C.A., Nguyen, K.B. & Pien, G.C. Innate immune responses to LCMV infections: natural killer cells and cytokines. *Curr Top Microbiol Immunol* **263**, 7-27 (2002).
72. Louten, J., van Rooijen, N. & Biron, C.A. Type 1 IFN deficiency in the absence of normal splenic architecture during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* **177**, 3266-3272 (2006).
73. Lee, L.N., Burke, S., Montoya, M. & Borrow, P. Multiple mechanisms contribute to impairment of type 1 interferon production during chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. *J Immunol* **182**, 7178-7189 (2009).
74. 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).
75. Honda, K. *et al.* Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10872-10877 (2003).
76. Muller, U. *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918-1921 (1994).
77. Moskophidis, D. *et al.* Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to alpha/beta interferon and to gamma interferon. *J Virol* **68**, 1951-1955 (1994).
78. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**, 1219-1226 (2004).
79. Garcia-Sastre, A. & Biron, C.A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science* **312**, 879-882 (2006).

80. Montoya, M., Edwards, M.J., Reid, D.M. & Borrow, P. Rapid activation of spleen dendritic cell subsets following lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice: analysis of the involvement of type 1 IFN. *J Immunol* **174**, 1851-1861 (2005).
81. Rouzaut, A. *et al.* Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN- α . *Eur J Immunol* **40**, 3054-3063 (2010).
82. Hervas-Stubbs, S. *et al.* Conventional but not plasmacytoid dendritic cells foster the systemic virus-induced type I IFN response needed for efficient CD8 T cell priming. *J Immunol* **193**, 1151-1161 (2014).
83. Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
84. Lenz, L.L., Butz, E.A. & Bevan, M.J. Requirements for bone marrow-derived antigen-presenting cells in priming cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. *J Exp Med* **192**, 1135-1142 (2000).
85. Leonard, W.J. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* **1**, 200-208 (2001).
86. Noguchi, M. *et al.* Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* **73**, 147-157 (1993).
87. Rochman, Y., Spolski, R. & Leonard, W.J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* **9**, 480-490 (2009).
88. Peschon, J.J. *et al.* Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* **180**, 1955-1960 (1994).
89. Puel, A., Ziegler, S.F., Buckley, R.H. & Leonard, W.J. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet* **20**, 394-397 (1998).
90. Kieper, W.C. *et al.* Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8⁺ T cells. *J Exp Med* **195**, 1533-1539 (2002).
91. Carson, W.E. *et al.* A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* **99**, 937-943 (1997).
92. Ranson, T. *et al.* IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* **101**, 4887-4893 (2003).
93. Ozaki, K. *et al.* A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* **298**, 1630-1634 (2002).

94. Avery, D.T., Bryant, V.L., Ma, C.S., de Waal Malefyt, R. & Tangye, S.G. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J Immunol* **181**, 1767-1779 (2008).
95. 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).
96. Janas, M.L., Groves, P., Kienzle, N. & Kelso, A. IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8+ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol* **175**, 8003-8010 (2005).
97. 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).
98. 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).
99. Zeng, R. *et al.* Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med* **201**, 139-148 (2005).
100. Carrio, R., Rolle, C.E. & Malek, T.R. Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8+ memory T cells. *Eur J Immunol* **37**, 3078-3088 (2007).
101. Hand, T.W., Morre, M. & Kaech, S.M. 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 (2007).
102. Rubinstein, M.P. *et al.* IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8+ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood* **112**, 3704-3712 (2008).
103. Tan, J.T. *et al.* Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med* **195**, 1523-1532 (2002).
104. Rubinstein, M.P. *et al.* Systemic administration of IL-15 augments the antigen-specific primary CD8+ T cell response following vaccination with peptide-pulsed dendritic cells. *J Immunol* **169**, 4928-4935 (2002).
105. Yajima, T. *et al.* A novel role of IL-15 in early activation of memory CD8+ CTL after reinfection. *J Immunol* **174**, 3590-3597 (2005).
106. Yajima, T. *et al.* IL-15 regulates CD8+ T cell contraction during primary infection. *J Immunol* **176**, 507-515 (2006).

107. Decaluwe, H. *et al.* Gamma(c) deficiency precludes CD8+ T cell memory despite formation of potent T cell effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9311-9316 (2010).
108. Elo, L.L. *et al.* Genome-wide profiling of interleukin-4 and STAT6 transcription factor regulation of human Th2 cell programming. *Immunity* **32**, 852-862 (2010).
109. Holgate, S.T. & Polosa, R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* **8**, 218-230 (2008).
110. Hauber, H.P., Bergeron, C. & Hamid, Q. IL-9 in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* **134**, 79-87 (2004).
111. Waldmann, T.A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* **6**, 595-601 (2006).
112. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A. & Tagaya, Y. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* **17**, 537-547 (2002).
113. Bergamaschi, C. *et al.* Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15Ralpha in human and mouse serum. *Blood* **120**, e1-8 (2012).
114. Mortier, E., Woo, T., Advincula, R., Gozalo, S. & Ma, A. IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* **205**, 1213-1225 (2008).
115. Musso, T. *et al.* Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood* **93**, 3531-3539 (1999).
116. Kennedy, M.K. *et al.* Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 771-780 (2000).
117. Lodolce, J.P. *et al.* IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* **9**, 669-676 (1998).
118. Giri, J.G. *et al.* Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* **14**, 3654-3663 (1995).
119. Bamford, R.N. *et al.* The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4940-4944 (1994).
120. Giri, J.G. *et al.* Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J* **13**, 2822-2830 (1994).

121. Wang, X., Rickert, M. & Garcia, K.C. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. *Science* **310**, 1159-1163 (2005).
122. Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M.P., Surh, C.D. & Sprent, J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* **311**, 1924-1927 (2006).
123. Taniguchi, T. & Minami, Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* **73**, 5-8 (1993).
124. Cho, J.H. *et al.* An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2. *J Exp Med* **204**, 1787-1801 (2007).
125. Schluns, K.S. & Lefrancois, L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* **3**, 269-279 (2003).
126. Spolski, R. & Leonard, W.J. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 379-395 (2014).
127. Patidar, M., Yadav, N. & Dalai, S.K. Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* (2016).
128. Boyman, O. & Sprent, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* **12**, 180-190 (2012).
129. Williams, M.A. & Bevan, M.J. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* **25**, 171-192 (2007).
130. Kaech, S.M. & Ahmed, R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* **2**, 415-422 (2001).
131. Badovinac, V.P., Porter, B.B. & Harty, J.T. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* **5**, 809-817 (2004).
132. Garcia, K.C. *et al.* An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* **274**, 209-219 (1996).
133. Chothia, C., Boswell, D.R. & Lesk, A.M. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *EMBO J* **7**, 3745-3755 (1988).
134. Jorgensen, J.L., Esser, U., Fazekas de St Groth, B., Reay, P.A. & Davis, M.M. Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* **355**, 224-230 (1992).

135. Gibbings, D. & Befus, A.D. CD4 and CD8: an inside-out coreceptor model for innate immune cells. *J Leukoc Biol* **86**, 251-259 (2009).
136. Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. & Jordan, M.S. T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**, 591-619 (2009).
137. 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).
138. 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).
139. Schwartz, R.H. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**, 1065-1068 (1992).
140. Collins, A.V. *et al.* The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* **17**, 201-210 (2002).
141. Parry, R.V. *et al.* CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* **25**, 9543-9553 (2005).
142. Boomer, J.S. & Green, J.M. An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002436 (2010).
143. Chen, L. & Flies, D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* **13**, 227-242 (2013).
144. Frauwirth, K.A. *et al.* The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* **16**, 769-777 (2002).
145. Kundig, T.M. *et al.* Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* **5**, 41-52 (1996).
146. 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).
147. Halstead, E.S., Mueller, Y.M., Altman, J.D. & Katsikis, P.D. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8⁺ T cell responses. *Nat Immunol* **3**, 536-541 (2002).

148. Grujic, M. *et al.* The role of CD80/CD86 in generation and maintenance of functional virus-specific CD8⁺ T cells in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* **185**, 1730-1743 (2010).
149. Shedlock, D.J. *et al.* Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **170**, 2053-2063 (2003).
150. Andreasen, S.O., Christensen, J.E., Marker, O. & Thomsen, A.R. Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8⁺ effector T cell responses. *J Immunol* **164**, 3689-3697 (2000).
151. Masteller, E.L., Chuang, E., Mullen, A.C., Reiner, S.L. & Thompson, C.B. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol* **164**, 5319-5327 (2000).
152. Linsley, P.S. *et al.* Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* **1**, 793-801 (1994).
153. Rudd, C.E., Taylor, A. & Schneider, H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* **229**, 12-26 (2009).
154. Lee, K.M. *et al.* Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* **282**, 2263-2266 (1998).
155. 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).
156. 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).
157. Jin, H.T., Ahmed, R. & Okazaki, T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **350**, 17-37 (2011).
158. Sheppard, K.A. *et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* **574**, 37-41 (2004).
159. Paterson, D.J. *et al.* Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol Immunol* **24**, 1281-1290 (1987).
160. al-Shamkhani, A. *et al.* 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).

161. Rogers, P.R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N. & Croft, M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* **15**, 445-455 (2001).
162. Salek-Ardakani, S. *et al.* The TNFR family members OX40 and CD27 link viral virulence to protective T cell vaccines in mice. *J Clin Invest* **121**, 296-307 (2011).
163. 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).
164. 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).
165. Pollok, K.E. *et al.* Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* **150**, 771-781 (1993).
166. 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).
167. Croft, M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* **3**, 609-620 (2003).
168. 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).
169. Hendriks, J. *et al.* 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).
170. 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).
171. Humphreys, I.R. *et al.* Biphasic role of 4-1BB in the regulation of mouse cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* **40**, 2762-2768 (2010).
172. 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).
173. Bertram, E.M. *et al.* A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo. *J Immunol* **172**, 981-988 (2004).
174. 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).
175. Curtsinger, J.M. *et al.* Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol* **162**, 3256-3262 (1999).
 176. 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).
 177. 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).
 178. Agarwal, P. *et al.* Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. *J Immunol* **183**, 1695-1704 (2009).
 179. Pearce, E.L. & Shen, H. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J Immunol* **179**, 2074-2081 (2007).
 180. Vignali, D.A. & Kuchroo, V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* **13**, 722-728 (2012).
 181. 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).
 182. Valenzuela, J.O., Hammerbeck, C.D. & Mescher, M.F. Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. *J Immunol* **174**, 600-604 (2005).
 183. Curtsinger, J.M., Johnson, C.M. & Mescher, M.F. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol* **171**, 5165-5171 (2003).
 184. Wilson, D.C., Matthews, S. & Yap, G.S. IL-12 signaling drives CD8⁺ T cell IFN- γ production and differentiation of KLRG1⁺ effector subpopulations during *Toxoplasma gondii* Infection. *J Immunol* **180**, 5935-5945 (2008).
 185. Joshi, N.S. *et al.* Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8⁽⁺⁾ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* **27**, 281-295 (2007).
 186. Cruz-Guilloty, F. *et al.* Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med* **206**, 51-59 (2009).

187. Sullivan, B.M., Juedes, A., Szabo, S.J., von Herrath, M. & Glimcher, L.H. Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15818-15823 (2003).
188. Samuel, C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents (2001).
189. Ridge, J.P., Di Rosa, F. & Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474-478 (1998).
190. Bennett, S.R. *et al.* Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**, 478-480 (1998).
191. Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R. & Melief, C.J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480-483 (1998).
192. Bourgeois, C., Rocha, B. & Tanchot, C. A role for CD40 expression on CD8⁺ T cells in the generation of CD8⁺ T cell memory. *Science* **297**, 2060-2063 (2002).
193. Sun, J.C. & Bevan, M.J. Cutting edge: long-lived CD8 memory and protective immunity in the absence of CD40 expression on CD8 T cells. *J Immunol* **172**, 3385-3389 (2004).
194. Smith, C.M. *et al.* Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* **5**, 1143-1148 (2004).
195. Lee, B.O., Hartson, L. & Randall, T.D. CD40-deficient, influenza-specific CD8 memory T cells develop and function normally in a CD40-sufficient environment. *J Exp Med* **198**, 1759-1764 (2003).
196. Novy, P., Quigley, M., Huang, X. & Yang, Y. CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J Immunol* **179**, 8243-8251 (2007).
197. Riberdy, J.M., Christensen, J.P., Branum, K. & Doherty, P.C. Diminished primary and secondary influenza virus-specific CD8(+) T-cell responses in CD4-depleted Ig(-/-) mice. *J Virol* **74**, 9762-9765 (2000).
198. Wiesel, M. *et al.* Type-I IFN drives the differentiation of short-lived effector CD8⁺ T cells in vivo. *Eur J Immunol* **42**, 320-329 (2012).
199. Johnson, S. *et al.* Selected Toll-like receptor ligands and viruses promote helper-independent cytotoxic T cell priming by upregulating CD40L on dendritic cells. *Immunity* **30**, 218-227 (2009).

200. Wiesel, M., Kratky, W. & Oxenius, A. Type I IFN substitutes for T cell help during viral infections. *J Immunol* **186**, 754-763 (2011).
201. Sun, J.C., Williams, M.A. & Bevan, M.J. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* **5**, 927-933 (2004).
202. Sun, J.C. & Bevan, M.J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**, 339-342 (2003).
203. Williams, M.A., Tyznik, A.J. & Bevan, M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* **441**, 890-893 (2006).
204. Intlekofer, A.M. *et al.* Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8+ T cells. *J Exp Med* **204**, 2015-2021 (2007).
205. Janssen, E.M. *et al.* CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* **434**, 88-93 (2005).
206. 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).
207. Sacks, J.A. & Bevan, M.J. TRAIL deficiency does not rescue impaired CD8+ T cell memory generated in the absence of CD4+ T cell help. *J Immunol* **180**, 4570-4576 (2008).
208. Butcher, E.C. & Picker, L.J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60-66 (1996).
209. Neutra, M.R. & Kozlowski, P.A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* **6**, 148-158 (2006).
210. Masopust, D. & Schenkel, J.M. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol* **13**, 309-320 (2013).
211. 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).
212. Kerdiles, Y.M. *et al.* Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* **10**, 176-184 (2009).
213. Forster, R. *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33 (1999).

214. Okada, T. & Cyster, J.G. CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. *J Immunol* **178**, 2973-2978 (2007).
215. Pham, T.H., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C.G. & Cyster, J.G. S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* **28**, 122-133 (2008).
216. Shioy, L.R. *et al.* CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* **440**, 540-544 (2006).
217. Kohlmeier, J.E. *et al.* The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8⁺ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity* **29**, 101-113 (2008).
218. Kohlmeier, J.E. *et al.* CXCR3 directs antigen-specific effector CD4⁺ T cell migration to the lung during parainfluenza virus infection. *J Immunol* **183**, 4378-4384 (2009).
219. Johansson-Lindbom, B. & Agace, W.W. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol Rev* **215**, 226-242 (2007).
220. von Andrian, U.H. & Mackay, C.R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* **343**, 1020-1034 (2000).
221. Woodland, D.L. & Kohlmeier, J.E. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* **9**, 153-161 (2009).
222. Klonowski, K.D. *et al.* Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration in vivo. *Immunity* **20**, 551-562 (2004).
223. Sung, J.H. *et al.* Chemokine guidance of central memory T cells is critical for antiviral recall responses in lymph nodes. *Cell* **150**, 1249-1263 (2012).
224. Kaech, S.M., Wherry, E.J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **2**, 251-262 (2002).
225. Sarkar, S. *et al.* Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* **205**, 625-640 (2008).
226. Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* **111**, 837-851 (2002).
227. Pearce, E.L., Poffenberger, M.C., Chang, C.H. & Jones, R.G. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* **342**, 1242454 (2013).

228. 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).
229. Kaech, S.M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **12**, 749-761 (2012).
230. Kaech, S.M. *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**, 1191-1198 (2003).
231. Obar, J.J. *et al.* Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* **187**, 4967-4978 (2011).
232. Kagi, D. *et al.* Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* **369**, 31-37 (1994).
233. Zhang, N. & Bevan, M.J. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* **35**, 161-168 (2011).
234. Araki, K. *et al.* mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* **460**, 108-112 (2009).
235. Pearce, E.L. *et al.* Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* **460**, 103-107 (2009).
236. Wang, R. & Green, D.R. Metabolic checkpoints in activated T cells. *Nat Immunol* **13**, 907-915 (2012).
237. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269-270 (1956).
238. Jacobs, S.R. *et al.* Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol* **180**, 4476-4486 (2008).
239. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. & Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029-1033 (2009).
240. Cham, C.M., Driessens, G., O'Keefe, J.P. & Gajewski, T.F. Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8+ T cells. *Eur J Immunol* **38**, 2438-2450 (2008).
241. Greiner, E.F., Guppy, M. & Brand, K. Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production. *J Biol Chem* **269**, 31484-31490 (1994).

242. Chang, C.H. *et al.* Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* **153**, 1239-1251 (2013).
243. Finlay, D.K. *et al.* PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8⁺ T cells. *J Exp Med* **209**, 2441-2453 (2012).
244. Cham, C.M. & Gajewski, T.F. Glucose availability regulates IFN-gamma production and p70S6 kinase activation in CD8⁺ effector T cells. *J Immunol* **174**, 4670-4677 (2005).
245. Doedens, A.L. *et al.* Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol* **14**, 1173-1182 (2013).
246. 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).
247. Keppler, S.J., Theil, K., Vucikuj, S. & Aichele, P. Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: Role of direct IL-12 signals for cell fate decision of CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* **39**, 1774-1783 (2009).
248. Plumlee, C.R., Sheridan, B.S., Cicek, B.B. & Lefrancois, L. Environmental cues dictate the fate of individual CD8⁺ T cells responding to infection. *Immunity* **39**, 347-356 (2013).
249. 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).
250. Pipkin, M.E. *et al.* Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* **32**, 79-90 (2010).
251. Pearce, E.L. *et al.* Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* **302**, 1041-1043 (2003).
252. Intlekofer, A.M. *et al.* Anomalous type 17 response to viral infection by CD8⁺ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* **321**, 408-411 (2008).
253. Lazarevic, V., Glimcher, L.H. & Lord, G.M. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 777-789 (2013).
254. Robbins, S.H., Tessmer, M.S., Van Kaer, L. & Brossay, L. Direct effects of T-bet and MHC class I expression, but not STAT1, on peripheral NK cell maturation. *Eur J Immunol* **35**, 757-765 (2005).

255. Intlekofer, A.M. *et al.* Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* **6**, 1236-1244 (2005).
256. Rao, R.R., Li, Q., Odunsi, K. & Shrikant, P.A. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8⁺ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* **32**, 67-78 (2010).
257. Hosaka, T. *et al.* Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2975-2980 (2004).
258. Calnan, D.R. & Brunet, A. The FoxO code. *Oncogene* **27**, 2276-2288 (2008).
259. Peng, S.L. Foxo in the immune system. *Oncogene* **27**, 2337-2344 (2008).
260. Sullivan, J.A., Kim, E.H., Plisch, E.H., Peng, S.L. & Suresh, M. FOXO3 regulates CD8 T cell memory by T cell-intrinsic mechanisms. *PLoS Pathog* **8**, e1002533 (2012).
261. Kim, M.V., Ouyang, W., Liao, W., Zhang, M.Q. & Li, M.O. The transcription factor Foxo1 controls central-memory CD8⁺ T cell responses to infection. *Immunity* **39**, 286-297 (2013).
262. Michelini, R.H., Doedens, A.L., Goldrath, A.W. & Hedrick, S.M. Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1. *J Exp Med* **210**, 1189-1200 (2013).
263. Tejera, M.M., Kim, E.H., Sullivan, J.A., Plisch, E.H. & Suresh, M. FoxO1 controls effector-to-memory transition and maintenance of functional CD8 T cell memory. *J Immunol* **191**, 187-199 (2013).
264. 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).
265. Kalia, V. *et al.* Prolonged interleukin-2R α expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* **32**, 91-103 (2010).
266. Kwon, H. *et al.* Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity* **31**, 941-952 (2009).
267. Xin, A. *et al.* A molecular threshold for effector CD8 T cell differentiation controlled by transcription factors Blimp-1 and T-bet. *Nat Immunol* (2016).
268. Gong, D. & Malek, T.R. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. *J Immunol* **178**, 242-252 (2007).

269. Rutishauser, R.L. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* **31**, 296-308 (2009).
270. 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+ T cells. *Immunity* **35**, 792-805 (2011).
271. Kallies, A., Xin, A., Belz, G.T. & Nutt, S.L. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* **31**, 283-295 (2009).
272. Shin, H. *et al.* A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **31**, 309-320 (2009).
273. Boulet, S., Daudelin, J.F. & Labrecque, N. IL-2 induction of Blimp-1 is a key in vivo signal for CD8+ short-lived effector T cell differentiation. *J Immunol* **193**, 1847-1854 (2014).
274. Yoshida, K. *et al.* Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8+ T cells. *Eur J Immunol* **36**, 3146-3156 (2006).
275. Oestreich, K.J., Huang, A.C. & Weinmann, A.S. The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J Exp Med* **208**, 1001-1013 (2011).
276. Oestreich, K.J., Mohn, S.E. & Weinmann, A.S. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nat Immunol* **13**, 405-411 (2012).
277. Shin, H.M. *et al.* Epigenetic modifications induced by Blimp-1 Regulate CD8(+) T cell memory progression during acute virus infection. *Immunity* **39**, 661-675 (2013).
278. Ichii, H. *et al.* Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* **3**, 558-563 (2002).
279. Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y. & Tokuhsa, T. Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells. *J Immunol* **173**, 883-891 (2004).
280. Ji, Y. *et al.* Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* **12**, 1230-1237 (2011).
281. Yang, C.Y. *et al.* The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat Immunol* **12**, 1221-1229 (2011).

282. Cannarile, M.A. *et al.* Transcriptional regulator Id2 mediates CD8⁺ T cell immunity. *Nat Immunol* **7**, 1317-1325 (2006).
283. Rao, R.R., Li, Q., Gubbels Bupp, M.R. & Shrikant, P.A. Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8⁽⁺⁾ T cell differentiation. *Immunity* **36**, 374-387 (2012).
284. Peters, P.J. *et al.* Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* **173**, 1099-1109 (1991).
285. Liu, C.C., Walsh, C.M. & Young, J.D. Perforin: structure and function. *Immunol Today* **16**, 194-201 (1995).
286. Voskoboinik, I. *et al.* Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem* **280**, 8426-8434 (2005).
287. Kawasaki, Y. *et al.* Cell death-associated translocation of plasma membrane components induced by CTL. *J Immunol* **164**, 4641-4648 (2000).
288. Metkar, S.S. *et al.* Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* **16**, 417-428 (2002).
289. Motyka, B. *et al.* Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* **103**, 491-500 (2000).
290. McNeil, P.L. & Steinhardt, R.A. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 697-731 (2003).
291. Reddy, A., Caler, E.V. & Andrews, N.W. Plasma membrane repair is mediated by Ca⁽²⁺⁾-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* **106**, 157-169 (2001).
292. Nakajima, H., Park, H.L. & Henkart, P.A. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J Exp Med* **181**, 1037-1046 (1995).
293. Beresford, P.J., Kam, C.M., Powers, J.C. & Lieberman, J. Recombinant human granzyme A binds to two putative HLA-associated proteins and cleaves one of them. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9285-9290 (1997).
294. Metkar, S.S. *et al.* Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol* **160**, 875-885 (2003).

295. Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A. & Trapani, J.A. Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol* **84**, 72-78 (2006).
296. Carrington, P.E. *et al.* The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell* **22**, 599-610 (2006).
297. Krammer, P.H., Arnold, R. & Lavrik, I.N. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* **7**, 532-542 (2007).
298. Harty, J.T. & Bevan, M.J. Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol* **11**, 89-93 (1999).
299. Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **5**, 189-200 (2005).
300. Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**, 1675-1687 (1998).
301. You, H. *et al.* FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med* **203**, 1657-1663 (2006).
302. Willis, S.N. *et al.* Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**, 856-859 (2007).
303. Hildeman, D.A. *et al.* Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* **16**, 759-767 (2002).
304. 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).
305. Sandalova, E., Wei, C.H., Masucci, M.G. & Levitsky, V. Regulation of expression of Bcl-2 protein family member Bim by T cell receptor triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3011-3016 (2004).
306. 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).
307. Schmitz, I. *et al.* 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).
308. Schmitz, I. *et al.* An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol* **171**, 2930-2936 (2003).

309. Osborne, L.C. *et al.* Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *J Exp Med* **204**, 619-631 (2007).
310. Sandau, M.M., Kohlmeier, J.E., Woodland, D.L. & Jameson, S.C. IL-15 regulates both quantitative and qualitative features of the memory CD8 T cell pool. *J Immunol* **184**, 35-44 (2010).
311. 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).
312. Malek, T.R. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* **26**, 453-479 (2008).
313. Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* **6**, 1142-1151 (2005).
314. Malek, T.R. & Castro, I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* **33**, 153-165 (2010).
315. Yu, A., Zhu, L., Altman, N.H. & Malek, T.R. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity* **30**, 204-217 (2009).
316. Barron, L. *et al.* Cutting edge: mechanisms of IL-2-dependent maintenance of functional regulatory T cells. *J Immunol* **185**, 6426-6430 (2010).
317. Granucci, F. *et al.* Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* **2**, 882-888 (2001).
318. 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).
319. 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).
320. D'Souza, W.N. & Lefrancois, L. Frontline: An in-depth evaluation of the production of IL-2 by antigen-specific CD8 T cells in vivo. *Eur J Immunol* **34**, 2977-2985 (2004).
321. Sojka, D.K., Bruniquel, D., Schwartz, R.H. & Singh, N.J. IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. *J Immunol* **172**, 6136-6143 (2004).

322. Bachmann, M.F., Wolint, P., Walton, S., Schwarz, K. & Oxenius, A. Differential role of IL-2R signaling for CD8⁺ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur J Immunol* **37**, 1502-1512 (2007).
323. Cox, M.A., Harrington, L.E. & Zajac, A.J. Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends Immunol* **32**, 180-186 (2011).
324. Malek, T.R., Yu, A., Scibelli, P., Lichtenheld, M.G. & Codias, E.K. Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. *J Immunol* **166**, 1675-1683 (2001).
325. Cousens, L.P., Orange, J.S. & Biron, C.A. Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* **155**, 5690-5699 (1995).
326. D'Souza, W.N. & Lefrancois, L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol* **171**, 5727-5735 (2003).
327. Obar, J.J. *et al.* CD4⁺ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8⁺ T cells in primary and secondary responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 193-198 (2010).
328. D'Souza, W.N., Schluns, K.S., Masopust, D. & Lefrancois, L. Essential role for IL-2 in the regulation of antiviral extralymphoid CD8 T cell responses. *J Immunol* **168**, 5566-5572 (2002).
329. Colpitts, S.L. *et al.* Cutting edge: the role of IFN-alpha receptor and MyD88 signaling in induction of IL-15 expression in vivo. *J Immunol* **188**, 2483-2487 (2012).
330. Zhou, R., Wei, H., Sun, R., Zhang, J. & Tian, Z. NKG2D recognition mediates Toll-like receptor 3 signaling-induced breakdown of epithelial homeostasis in the small intestines of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7512-7515 (2007).
331. Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R. & Farrar, M.A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* **178**, 280-290 (2007).
332. Ma, A., Koka, R. & Burkett, P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* **24**, 657-679 (2006).
333. Becker, T.C. *et al.* Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 1541-1548 (2002).
334. Hand, T.W. *et al.* Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16601-16606 (2010).

335. Lai, Y.G. *et al.* IL-15 modulates the balance between Bcl-2 and Bim via a Jak3/1-PI3K-Akt-ERK pathway to promote CD8 α CD8 α ⁺ intestinal intraepithelial lymphocyte survival. *Eur J Immunol* **43**, 2305-2316 (2013).
336. Shenoy, A.R., Kirschnek, S. & Hacker, G. IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells. *Eur J Immunol* **44**, 2500-2507 (2014).
337. Ota, N., Takase, M., Uchiyama, H., Olsen, S.K. & Kanagawa, O. No requirement of trans presentations of IL-15 for human CD8 T cell proliferation. *J Immunol* **185**, 6041-6048 (2010).
338. Cornish, G.H., Sinclair, L.V. & Cantrell, D.A. Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood* **108**, 600-608 (2006).
339. Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X. & Lefrancois, L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* **168**, 4827-4831 (2002).
340. Sanjabi, S., Mosaheb, M.M. & Flavell, R.A. Opposing effects of TGF- β and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8⁺ T cells. *Immunity* **31**, 131-144 (2009).
341. Strengell, M., Sareneva, T., Foster, D., Julkunen, I. & Matikainen, S. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. *J Immunol* **169**, 3600-3605 (2002).
342. Allgauer, A. *et al.* IL-7 Abrogates the Immunosuppressive Function of Human Double-Negative T Cells by Activating Akt/mTOR Signaling. *J Immunol* **195**, 3139-3148 (2015).
343. Johnson, S.E., Shah, N., Bajer, A.A. & LeBien, T.W. IL-7 activates the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in normal human thymocytes but not normal human B cell precursors. *J Immunol* **180**, 8109-8117 (2008).
344. Klonowski, K.D., Williams, K.J., Marzo, A.L. & Lefrancois, L. Cutting edge: IL-7-independent regulation of IL-7 receptor α expression and memory CD8 T cell development. *J Immunol* **177**, 4247-4251 (2006).
345. Nanjappa, S.G., Walent, J.H., Morre, M. & Suresh, M. Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *J Clin Invest* **118**, 1027-1039 (2008).
346. Haring, J.S. *et al.* Constitutive expression of IL-7 receptor α does not support increased expansion or prevent contraction of antigen-specific CD4 or CD8 T cells following *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **180**, 2855-2862 (2008).

347. Leonard, W.J. & Spolski, R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* **5**, 688-698 (2005).
348. Parrish-Novak, J. *et al.* Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* **408**, 57-63 (2000).
349. Ostiguy, V., Allard, E.L., Marquis, M., Leignadier, J. & Labrecque, N. IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *J Leukoc Biol* **82**, 645-656 (2007).
350. Elsaesser, H., Sauer, K. & Brooks, D.G. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* **324**, 1569-1572 (2009).
351. Barker, B.R., Gladstone, M.N., Gillard, G.O., Panas, M.W. & Letvin, N.L. Critical role for IL-21 in both primary and memory anti-viral CD8⁺ T-cell responses. *Eur J Immunol* **40**, 3085-3096 (2010).
352. 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).
353. Moroz, A. *et al.* IL-21 enhances and sustains CD8⁺ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *J Immunol* **173**, 900-909 (2004).
354. Suto, A., Wurster, A.L., Reiner, S.L. & Grusby, M.J. IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J Immunol* **177**, 3721-3727 (2006).
355. Ring, A.M. *et al.* Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat Immunol* **13**, 1187-1195 (2012).
356. Dubois, S.P., Waldmann, T.A. & Muller, J.R. Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8662-8667 (2005).
357. Ohteki, T. *et al.* Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J Exp Med* **203**, 2329-2338 (2006).
358. Blattman, J.N. *et al.* Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 657-664 (2002).
359. Veiga-Fernandes, H. & Rocha, B. High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division. *Nat Immunol* **5**, 31-37 (2004).

360. 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).
361. 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).
362. 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).
363. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L. & Lefrancois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**, 2413-2417 (2001).
364. Gebhardt, T. *et al.* Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol* **10**, 524-530 (2009).
365. Jiang, X. *et al.* Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* **483**, 227-231 (2012).
366. Surh, C.D. & Sprent, J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* **29**, 848-862 (2008).
367. Wherry, E.J. *et al.* Homeostatic proliferation but not the generation of virus specific memory CD8 T cells is impaired in the absence of IL-15 or IL-15Ralpha. *Adv Exp Med Biol* **512**, 165-175 (2002).
368. Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S. & Tough, D.F. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol* **170**, 5018-5026 (2003).
369. Goldrath, A.W. *et al.* Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* **195**, 1515-1522 (2002).
370. 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).
371. Gubser, P.M. *et al.* Rapid effector function of memory CD8+ T cells requires an immediate-early glycolytic switch. *Nat Immunol* **14**, 1064-1072 (2013).
372. Sukumar, M. *et al.* Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest* **123**, 4479-4488 (2013).
373. van der Windt, G.J. *et al.* Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity* **36**, 68-78 (2012).

374. van der Windt, G.J. *et al.* CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14336-14341 (2013).
375. Murali-Krishna, K. *et al.* Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* **286**, 1377-1381 (1999).
376. 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).
377. Wherry, E.J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* **4**, 225-234 (2003).
378. Masopust, D. *et al.* Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med* **207**, 553-564 (2010).
379. Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Barber, D.L. & Ahmed, R. Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population. *J Immunol* **176**, 2079-2083 (2006).
380. Casey, K.A. *et al.* Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J Immunol* **188**, 4866-4875 (2012).
381. Schenkel, J.M., Fraser, K.A., Vezys, V. & Masopust, D. Sensing and alarm function of resident memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol* **14**, 509-513 (2013).
382. Sheridan, B.S. *et al.* Oral infection drives a distinct population of intestinal resident memory CD8(+) T cells with enhanced protective function. *Immunity* **40**, 747-757 (2014).
383. Jung, Y.W., Rutishauser, R.L., Joshi, N.S., Haberman, A.M. & Kaech, S.M. Differential localization of effector and memory CD8 T cell subsets in lymphoid organs during acute viral infection. *J Immunol* **185**, 5315-5325 (2010).
384. Roberts, A.D., Ely, K.H. & Woodland, D.L. Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *J Exp Med* **202**, 123-133 (2005).
385. Bouneaud, C., Garcia, Z., Kourilsky, P. & Pannetier, C. Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo. *J Exp Med* **201**, 579-590 (2005).
386. Mackay, L.K. *et al.* The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol* **14**, 1294-1301 (2013).

387. Skon, C.N. *et al.* Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* **14**, 1285-1293 (2013).
388. Anderson, K.G. *et al.* Cutting edge: intravascular staining redefines lung CD8 T cell responses. *J Immunol* **189**, 2702-2706 (2012).
389. Schenkel, J.M., Fraser, K.A. & Masopust, D. Cutting edge: resident memory CD8 T cells occupy frontline niches in secondary lymphoid organs. *J Immunol* **192**, 2961-2964 (2014).
390. Mackay, L.K. *et al.* Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J Immunol* **194**, 2059-2063 (2015).
391. Ely, K.H., Cookenham, T., Roberts, A.D. & Woodland, D.L. Memory T cell populations in the lung airways are maintained by continual recruitment. *J Immunol* **176**, 537-543 (2006).
392. Bergsbaken, T. & Bevan, M.J. Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8(+) T cells responding to infection. *Nat Immunol* **16**, 406-414 (2015).
393. Mackay, L.K. *et al.* T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-beta and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity* **43**, 1101-1111 (2015).
394. Gaide, O. *et al.* Common clonal origin of central and resident memory T cells following skin immunization. *Nat Med* **21**, 647-653 (2015).
395. Ariotti, S. *et al.* Tissue-resident memory CD8⁺ T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 19739-19744 (2012).
396. Ariotti, S. *et al.* T cell memory. Skin-resident memory CD8(+) T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science* **346**, 101-105 (2014).
397. Mizukawa, Y. *et al.* Direct evidence for interferon-gamma production by effector-memory-type intraepidermal T cells residing at an effector site of immunopathology in fixed drug eruption. *Am J Pathol* **161**, 1337-1347 (2002).
398. Cheuk, S. *et al.* Epidermal Th22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. *J Immunol* **192**, 3111-3120 (2014).
399. Sathaliyawala, T. *et al.* Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* **38**, 187-197 (2013).

400. Thome, J.J. *et al.* Spatial map of human T cell compartmentalization and maintenance over decades of life. *Cell* **159**, 814-828 (2014).
401. Badovinac, V.P. & Harty, J.T. Manipulating the rate of memory CD8+ T cell generation after acute infection. *J Immunol* **179**, 53-63 (2007).
402. Banerjee, A. *et al.* Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol* **185**, 4988-4992 (2010).
403. Joshi, N.S. *et al.* Increased numbers of preexisting memory CD8 T cells and decreased T-bet expression can restrain terminal differentiation of secondary effector and memory CD8 T cells. *J Immunol* **187**, 4068-4076 (2011).
404. Fabre, S. *et al.* FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* **181**, 2980-2989 (2008).
405. Macintyre, A.N. *et al.* Protein kinase B controls transcriptional programs that direct cytotoxic T cell fate but is dispensable for T cell metabolism. *Immunity* **34**, 224-236 (2011).
406. Finlay, D. & Cantrell, D.A. Metabolism, migration and memory in cytotoxic T cells. *Nat Rev Immunol* **11**, 109-117 (2011).
407. Salih, D.A. & Brunet, A. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 126-136 (2008).
408. Sinclair, L.V. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* **9**, 513-521 (2008).
409. Oestreich, K.J. *et al.* Bcl-6 directly represses the gene program of the glycolysis pathway. *Nat Immunol* **15**, 957-964 (2014).
410. 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).
411. 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).
412. Schenkel, J.M. *et al.* IL-15-Independent Maintenance of Tissue-Resident and Boosted Effector Memory CD8 T Cells. *J Immunol* **196**, 3920-3926 (2016).

413. Ohta, N. *et al.* IL-15-dependent activation-induced cell death-resistant Th1 type CD8 alpha beta+ NK1.1+ T cells for the development of small intestinal inflammation. *J Immunol* **169**, 460-468 (2002).
414. Allard, E.L. *et al.* Overexpression of IL-21 promotes massive CD8+ memory T cell accumulation. *Eur J Immunol* **37**, 3069-3077 (2007).
415. Tian, Y. *et al.* A Context-Dependent Role for IL-21 in Modulating the Differentiation, Distribution, and Abundance of Effector and Memory CD8 T Cell Subsets. *J Immunol* (2016).
416. Liu, S. *et al.* IL-21 synergizes with IL-7 to augment expansion and anti-tumor function of cytotoxic T cells. *Int Immunol* **19**, 1213-1221 (2007).
417. Nolz, J.C. & Harty, J.T. IL-15 regulates memory CD8+ T cell O-glycan synthesis and affects trafficking. *J Clin Invest* **124**, 1013-1026 (2014).
418. Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* **342**, 559-561 (1989).
419. Dutko, F.J. & Oldstone, M.B. Genomic and biological variation among commonly used lymphocytic choriomeningitis virus strains. *J Gen Virol* **64 (Pt 8)**, 1689-1698 (1983).
420. Battegay, M. *et al.* Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J Virol Methods* **33**, 191-198 (1991).
421. Hammerschmidt, S.I. *et al.* Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J Exp Med* **205**, 2483-2490 (2008).
422. Iwata, M. *et al.* Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* **21**, 527-538 (2004).
423. Blattman, J.N. *et al.* Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nat Med* **9**, 540-547 (2003).
424. Chang, J.T., Wherry, E.J. & Goldrath, A.W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol* **15**, 1104-1115 (2014).
425. Hikono, H. *et al.* Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells. *J Exp Med* **204**, 1625-1636 (2007).

426. Masopust, D., Ha, S.J., Vezys, V. & Ahmed, R. Stimulation history dictates memory CD8 T cell phenotype: implications for prime-boost vaccination. *J Immunol* **177**, 831-839 (2006).
427. 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).
428. Prlic, M., Hernandez-Hoyos, G. & Bevan, M.J. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J Exp Med* **203**, 2135-2143 (2006).
429. Liao, W. *et al.* Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014).
430. Zehn, D., Lee, S.Y. & Bevan, M.J. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* **458**, 211-214 (2009).
431. Ghany, M.G., Strader, D.B., Thomas, D.L., Seeff, L.B. & American Association for the Study of Liver, D. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* **49**, 1335-1374 (2009).
432. Thompson, M.A. *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* **304**, 321-333 (2010).
433. McLean, L.P. & Cross, R.K. Integrin antagonists as potential therapeutic options for the treatment of Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs* **25**, 263-273 (2016).

Title: IL-2 and IL-15 regulate CD8 memory T cell differentiation but are dispensable for protective recall responses

Cédric Mathieu^{1,2}, Jean-Christophe Beltra^{1,2}, Tania Charpentier³, Sara Bourbonnais¹, James P. Di Santo⁴, Alain Lamarre³, and Hélène Decaluwe^{1,2,5,*}

¹Cytokines and Adaptive Immunity Laboratory, CHU Sainte-Justine Research Center, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³Immunovirology Laboratory, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada

⁴Innate Immunity Laboratory, INSERM U668, Institut Pasteur, Paris, France

⁵Immunology and Rheumatology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

*Corresponding author: Hélène Decaluwe, MD PhD

Postal address: CHU Sainte-Justine, 3175 Cote-Sainte-Catherine, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada

Phone number: 1-514-345-4713, Fax: 1-514-345-4897

Email: helene.decaluwe@umontreal.ca

Key words: IL-2, IL-15, Memory, CD8, Cytokines

Abbreviations: **Akt**: AK-transforming/protein kinase B, **Bcl-2**: B cell lymphoma 2, **Bcl6**: B cell lymphoma 6, **Bim**: Bcl-2-interacting mediator of cell death, **Blimp-1**: B lymphocyte-induced maturation protein-1, **Eomes**: Eomesodermin, **Foxo**: forkhead-box O, γ_c : common gamma chain, **Grz B**: Granzyme B, **GP₃₃₋₄₁**: glycoprotein 33-41, **IL2R β** : IL-2 receptor beta chain, **LCMV**: lymphocytic choriomeningitis virus, **MPECs**: memory precursor effector cells, **SLECs**: short-lived effector cells, **STAT5**: Signal transducer and activator of transcription 5, **T_{CM}**: central memory T cells, **T_{EM}**: effector memory T cells.

Summary

The ability to mount effective secondary responses is a cardinal feature of memory CD8 T cells. An understanding of the factors that regulate the generation and recall capacities of memory T cells remains to be ascertained. Several cues indicate that two highly related cytokines, IL-2 and IL-15, share redundant functions in this process. To establish their combined roles in memory CD8 T cell development, maintenance and secondary responses, we compared the outcome of adoptively transferred IL2R β ^{+/-} or IL2R β ^{-/-} CD8 T cells after an acute viral infection. Our results demonstrate that IL-2 and IL-15 signals condition the differentiation of primary and secondary short-lived effector cells by altering the transcriptional network governing lineage choices. These two cytokines also regulate the homeostasis of the memory T cell pool, with effector memory CD8 T cells being the most sensitive to these two interleukins. Noticeably, the inability to respond to both cytokines limits the proliferation and survival of primary and secondary effector cells, whereas it does not preclude potent cytotoxic functions and viral control either initially or upon rechallenge. Globally, these results indicate that lack of IL-2 and IL-15 signaling modulates the CD8 T cell differentiation program but does not impede adequate effector functions.

Introduction

CD8 T lymphocytes are the cornerstones of anti-viral immunity and the critical pawns in the chess game against intracellular pathogens. Development of functional CD8 memory T cells is a tightly regulated process during which cells pass through an effector state before establishing long-term immune protection.[1] The recognition of pathogen-encoded peptides and their stimulation through costimulatory and cytokine signals initiate a specific transcriptional program critical for CD8 T cell lineage choices and functions.[2, 3] As the memory T cell pool is the direct progeny of these effector cells, understanding the cellular and molecular mechanisms involved in the transition from cytotoxic T lymphocytes (CTLs) to memory cells constitutes an area of intense investigation.

In the quest to dissect these mechanisms, two effector CD8 T cell populations were identified, based on their distinct expression of CD127 and KLRG1, and correlated with their propensity to persist and become memory.[4-6] While KLRG1^{hi} CD127^{lo} Short-Lived Effector Cells (SLECs) are destined to become terminal effectors, KLRG1^{lo} CD127^{hi} Memory Precursor Effector Cells (MPECs) are fated to develop into long-lived memory cells. Since, multiple factors were shown to modulate the lineage choices between these two effector subsets. Limited antigenic stimulation preferentially commits effector CD8⁺ T cells toward a MPEC phenotype while prolonged antigen encounter promotes terminal SLEC differentiation.[7, 8] Similarly, inflammatory cytokines (in particular IL-12) enhance SLEC generation in a T-bet dependent manner, whereas low levels of inflammation favor memory formation.[6, 9] Finally, cytokines that signal through the common gamma (γ_c) chain (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21) modify the CD8 T cell differentiation program upon infection and are indispensable for the generation of CD8 memory T cells.[10] While IL-7 promotes MPEC and CD8 memory T cell survival,[11] IL-2 and IL-15 cooperate to sustain SLEC proliferation, differentiation and survival.[9, 10, 12-15] IL-15 is also a pivotal cytokine involved in the maintenance and homeostatic proliferation

of the CD8 memory T cell pool.[16, 17] Interestingly, IL-21, which is critical during chronic viral infection to limit exhaustion, has a minimal role on SLEC/MPEC lineage choices and CD8 memory T cell formation during an acute viral infection in help-independent infection models.[18]

While the role of γ_c -dependent signals on CD8 memory T cell development is indisputable, the biological impact of IL-2 and IL-15 on CD8 memory T cell functions remains controversial. Studies have demonstrated a critical role for IL-2 in the regulation of Blimp-1 and Eomes transcription,[9, 12] two transcription factors that have an opposite effect on the development of CD8 memory T cells.[19-21] Moreover, some authors suggest that IL-2 present at the time of priming sustain the expansion of secondary effectors, while others do not.[9, 14, 22, 23] Conversely, IL-15, a γ_c -cytokine closely-related to IL-2, appears dispensable for secondary effector expansion, while it may affect secondary T_{EM} differentiation.[15, 24] Thus, while IL-2 and IL-15 are known to modify the differentiation of effectors, their impact on the generation and maintenance of central memory (T_{CM}) and effector memory (T_{EM}) CD8 T cells, and ultimately on their capacity to mount protective responses, remains ill-defined.

IL-2 and IL-15 not only share the γ_c and IL2R β chains, they similarly activate JAK1, JAK3 and STAT5. Moreover, upon ligation of the appropriate cytokine, their quaternary receptor structure is nearly indistinguishable from each other.[25, 26] We thus hypothesized that, in light of their common receptor components and signaling pathways, IL-2 and IL-15 likely co-regulate similar genes and share redundant functions during an immune response. To circumvent the compensatory impact of one cytokine in the absence of the other, we decided to evaluate the role of combined IL-2 and IL-15 signals on CD8 memory T cell function. To do so, we used a P14 TCR transgenic mice model deficient for the IL2R β chain and found that IL2R β signals condition the expansion and differentiation of primary SLECs in a more profound manner than what was reported in the absence of either IL-2 or IL-15.[9, 12, 14-16]. This supports the concept of biological

redundancy of these cytokines *in vivo*. We also found that IL-2 and IL-15 were pivotal for the generation of T_{EM} and secondary SLECs. However, these cytokines were dispensable for adequate effector functions, by both primary and secondary effectors, despite significantly lower numbers of effector cells and reduced granzyme levels. Hence, our findings attest of the central role for IL-2 and IL-15 in the proliferation, survival and differentiation of primary and secondary effectors during an acute viral infection, and in the maintenance of the CD8 T_{EM} pool.

Results

IL-2 and IL-15 sustain the survival and proliferation of effectors and their differentiation in SLECs

To abrogate specifically combined IL-2 and IL-15 signals in CD8 T cells, we generated a mouse model carrying a deletion in the IL2R β chain. This TCR transgenic mouse (P14) on the Rag2 deficient background harbors a monoclonal population of naïve CD8 T cell specific for the envelope glycoprotein epitope 33-41 (GP₃₃₋₄₁) of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) (**Fig. S1**). 10^5 P14 IL2R $\beta^{-/-}$ or IL2R $\beta^{+/-}$ CD8 T cells were adoptively transferred into naïve C57BL/6 recipients 20h prior to LCMV Armstrong infection. This strain of virus causes an acute infection in mice, with pathogen clearance in 7 to 10 days.[27] Although IL2R $\beta^{+/-}$ and IL2R $\beta^{-/-}$ cells proliferated initially with the same kinetics, the peak of expansion was significantly reduced in IL2R $\beta^{-/-}$ T cells by day 7 ($38,6 \cdot 10^6$ versus $10,9 \cdot 10^6$ antigen-specific cells respectively, $p=0,0001$) (**Fig. 1A**). This hampered expansion could be explained by a reduced proliferation rate, as depicted by the lower percentage of Ki-67⁺ IL2R $\beta^{-/-}$ cells (80% versus 90% in IL2R $\beta^{+/-}$ cells), and an increased apoptosis, both in terms of active caspase-3 and Annexin V/7-AAD expression (14% and 27% of IL2R $\beta^{-/-}$ being caspase-3⁺ or Annexin V⁺ 7-AAD⁺ as opposed to 7% and 17% of the IL2R $\beta^{+/-}$ cells at day 7, $p=0,0033$) (**Fig. 1B upper panel, S2A**). This enhanced apoptosis was correlated to a slight increase in the expression of Bim, a pro-apoptotic molecule, while the levels of Bcl-2, its anti-apoptotic counterpart, remained unchanged (**Fig. 1B, lower panel**).[28] Despite reduced cell expansion, the dynamics of activation (as assessed by monitoring cell surface markers) were largely unchanged in the absence of IL2R β (**Fig. S2B**). However, differences were noted in terms of KLRG1, CD27, CD62L and CD127 expression at day 7 (**Fig. 1C, S2C**). Whereas IL2R $\beta^{+/-}$ cells presented a terminally-differentiated phenotype (CD62L^{low} CD127^{low} KLRG1^{high}), a fraction of IL2R $\beta^{-/-}$ cells was already expressing markers

of memory T cells at day 7 (CD62L^{high} CD127^{high} KLRG1^{low} CD27^{high}). In fact, the proportion of KLRG1^{high} CD127^{low} SLECs at day 7 was significantly reduced in the absence of IL-2 and IL-15 signaling, while KLRG1^{low} CD127^{high} MPEC differentiation was accelerated (**Fig. 1D left panel, S2D**). A preferential accumulation of KLRG1^{high} CD127^{low} SLECs over KLRG1^{low} CD127^{high} MPECs was seen in control mice, while SLEC and MPEC numbers were equivalent in IL2R β ^{-/-} mice (**Fig. 1D, right panel**). These data demonstrate a preponderant role for IL-2 and IL-15 signals in the development of SLECs, as demonstrated for IL-2 by others.[9, 12, 15] We then analyzed the intracellular expression of T-bet and Eomes, key transcription factors implicated in effector and memory lineage choices.[6, 29]. While IL2R β ^{-/-} cells presented slightly reduced levels of T-bet at day 5 and 7, Eomes levels were significantly increased at day 7 of infection, but not at day 5 (**Fig. 1E**). Evenmore, the absence of IL2R β signals increased the proportion of cells expressing both Eomes and T-bet, thus shifting the balance in favor of MPEC differentiation. (**Fig. 1F, S2E**). Of note, the expression level of CD127 at the surface of the cells did not explain the difference seen in Eomes expression, as CD127^{high} and CD127^{low} subsets both expressed higher levels of Eomes in the absence of IL2R β signaling (**Fig. S2F**). This accelerated MPEC differentiation correlated with increased *Klf2*, *Bcl6* and *Eomes* mRNA levels and reduced *Prdm1* and *Tbx21* levels (**Fig. 1G**), in accordance with the known role of these transcription factors in memory and effector T cell differentiation respectively.[3, 30] Together, our data indicate that IL-2 and IL-15 condition the expansion and differentiation of SLECs, by regulating the survival and proliferation of CD8 effectors and modulating the transcriptional network governing lineage choices.

IL2R β signals are dispensable for potent effector functions

We next evaluated the consequences of abrogated IL2R β -dependent signals on the functional capacities of P14 CD8 T cells. At day 7 of infection, similar proportions of IL2R β ^{-/-} or IL2R β ^{+/-} CD8 effector T cells produced IFN γ or TNF α

following *ex vivo* restimulation, while two-fold more IL2R β ^{-/-} cells secreted IL-2 (**Fig. 2A**). This could be related to the increased frequency of MPECs amongst IL2R β ^{-/-} cells, which are known to secrete more IL-2 than SLECs.[4] The absence of IL-2 and IL-15 also slightly increased the proportion of triple producers (IFN γ ⁺ TNF α ⁺ IL-2⁺) (16% of IL2R β ^{-/-} cells versus 11% of IL2R β ^{+/-} cells) (**Fig. 2B**), suggesting that the presence of these cytokines may somewhat limit T cell function. To test the cytotoxic functions of CD8 T cells in the presence or absence of IL2R β , we performed an *in vivo* killing assay using GP₃₃₋₄₁-loaded target cells in adoptively-transferred perforin-deficient mice infected 7 days prior to the assay (Pfp^{-/-}). These recipient mice are incapable of controlling a LCMV infection due to defective granule-dependent cytotoxicity.[31] It serves as a good tool to evaluate specifically the functionality of the adoptively transferred P14 cells. This assay demonstrated that although IL2R β ^{-/-} T cells presented a slight delay in their capacity to eliminate GP₃₃₋₄₁⁺ target cells (**Fig S3A**), they were as potent killers as their IL2R β ^{+/-} counterparts (**Fig. 2C**). These results were unexpected considering the significant reduction in the number of effectors in the absence of IL2R β (**Fig. 1A**). To confirm these findings, we further performed an adoptive transfer of one-log less naïve cells prior to infection. Yet, IL2R β ^{-/-} effector cells were still able to eliminate antigen-specific target cells (**Fig S3B**). This was also in contrast with the significant reduction in granzyme levels in the absence of IL2R β signaling (**Fig. 2D, S3C**), in accordance with previous reports.[15, 32] However, potent effector functions correlated with similar expression of the cytotoxic molecule perforin and the degranulation marker CD107a (**Fig. 2D**), and equivalent viral loads at day 7 of infection (**Fig. 2E**). To refine the evaluation of effector functions, we then assessed if IL2R β ^{-/-} P14 cells could prevent LCMV-induced hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in Pfp^{-/-} hosts.[33] Pfp^{-/-} recipients receiving either IL2R β ^{+/-} or IL2R β ^{-/-} CD8 T cells survived equally well (**Fig. 2F**) and did not demonstrate clinical signs of HLH, including weight loss, hypothermia and pancytopenia (**Fig. S3D-E**), confirming viral control by IL2R β ^{-/-} cells.

We then questioned if the lack of functional impact in the absence of IL2R β -signals was related to the low viral load at that time of the response. To answer this question, we took advantage of the LCMV clone 13 strain that generates a chronic infection in mice,[34] and compared the response of IL2R $\beta^{+/-}$ and IL2R $\beta^{-/-}$ cells at day 8 of infection in this context. It is important to note that, in this chronic infection model, the number of effector cells at day 8 post infection is reduced by two-logs compared to the acute infection model, giving us also the opportunity to compare cytotoxic functions in the presence of significantly lower number of effectors (3,9.10⁷ IL2R $\beta^{+/-}$ in acute versus 4,1X.10⁵ IL2R $\beta^{+/-}$ in chronic infection, 1,1.10⁷ IL2R $\beta^{-/-}$ in acute versus 7,1X.10⁴ IL2R $\beta^{-/-}$ cells in chronic infection, p=0,0001). IL2R $\beta^{+/-}$ CD8 T cells produced significantly less TNF α (16% versus 84%, p<0,0001) and IL-2 (5% versus 11%, p=0,003) during a chronic rather than an acute infection, as previously described,[34] while their capacity to secrete IFN γ was preserved (**Fig. 3A, left panel**). In contrast, in the context of a chronic infection, the abrogation of signaling through the IL2R β chain limited the capacity of the cells to secrete the three cytokines, with again an increased sensitivity for TNF α (8% versus 84%, p<0,0001) and IL-2 (9% versus 16%, p=0,0004) (**Fig. 3A, right panel**). Interestingly, as demonstrated during an acute infection, under this constant inflammatory and antigenic stimulation, IL2R $\beta^{-/-}$ CD8 effector T cells secreted slightly more IL-2 than their IL2R $\beta^{+/-}$ counterparts (**Fig. 3B**). The capacity of IL2R $\beta^{-/-}$ cells to secrete IFN γ was also restricted during this chronic infection, while TNF α secretion, already severely hampered in this context, could not be further diminished by the absence of IL2R β -signals (**Fig. 3B**). Nevertheless, these minor differences were not associated with significant changes in the proportion of cells secreting one, two or three cytokines simultaneously (**Fig. 3C**). As during an acute viral infection, granzyme B expression was severely hindered in the absence of IL2R β -dependent signals (**Fig. 3D**). Despite this, the capacity to degranulate was mostly preserved, as assessed by the expression of CD107a after 5-hours of *in vitro* stimulation (**Fig.**

3D). To test if the differences in cytokine production and granzyme B levels would limit cytotoxic functions *in vivo*, we performed a 6-hour functional assay in Pfp^{-/-} mice, as described above. Interestingly, IL2Rβ^{-/-} cells were as efficient as IL2Rβ^{+/-} cells to eliminate target cells (**Fig. 3E**), even though in this context the number of effector cells present was significantly reduced, as already mentioned. This reinforces the idea that IL2Rβ^{-/-} cells are highly effective cytotoxic effectors. Collectively, our results confirm that IL-2 and IL-15 sustain the expression of cytotoxic granzymes but demonstrate that these two redundant cytokines are not mandatory for effective killing abilities in both acute and chronic contexts.

IL2Rβ-dependent signals condition the maintenance of effector memory T cells but are largely dispensable for central memory T cell homeostasis.

IL-15 plays a critical role in the generation and self-renewal capacity of the memory CD8⁺ T pool.[16, 24] However, little is known on its impact on the different populations of memory cells and the role of its related cytokine, IL-2. We thus assessed whether the absence of combined IL-2 and IL-15 signals would affect CD8 memory T cell differentiation by following LCMV-infected mice more than 70 days after infection. As expected, IL2Rβ^{-/-} cells were present in much lower proportions than IL2Rβ^{+/-} cells throughout the response (**Fig. 4A**). The spleen and bone marrow were similarly diminished in the number of IL2Rβ^{-/-} CD8 memory T cells generated (1,6.10⁶ IL2Rβ^{+/-} versus 0,2.10⁶ IL2Rβ^{-/-} cells in spleens, p=0,006; 2,8.10⁴ IL2Rβ^{+/-} versus 0,4.10⁴ IL2Rβ^{-/-} cells in bone marrows, p=0,002) (**Fig. 4B**). This was associated with an accentuated contraction in the absence of IL2Rβ, as measured by the higher fold-contraction of IL2Rβ^{-/-} cells compared to their IL2Rβ^{+/-} counterparts (**Fig. 4C**). The long-term maintenance of CD8 memory T cells was also influenced by the absence of IL2Rβ signals, as depicted by the significant reduction in IL2Rβ^{-/-} T cell numbers between day 70 and 100 cells (**Fig. 4D**). This could be correlated with a reduced expression of Bcl-2 and a noticeable diminution in mitochondrial mass in the absence of IL2Rβ,

as depicted by a mitotracker staining (**Fig. 4E**). These findings suggest that IL-2 and IL-15 contribute to the Bcl-2-dependent survival of CD8 memory T cells, likely by increasing mitochondrial numbers. This hypothesis would be in accordance with recent *in vitro* experiments demonstrating that mitochondrial fatty acid oxidation is a cardinal feature of memory CD8 T cells and sustains memory T cell survival.[35] Together, our data emphasize that the absence of IL-2 and IL-15 signals, while it significantly decreases the number of memory CD8 T cells generated, does not abrogate memory formation. However, IL-2 and IL-15 regulate the size of the CD8 memory T cell pool by 1) controlling the magnitude of effector cell expansion, 2) governing the extent of T cell contraction, 3) promoting long-term T cell survival and 4) possibly sustaining oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis.

As IL-2R β -dependent signals specifically regulate effector lineage choices, we then questioned if IL-2 and IL-15 would influence the composition of the memory CD8 T cell pool. We thus compared the expression of CD62L, CD127, CCR7, CXCR3, CD43 and CD27 on CD8 memory T cells. While IL2R $\beta^{+/-}$ and IL2R $\beta^{-/-}$ cells had uniformly re-expressed CD127, they presented striking differences in their expression of CD62L, CCR7, KLRG1, CD27 and CXCR3 (**Fig. 5A, S4A**). In fact, most IL2R $\beta^{-/-}$ cells exhibited phenotypic features characteristic of T_{CM} differentiation (CD62L^{high} CCR7^{high} CD127^{high} KLRG1^{low}) (**Fig. 5B-C**). Moreover, the absence of IL-2 and IL-15 signaling restrained the development of memory cells with effector characteristics defined as CD27^{low} CD43^{low} CXCR3^{low} KLRG1^{high} and accelerated the development of CD27^{high} CD43^{low} memory T cells, known for their superior recall responses (**Fig. 5B-C**).[36] Interestingly, IL2R β -deficiency did not abort the generation of T_{EM} cells, as demonstrated by the similar frequency of these cells at day 15 and day 30 post infection (**Fig. S4B left panel**), but severely hampered their maintenance, as shown by their attrition over time, in contrast to IL2R $\beta^{+/-}$ cells (**Fig. 5D left panel**). Noticeable, and in clear contrast to T_{EM} cells, T_{CM} cells were better sustained in the absence of IL2R β signals (**Fig. 5D and S4B, right panels**). This was correlated with a higher

expression of Eomes and lower expression of T-bet in IL2R β ^{-/-} cells (**Fig. 5E**), in accordance with the fundamental importance of Eomes in T_{CM} differentiation.[19] Altogether, our findings indicate that IL-2 and IL-15 are key regulators of the maintenance of the effector memory T cell pool, while their absence accelerates T_{CM} development while it does not preclude its homeostasis.

IL-2 and IL-15 promote the expansion of secondary SLECs but do not regulate secondary effector functions.

We next questioned whether these phenotypic changes would impact the functional capacity of CD8 memory T cells. To do so, 10⁴ P14 IL2R β ^{+/-} or P14 IL2R β ^{-/-} FACS-sorted memory T cells were adoptively transferred in naïve congenic hosts prior to re-infection with LCMV Armstrong. Although IL2R β ^{-/-} memory CD8 T cells demonstrated a sustainable expansion between day 0 and day 5 after viral rechallenge, their expansion was severely limited thereafter (reaching a maximum of 0,9.10⁶ IL2R β ^{-/-} cells at day 70+7 compared to 4,7.10⁶ IL2R β ^{+/-} cells, p=0,003) (**Fig. 6A**). This was correlated with an almost complete arrest of cell proliferation and an increased expression of Bim relative to Bcl2 (**Fig. 6B**). Assessment of cell surface markers further demonstrated that IL2R β ^{-/-} memory T cells could develop into secondary effectors upon re-infection (**Fig. 6C**). However, the number and proportion of secondary SLECs at day 7 were significantly reduced in the absence of IL2R β signals, while they were equivalent at day 5 (**Fig. 6D**). This was correlated as during the primary infection with reduced *Prdm1* and *Tbx21* mRNA levels, increased *Klf2*, *Bcl6* and *Eomes* levels and a preferential expression of Eomes over T-bet in IL2R β ^{-/-} cells (**Fig. 6E-G**). Collectively, these data highlight the decisive contribution of IL-2 and IL-15 in the proliferation, survival and terminal differentiation of late-phase secondary SLECs (between day 5 and 7 after viral rechallenge).

By controlling secondary effector differentiation, IL2R β signals may affect the cytotoxic functions of these cells. To assess this question, we evaluated the capacity of memory CD8 T cells and secondary effectors to secrete cytokines and eliminate target cells. Interestingly, IL2R $\beta^{+/-}$ and IL2R $\beta^{-/-}$ memory cells had similar cytokine profiles prior to re-infection (**Fig. 7B**). Upon viral challenge, more than 80% of the cells could produce IFN γ (**Fig. 7A**). IL2R $\beta^{+/-}$ and IL2R $\beta^{-/-}$ secondary effectors also presented the same functional characteristics, differentiating away from being a double-cytokine producer (IFN γ , TNF α) to secreting mostly IFN γ after re-infection (**Fig. 7B**). In addition, a higher proportion of triple-cytokine producers was seen in the absence of IL2R β (p=0,03). The cytotoxic functions of the cells were then further assessed. While IL2R $\beta^{-/-}$ memory cells presented similar granzyme B levels at baseline, the granzyme B content was reduced when compared to their IL2R $\beta^{+/-}$ counterparts once challenged (**Fig. 7C**). Similarly, the amount of granzyme A and B mRNA was reduced in IL2R β -deficient cells (**Fig. 7C**). Interestingly, these differences were much less drastic than what they were in primary effectors (**Fig. 2D**). IL2R $\beta^{-/-}$ secondary effectors also retained the ability to eliminate target cells *in vivo*, despite a slight delay in the killing kinetic that could easily be explained by the reduced numbers of secondary effectors in the absence of IL2R β -signals (**Fig. 7D**). Furthermore, we detected similar viral loads in the presence or absence of the IL2R β chain (**Fig. 7E**). Thus, our findings indicate that IL-2 and IL-15 condition the differentiation of secondary effectors but are dispensable for potent cytotoxic functions and viral control.

We finally questioned if the absence of IL2R β -signaling during the first week of infection would impact secondary effectors. In fact, it was previously suggested that IL-2 availability during the initial infection would program the expansion capacity of memory cells upon rechallenge.[14, 23] To revisit this question, we treated WT mice with an anti-CD122 antibody (or a mock antibody as control) during either the first week of infection or reinfection or both (**Fig. 8A**). This

approach allows testing precisely the combined impact of IL-2 and IL-15 on the initial programming of the cells and on their cytokine requirements during re-expansion. Of note, the anti-CD122 blocking antibody efficiently blocked the phosphorylation of STAT5 upon *in vivo* treatment (**Fig. 8B**). As expected, it reduced both the frequency and number of primary SLECs (**Fig. 8C**) while it did not modify the number and phenotype of the CD8 memory T cell pool when given only during the first week of infection (data not shown). Of particular interest, CD8 memory T cells generated in the initial absence of IL2R β -signaling efficiently expanded upon rechallenge ($1,4 \cdot 10^6$ versus $1,1 \cdot 10^6$ secondary effectors in CD122-treated and non-treated mice respectively, **Fig. 8D** group 2 versus group 1 respectively). This was not the case if IL2R β -signaling was interrupted during reinfection (**Fig. 8D**, group 3). Moreover, anti-CD122 treatment during secondary infection impeded secondary SLEC expansion, as depicted by the reduction in the frequency of secondary SLECs in this group, while it did not if IL2R β signaling was restored at the time of challenge (**Fig. 8E**, group 3 versus group 2). Altogether, these results demonstrate that IL-2 and IL-15 signals must be present to sustain secondary SLEC development and that transient absence of these cytokines during the initial phase does not impact the expansion capacities of CD8 memory T cells.

Discussion

γ_c -dependent cytokines have multiple and diverse roles in immunity and are an essential component of the adaptive immune response to infections. While they are central to the development of mature T cells in the thymus, γ_c cytokines influence the survival and homeostasis of naïve and memory T cells in the periphery. Moreover, we have previously demonstrated that combined γ_c -dependent signals regulate the CD8 T cell differentiation process during an acute viral infection and are critical for the generation of CD8 memory T cells, in a Bcl-2 independent manner.[10] The complete abrogation of memory development in the absence of γ_c suggests that these cytokines share essential overlapping and redundant functions during infection, despite the presence of inflammatory signals and potent antigenic stimulation. In this context, IL-2 and IL-15 exhibit the highest degree of redundancy by presenting close structural similarities of their receptor, by signaling through the same receptor chains (IL2R β , γ_c) and molecules (JAK1/JAK3/STAT5, PI3K/AKT, RAS/MAPK), and by inducing the transcription of similar genes.[26, 37] To address the combined contribution of IL-2 and IL-15 signals *in vivo*, we have designed a novel TCR transgenic mouse model that abrogates specifically IL2R β -dependent signals while preserving signaling by other γ_c -dependent cytokines. This model has a significant advantage over previous models that attempted to elucidate the combined contribution of both cytokines to CD8 T cell differentiation.[15] Not only it precludes signaling through the intermediate affinity IL2R $\beta\gamma$ receptor, a known limitation of approaches using IL2R $\alpha^{-/-}$ cells, it also preserves adequate dendritic cell survival, maturation and antigen presentation, which are known to be altered in IL-15 $^{-/-}$ hosts.[38, 39]

In the absence of IL2R β signaling, we demonstrate that combined IL-2 and IL-15 signals modulate both the proliferation and survival of CD8 late effectors. With a significant reduction in the number of antigen-specific effector cells at the peak of

the response, our results are consistent with previous reports showing that IL-2 signals sustain T cell expansion *in vivo*. [22, 40, 41] However, by accounting for the redundant contribution of IL-2 during T cell expansion, we clarify the role of IL-15 during this phase of the response, since some authors had demonstrated that the absence of IL-15 limits T cell expansion [13] while others did not. [42, 43] Even more, the impact of both cytokines is not only redundant but likely additive since IL2R β deficiency reduces the number of effectors by 3,5-fold while others had previously demonstrated that IL2R α deficiency leads to a 2-fold reduction in effector numbers in the same infectious context. [14, 15] Thus, our data suggest that IL-15 contributes to the expansion of late effectors, even before the contraction phase, as IL-2 does. Interestingly, we confirm that the initial expansion of T cells is surprisingly independent of IL-2 and IL-15 signals, although both receptor chains are rapidly expressed at the surface of the cells upon viral challenge. This is consistent with the notion that CD8 T cell expansion is programmed upon a short encounter with the pathogen, thus hindering requirements for prolonged IL-2 and IL-15 stimulation initially. [44, 45] It also highlights that other inflammatory cytokines present at the time of priming likely provide accessory redundant signals to T cell for their expansion. [46]

The impact of IL-2 and IL-15 during the expansion phase is particularly critical for SLECs, during both primary and secondary responses, while MPECs are preserved in the absence of IL2R β -signaling. This is in accordance with the notion that IL-2 and IL-15 regulate the proliferation and survival of SLECs, as previously demonstrated by others [12, 13, 15, 22], but expands this notion to secondary effectors. It also reinforces the concept that SLECs and MPECs respond to distinct signals during an infection and that similar cytokinic signals are intergraded by these effector cells for their proper differentiation, independently of the time of infection, being initially or upon rechallenge. We further demonstrate that CD8 T cell differentiation per se is severely hampered in the absence of IL2R β signaling, and that both cytokine are likely redundant for this function. Our results suggest that IL-2 and IL-15 influence lineage choices by

modifying the transcriptional program of the cells, favoring the transcription of *Tbx21* and *Prdm1* over *Eomes*, *Bcl6* and *Klf2*. Although we did not evaluate per se the exact contribution of each cytokine on the transcriptional network of the cells, IL-2 and IL-15 likely mediate their transcriptional effect through phosphorylation of Foxo1 in an Akt-dependent manner, since Foxo1 was shown to restrain T-bet mediated terminal effector differentiation and sustains the transcription of several memory-associated genes such as *Eomes*, *IL7Ra*, *Klf2* and *Ccr7*. [47, 48] Further studies would be required to explore this hypothesis.

We had previously demonstrated that γ_c -dependent cytokines were mandatory for the generation of memory T cells in a Bcl-2 independent manner. [10] This was surprising knowing that IL-7 and IL-15 promote T cell survival through enhanced expression of anti-apoptotic Bcl2 family members. [49-51] It suggested that IL-7 and/or IL-15 were indispensable for T cell survival, independently of Bcl2, as suggested by others. [49, 50, 52] In this report, we emphasize the critical role of IL2R β -dependent cytokines on the survival of CD8 effector T cells, as suggested by the reduced survival and accelerated contraction of IL2R $\beta^{-/-}$ effector cells. This is in accordance with the pro-survival function of IL-15, especially during the contraction phase, [6, 11, 13, 15, 43] although the role of Bcl-2 in this context remains debatable, since Bcl-2 overexpression does not rescue T cell contraction. [10] We also demonstrate that, in the absence of IL-2 and IL-15, memory cell development was severely restrained, with significant reduction in the number of CD8 memory T cells generated and slow attrition of these cells over time. These findings highlight not only the critical importance of IL-7 in the generation of CD8 memory T cells, [53, 54] but also its incapacity to completely compensate the lack of IL-15-signaling. [4, 16] It also confirms that memory T cells are maintained through both IL-7-dependent and IL-15-dependent homeostatic mechanisms. [16, 53] One of these mechanisms could be through the regulation of fatty acid oxidation, a cardinal metabolic pathway involved in memory T cell development and survival. [35] This is suggested by our demonstration of a reduced memory T cell mitochondrial mass in the absence of

IL2R β -signals. Further work remains to be performed to establish the γ_c -dependent downstream pathways that regulate cell-cycle proteins, pro- and anti-apoptotic molecules, and mitochondrial proteins decisive for CD8 memory T cell homeostasis.

Distinct populations of memory cells likely respond differentially to IL-2 and IL-15. Interestingly, memory cells with effector-like characteristics (CD62L^{low} CD27^{low} CD43^{low} cells)[36] were much more sensitive to IL-2 and IL-15 signals than other memory subsets. This is in accordance with the accelerated T_{CM} development in the absence of IL2R α signaling and the loss of CD27^{low} CD43^{low} cells in IL-15^{-/-} hosts.[15, 22, 24] In addition, we show that T_{EM} cells were not only significantly reduced in numbers in the absence of IL2R β -signaling, their maintenance was severely hampered over time. In contrast, IL-2 and IL-15 were largely dispensable for the maintenance of T_{CM} cells, although the presence of CD127 on MPEC did not prevent contraction of these cells.[55] These critical findings suggest that memory subsets are differentially regulated and possess distinct transcriptional networks that control their development and maintenance. Thus, IL-2 and IL-15 likely sustain effector-like memory differentiation by limiting the activation of the Foxo1 pathway (and Eomes transcription), while promoting mTORC1 activation, in an AKT-dependent manner,[56] as suggested above for SLEC differentiation. Similarly IL-2 and IL-15 may promote Blimp-1 expression, thus favoring not only the quantity of memory T cells generated but also the phenotypic characteristics of these cells.[20, 57] Alternatively, IL-2 and IL-15 might hamper T_{CM} differentiation by limiting, directly or indirectly, Klf2, Eomes or Bcl6 transcription, as suggested by our findings.[19, 58, 59] Altogether, these data suggest that IL-2 and IL-15 induce multiple signaling pathways and regulate multiple transcription factors to ultimately dictate the fate of CD8 T cells.

As one of the specificities of memory cells is their ability to rapidly proliferate upon rechallenge, the question of the impact of IL-2 and IL-15 on secondary expansion is of particular importance, in light of the numerous conflicting reports

available.[14, 15, 22-24, 42] While some authors suggest that IL-2 programs future T cell expansion,[14, 15, 23] others do not.[22] Conversely, few reports suggest a trivial contribution of IL-15 on secondary expansion.[14, 24, 42] However, because previous work by Bevan's team had revealed the key contribution of IL2R β -signaling in the programming of secondary T cell expansion [14], and knowing the redundant functions of IL-2 and IL-15 on primary effectors, we further tackled this question. To clarify the situation, we revisited the contribution of IL-2 and IL-15 during secondary infection by 1) preventing any possible redundancy of the two cytokines, 2) abolishing any possible signaling through the IL2R β / γ_c heterodimer, 3) eliminating the contribution of paracrine IL-2 secretion on effector cells, 4) conserving proper lymphoid organ architecture and antigen presentation and 5) testing secondary responses to the same infectious agent in a naïve environment. We demonstrate that not only secondary effectors can substantially expand, they are readily functional and cytotoxic. Although the expansion is considerable, it does present some restriction in late phases of the response, as it did during the primary response. Though this underscores that primary and secondary effectors largely rely on similar cytokinic signals for their proper expansion, as they did for their differentiation, secondary effectors appear to be slightly more sensitive to the absence of IL-2 and IL-15 signals since the difference between WT and IL2R β ^{-/-} cells numbers after the second infection is slightly more important than after the initial infection (4,74-fold versus 3,5-fold difference respectively). We then deciphered whether reduced expansion amongst secondary IL2R β ^{-/-} effectors resulted from an abnormal programming initially, as suggested by Bevan, or if IL-2 and IL-15 signals were required during reinfection. Using a anti-CD122 blocking antibody during either the first week of infection or reinfection, we demonstrated that IL-2 and IL-15 needed to be present at the time of the challenge in order to impact secondary T cell expansion. This suggests that these two redundant cytokines do not permanently imprint a specific differentiation and expansion program to effector T cells and that transient IL-2 and IL-15 deficiency would not impact long term memory responses. Further studies will be required to

tackle the genetic and epigenetic changes regulated by combined IL-2 and IL-15 signals to control recall responses.

All together our data highlight the critical role for combined IL-2 and IL-15 signals in the proliferation and survival of primary and secondary effectors and their differentiation into SLECs. It also demonstrates that IL2R β signaling condition the maintenance of a memory T cell pool with effector characteristics. Unexpectedly, IL-2 and IL-15 are dispensable for potent effector functions and viral clearance, suggesting that multiple redundant signals are in place to preserve effective cytotoxic functions upon viral challenge.

Materials and methods

Mice: CD45.2⁺ Rag2^{-/-} P14 TCR Transgenic (Tg) mice (expressing a TCR specific for the LCMV H2-D^b-restricted GP₃₃₋₄₁ epitope)[60] were provided by A. Freitas (Institut Pasteur, Paris, France) and backcrossed onto the C57BL/6 (B6) background. P14 mice, with or without IL2R β chain, were then produced by breeding P14 mice with IL2R β ^{-/-} mice (Jackson Laboratory). P14 IL2R β ^{+/-} or P14 IL2R β ^{-/-} chimeric mice were generated by adoptive transfer of 7- to 10- week-old 10⁵ naïve CD45.2⁺ TCR Tg CD8⁺ T cells into 8- to 10-week-old naïve CD45.1.2⁺ B6 recipient mice. 10⁴ naïve P14 IL2R β ^{+/-} or IL2R β ^{-/-} cells were used in the chronic infection model. To prevent rejection of adoptively transferred cells, CD45.1.2⁺ B6 recipient mice were generated by crossing Tg⁻ CD45.2⁺ mice with CD45.1⁺ B6 mice (B6.SJL, Jackson Laboratory). For secondary infection, 10⁴ P14 or P14 IL2R β ^{-/-} CD45.2⁺ memory CD8⁺ T cells (Day 70 post-infection) were adoptively transferred into 8- to 10-week-old naïve CD45.1.2⁺ B6 recipient mice. For *in vivo* killing assays, Pfp^{-/-} mice (B6^{Prf1^{tm1sdz}/J}, Jackson Laboratory) were used as recipients. All donor and virus-free recipient mice were housed in specific pathogen-free facilities at the CHU Sainte-Justine Research Center. Experiments were conducted in accordance with institutional guidelines.

Virus, viral titers and mice infection:

LCMV Armstrong and LCMV clone 13 were obtained from Rolf M.Zinkernagel (Zurich University Hospital, Switzerland) and were grown respectively on BHK-21 and L929 cells, as previously described.[61] Virus titers were determined by focus-forming assay on MC57G cells.[62] Mice were infected 20 hours after adoptive transfer of naïve or memory T cells. For acute infections and recall responses, mice were injected i.p. with 2 X 10⁵ PFU of LCMV Armstrong. For chronic infection, mice were injected i.v. with 1 X 10⁶ PFU of LCMV Clone 13. All infected mice were housed in specific infectious facilities at the INRS-IAF Experimental Biology Center.

Blocking antibody treatment:

In some experiments, an anti-CD122 blocking antibody (TM-β1, 200 μg/injection i.p) was injected one day prior to adoptive cell transfer and every other day thereafter, until day 6 post-infection. Other groups of mice received the same treatment during the re-infection phase exclusively, or during both the primary or secondary infection. Control mice were similarly injected with a mock antibody (LTF-2). Both anti-CD122 and LTF-2 antibodies were purchased from BioXcell.

Cell isolation, flow cytometry analysis and cell sorting:

Peripheral blood (100 μL) was obtained retro-orbitally, by the saphenous vein or from the facial artery in tubes containing 100 μL of PBS 1X EDTA (5 mM). Bone marrow was obtained by flushing both femurs. Single cell suspensions were generated from spleen and bone marrow by pressing the organs and filtering the cells through a 100-μM nylon mesh, prior to erythrocyte lysis (NH₄Cl or BD FACS lysing buffer). Cell suspensions were stained in 50-100 μL of PBS with 2% FBS during 15 minutes on ice. Prior to staining, cells were Fc-blocked. Monoclonal antibodies were purchased from eBioscience and BD Bioscience except for Granzyme B (Molecular Probes) and CD43 (BioLegend). CCR7 staining was performed by incubating cells 40 minutes at 37°C with CCR7-biotin (eBioscience). Ultra-avidin-R-phycoerythrin (Leinco) was used to reveal CCR7-biotin staining. MHC class I peptide tetramers were produced by F. Lemaitre (Institut Pasteur, Paris), coupled to ultra-avidin-R-phycoerythrin (Leinco) and used simultaneously with other extracellular antibodies. Dead cells were excluded using Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell stain kit prior to fixation (Molecular Probes). Mitotracker Deep Red (Invitrogen) and Annexin V / 7-AAD (eBioscience) staining was performed according to manufacturer's instructions and was processed before dead cell and monoclonal antibodies staining. Data were acquired using a FACS LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Treestar). For recall responses, alive CD8⁺ CD3⁺ CD45.1⁻ CD45.2⁺ TCR Tg cells were cell-sorted on a BD FACSAria II (98% purity).

Intracellular staining and *in vivo* cytotoxic assay:

Intracellular staining was done on freshly isolated splenocytes according to manufacturer's instructions, with the Fixation and Permeabilization Kits from eBioscience or BD Bioscience. IFN γ , TNF α and IL-2 quantification was evaluated after *ex vivo* restimulation with GP₃₃₋₄₁ peptide (0,2 μ g/mL) in the presence of brefeldin A (10 μ g/mL) for 4 hours. Degranulation was similarly assessed after 5 hours of *ex vivo* restimulation by staining for CD107a (BD Bioscience). Granzyme B and perforin staining were performed without stimulation. Bim (Cell Signaling), Bcl2 (BD Biosciences), active-caspase 3 (BD Biosciences), Ki-67 (eBioscience), T-bet (BD Bioscience), Eomes (eBioscience) and pSTAT5 Y694 (Cell Signaling) antibodies were used as suggested by manufacturers. FITC conjugated donkey anti-rabbit was used as secondary antibody for intracellular Bim staining (Jackson ImmunoResearch). *In vivo* cytotoxic assay was performed by transferring 10⁶ CFSE^{high}-labeled (1 μ M) GP₃₃₋₄₁-loaded splenocytes and 10⁶ CFSE^{low}-labeled (0,1 μ M) unloaded splenocytes in Pfp^{-/-} mice at day 7 post-infection, as previously described.[10]

RNA extraction and real-time quantitative PCR analysis:

RNA was isolated from 2.10⁴ cell-sorted P14 IL2R β ^{+/-} or P14 IL2R β ^{-/-} at distinct time-points post-infection by mixing with TRIzol reagent (Invitrogen) on ice. RNA was next purified with RNeasy Micro Kit (Qiagen) and cDNA was synthesized with SuperScript VILO kit (Invitrogen). Real-time quantitative RT-PCR was performed on a Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies) with SYBR Select Master mix (Applied Biosystems) using the following primer sets: Prdm1 forward, 5'-ACACACAGGAGAGAAGCCACATGA-3' and reverse, 5'-TCGAAGGTGGGTCTTGAGATTGCT-3'; Tbx21 forward 5'-AGGGGACACTCGCAACAGA-3' and reverse, 5'-AGGGGGCTTCCAACAATG-3'; Eomesodermin forward, 5'-CCGCCCCTACAATGTTTTTC-3' and reverse GAAATCTCCTGCCTCATCCA-3'; Klf2 forward, 5'-

TGTGAGAAATGCCTTTGAGTTTACTG-3' and reverse, 5'-
 CCCTTATAGAAATACAATCGGTCATAGTC-3'; Bcl6 forward 5'-
 GGGACATCTTGACGGACGTT-3' and reverse, 5'-
 TCACGGGAGGTTTAAGTGC; Granzyme A forward,
 5'TTTCATCCTGTAATTGGACTAA-3' and reverse, 5'-
 GCGATCTCCACACTTCTC-3'; Granzyme B forward, 5'-
 CCTCCTGCTACTGCTGAC-3' and reverse, 5'-GTCAGCACAAAGTCCTCTC-
 3'; Hprt forward, 5'-CTCCTCAGACCGCTTTTTGC-3' and reverse, 5'-
 TAACCTGGTTCATCATCGCTAATC-3'.

Statistical analysis:

Statistical significance were determined by standard Student's *t* test and Kruskal-Wallis ANOVA using ABI Prism 6. Significance was set as any *P* value less than 0.05.

Acknowledgments

We thank A. Freitas for P14 mice; Rolf M. Zinkernagel for LCMV viruses, F. Le Deist for flow cytometry and cell sorting; F. Lemaitre, I. Boufaied, RM. Brito, E. Michaud, N. Cotta-Grand and E. Tarrab for technical assistance; M. Perez Marcogliese, H. Orlando, D. Carrier, A. Delisle, V. Pellerin, S. Lespérance, E. Pelletier, H. Slimani for animal care. We are grateful to V. Abadie, N. Heveker, H. Soudeyns, C. Beauséjour and N. Labrecque, and members of their labs, for helpful discussions. H. Decaluwe is supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, the Fonds de Recherche du Québec – Santé, the Cole Foundation and the Canadian Child Health Clinician Scientist Program. C. Mathieu has a research scholarship from the University of Montreal and the CHU Sainte-Justine Foundation.

References

- 1 **Gerlach, C., van Heijst, J. W., Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R. M., Zehn, D., Bevan, M. J., Schepers, K. and Schumacher, T. N.,** One naive T cell, multiple fates in CD8⁺ T cell differentiation. *J Exp Med* 2010. **207**: 1235-1246.
- 2 **Zhang, N. and Bevan, M. J.,** CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 2011. **35**: 161-168.
- 3 **Kaech, S. M. and Cui, W.,** Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2012. **12**: 749-761.
- 4 **Kaech, S. M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D. and Ahmed, R.,** Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 2003. **4**: 1191-1198.
- 5 **Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W. N., Konieczny, B. T., Subramaniam, S. and Ahmed, R.,** Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* 2008. **205**: 625-640.
- 6 **Joshi, N. S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H. K., Urso, D. R., Hagman, J., Gapin, L. and 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* 2007. **27**: 281-295.
- 7 **Prlic, M., Hernandez-Hoyos, G. and Bevan, M. J.,** Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8⁺ T cell response. *J Exp Med* 2006. **203**: 2135-2143.
- 8 **Henrickson, S. E., Mempel, T. R., Mazo, I. B., Liu, B., Artyomov, M. N., Zheng, H., Peixoto, A., Flynn, M. P., Senman, B., Junt, T., Wong, H. C., Chakraborty, A. K. and von Andrian, U. H.,** T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nat Immunol* 2008. **9**: 282-291.
- 9 **Pipkin, M. E., Sacks, J. A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M. G., Bevan, M. J. and Rao, A.,** Interleukin-2 and inflammation induce distinct

- transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 2010. **32**: 79-90.
- 10 **Decaluwe, H., Taillardet, M., Corcuff, E., Munitic, I., Law, H. K., Rocha, B., Riviere, Y. and Di Santo, J. P.,** Gamma(c) deficiency precludes CD8+ T cell memory despite formation of potent T cell effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010. **107**: 9311-9316.
- 11 **Rubinstein, M. P., Lind, N. A., Purton, J. F., Filippou, P., Best, J. A., McGhee, P. A., Surh, C. D. and Goldrath, A. W.,** IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8+ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood* 2008. **112**: 3704-3712.
- 12 **Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W. N., Smith, K. A. and Ahmed, R.,** Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 2010. **32**: 91-103.
- 13 **Sanjabi, S., Mosaheb, M. M. and Flavell, R. A.,** Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity* 2009. **31**: 131-144.
- 14 **Williams, M. A., Tyznik, A. J. and Bevan, M. J.,** Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 2006. **441**: 890-893.
- 15 **Mitchell, D. M., Ravkov, E. V. and 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* 2010. **184**: 6719-6730.
- 16 **Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A. and Ahmed, R.,** Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 2002. **195**: 1541-1548.
- 17 **Wherry, E. J., Becker, T. C., Boone, D., Kaja, M. K., Ma, A. and Ahmed, R.,** Homeostatic proliferation but not the generation of virus specific memory CD8 T cells is impaired in the absence of IL-15 or IL-15Ralpha. *Adv Exp Med Biol* 2002. **512**: 165-175.

- 18 **Yi, J. S., Ingram, J. T. and Zajac, A. J.**, IL-21 deficiency influences CD8 T cell quality and recall responses following an acute viral infection. *J Immunol* 2010. **185**: 4835-4845.
- 19 **Banerjee, A., Gordon, S. M., Intlekofer, A. M., Paley, M. A., Mooney, E. C., Lindsten, T., Wherry, E. J. and Reiner, S. L.**, Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8⁺ T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol* 2010. **185**: 4988-4992.
- 20 **Rutishauser, R. L., Martins, G. A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I. A., Meffre, E., Jacob, J., Calame, K. and Kaech, S. M.**, Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* 2009. **31**: 296-308.
- 21 **Shin, H. M., Kapoor, V. N., Guan, T., Kaech, S. M., Welsh, R. M. and Berg, L. J.**, Epigenetic modifications induced by Blimp-1 Regulate CD8(+) T cell memory progression during acute virus infection. *Immunity* 2013. **39**: 661-675.
- 22 **Obar, J. J., Molloy, M. J., Jellison, E. R., Stoklasek, T. A., Zhang, W., Usherwood, E. J. and 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* 2010. **107**: 193-198.
- 23 **Bachmann, M. F., Wolint, P., Walton, S., Schwarz, K. and Oxenius, A.**, Differential role of IL-2R signaling for CD8⁺ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur J Immunol* 2007. **37**: 1502-1512.
- 24 **Sandau, M. M., Kohlmeier, J. E., Woodland, D. L. and Jameson, S. C.**, IL-15 regulates both quantitative and qualitative features of the memory CD8 T cell pool. *J Immunol* 2010. **184**: 35-44.
- 25 **Boyman, O. and Sprent, J.**, The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012. **12**: 180-190.

- 26 **Ring, A. M., Lin, J. X., Feng, D., Mitra, S., Rickert, M., Bowman, G. R., Pande, V. S., Li, P., Moraga, I., Spolski, R., Ozkan, E., Leonard, W. J. and Garcia, K. C.,** Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat Immunol* 2012. **13**: 1187-1195.
- 27 **Butz, E. A. and Bevan, M. J.,** Massive expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells during an acute virus infection. *Immunity* 1998. **8**: 167-175.
- 28 **Kurtulus, S., Tripathi, P., Moreno-Fernandez, M. E., Sholl, A., Katz, J. D., Grimes, H. L. and Hildeman, D. A.,** Bcl-2 allows effector and memory CD8⁺ T cells to tolerate higher expression of Bim. *J Immunol* 2011. **186**: 5729-5737.
- 29 **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. and Reiner, S. L.,** Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 2005. **6**: 1236-1244.
- 30 **Crotty, S., Johnston, R. J. and Schoenberger, S. P.,** Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol* 2010. **11**: 114-120.
- 31 **Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H.,** Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994. **369**: 31-37.
- 32 **Ye, W., Young, J. D. and Liu, C. C.,** Interleukin-15 induces the expression of mRNAs of cytolytic mediators and augments cytotoxic activities in primary murine lymphocytes. *Cell Immunol* 1996. **174**: 54-62.
- 33 **Jordan, M. B., Hildeman, D., Kappler, J. and Marrack, P.,** An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8⁺ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 2004. **104**: 735-743.

- 34 **Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. and Ahmed, R.,** Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003. **77**: 4911-4927.
- 35 **van der Windt, G. J., Everts, B., Chang, C. H., Curtis, J. D., Freitas, T. C., Amiel, E., Pearce, E. J. and Pearce, E. L.,** Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8⁺ T cell memory development. *Immunity* 2012. **36**: 68-78.
- 36 **Hikono, H., Kohlmeier, J. E., Takamura, S., Wittmer, S. T., Roberts, A. D. and Woodland, D. L.,** Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 2007. **204**: 1625-1636.
- 37 **Arneja, A., Johnson, H., Gabrovsek, L., Lauffenburger, D. A. and White, F. M.,** Qualitatively different T cell phenotypic responses to IL-2 versus IL-15 are unified by identical dependences on receptor signal strength and duration. *J Immunol* 2014. **192**: 123-135.
- 38 **Dubois, S. P., Waldmann, T. A. and Muller, J. R.,** Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. **102**: 8662-8667.
- 39 **Ohteki, T., Tada, H., Ishida, K., Sato, T., Maki, C., Yamada, T., Hamuro, J. and Koyasu, S.,** Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J Exp Med* 2006. **203**: 2329-2338.
- 40 **D'Souza, W. N. and Lefrancois, L.,** IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol* 2003. **171**: 5727-5735.
- 41 **Blattman, J. N., Grayson, J. M., Wherry, E. J., Kaech, S. M., Smith, K. A. and Ahmed, R.,** Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nat Med* 2003. **9**: 540-547.

- 42 **Yajima, T., Nishimura, H., Sad, S., Shen, H., Kuwano, H. and Yoshikai, Y.,** A novel role of IL-15 in early activation of memory CD8+ CTL after reinfection. *J Immunol* 2005. **174**: 3590-3597.
- 43 **Yajima, T., Yoshihara, K., Nakazato, K., Kumabe, S., Koyasu, S., Sad, S., Shen, H., Kuwano, H. and Yoshikai, Y.,** IL-15 regulates CD8+ T cell contraction during primary infection. *J Immunol* 2006. **176**: 507-515.
- 44 **Kaech, S. M. and Ahmed, R.,** Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2001. **2**: 415-422.
- 45 **van Stipdonk, M. J., Lemmens, E. E. and Schoenberger, S. P.,** Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2001. **2**: 423-429.
- 46 **Kolumam, G. A., Thomas, S., Thompson, L. J., Sprent, J. and 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* 2005. **202**: 637-650.
- 47 **Michelini, R. H., Doedens, A. L., Goldrath, A. W. and Hedrick, S. M.,** Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1. *J Exp Med* 2013. **210**: 1189-1200.
- 48 **Rao, R. R., Li, Q., Gubbels Bupp, M. R. and Shrikant, P. A.,** Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 2012. **36**: 374-387.
- 49 **Akbar, A. N., Borthwick, N. J., Wickremasinghe, R. G., Panayoitidis, P., Pilling, D., Bofill, M., Krajewski, S., Reed, J. C. and Salmon, M.,** Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol* 1996. **26**: 294-299.

- 50 **Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S. and Tough, D. F.,** IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2003. **170**: 5018-5026.
- 51 **Lai, Y. G., Hou, M. S., Lo, A., Huang, S. T., Huang, Y. W., Yang-Yen, H. F. and Liao, N. S.,** IL-15 modulates the balance between Bcl-2 and Bim via a Jak3/1-PI3K-Akt-ERK pathway to promote CD8 α CD8 α intestinal intraepithelial lymphocyte survival. *Eur J Immunol* 2013. **43**: 2305-2316.
- 52 **Kim, E. H., Sullivan, J. A., Plisch, E. H., Tejera, M. M., Jatzek, A., Choi, K. Y. and Suresh, M.,** Signal integration by Akt regulates CD8 T cell effector and memory differentiation. *J Immunol* 2012. **188**: 4305-4314.
- 53 **Tan, J. T., Ernst, B., Kieper, W. C., LeRoy, E., Sprent, J. and Surh, C. D.,** Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *J Exp Med* 2002. **195**: 1523-1532.
- 54 **Osborne, L. C., Dhanji, S., Snow, J. W., Priatel, J. J., Ma, M. C., Miners, M. J., Teh, H. S., Goldsmith, M. A. and Abraham, N.,** Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R α mutant mice. *J Exp Med* 2007. **204**: 619-631.
- 55 **Hand, T. W., Morre, M. and Kaech, S. M.,** 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* 2007. **104**: 11730-11735.
- 56 **Kim, M. V., Ouyang, W., Liao, W., Zhang, M. Q. and Li, M. O.,** The transcription factor Foxo1 controls central-memory CD8⁺ T cell responses to infection. *Immunity* 2013. **39**: 286-297.
- 57 **Kallies, A., Xin, A., Belz, G. T. and Nutt, S. L.,** Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* 2009. **31**: 283-295.

- 58 **Ichii, H., Sakamoto, A., Hatano, M., Okada, S., Toyama, H., Taki, S., Arima, M., Kuroda, Y. and Tokuhisa, T.,** Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2002. **3**: 558-563.
- 59 **Liao, W., Spolski, R., Li, P., Du, N., West, E. E., Ren, M., Mitra, S. and Leonard, W. J.,** Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014.
- 60 **Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M.,** Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 1989. **342**: 559-561.
- 61 **Dutko, F. J. and Oldstone, M. B.,** Genomic and biological variation among commonly used lymphocytic choriomeningitis virus strains. *J Gen Virol* 1983. **64 (Pt 8)**: 1689-1698.
- 62 **Battegay, M., Cooper, S., Althage, A., Banziger, J., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M.,** Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J Virol Methods* 1991. **33**: 191-198.

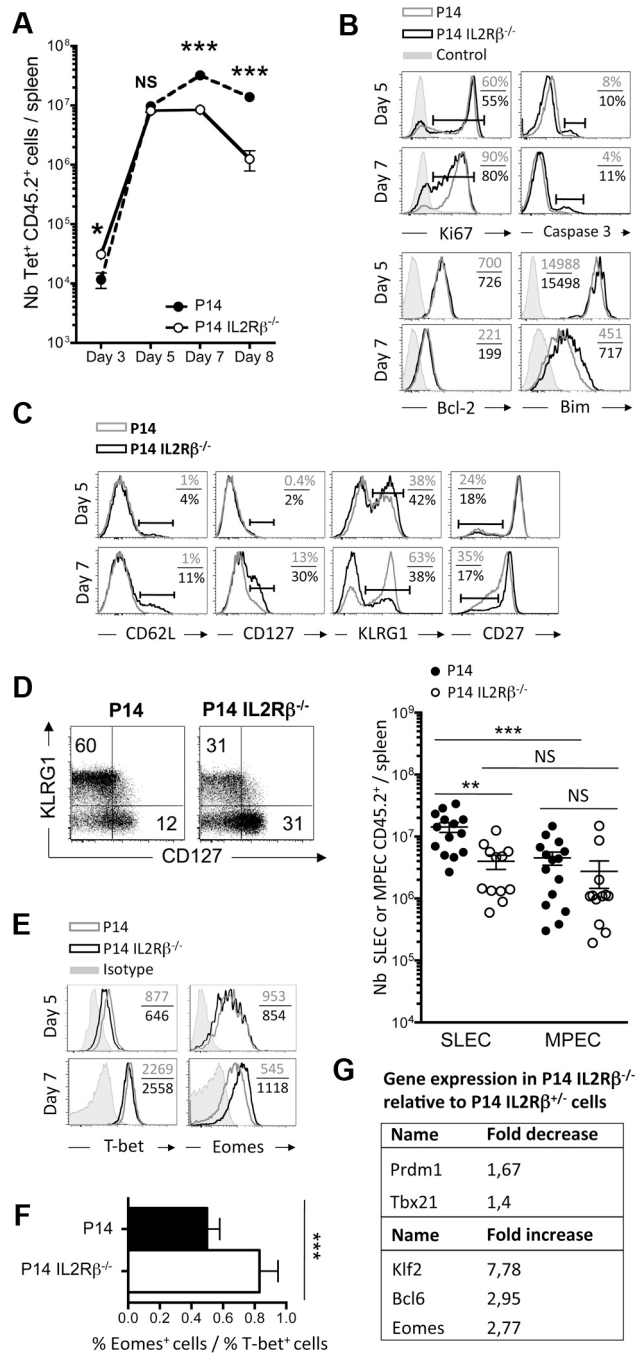


Figure 1 : IL2R β -dependent cytokines condition the survival, proliferation and terminal differentiation of KLRG1^{high} CD127^{low} SLECs, by modulating the transcriptional network of the cells

10⁵ P14 IL2R β ^{+/-} or P14 IL2R β ^{-/-} CD45.2⁺ CD8⁺ T cells were adoptively transferred into naive CD45.1.2⁺ mice that were subsequently infected with 2 X

10^5 PFU of LCMV Armstrong. Expansion and contraction of antigen-specific splenocytes were analyzed by flow cytometry at specific time points. (A) Total number of antigen-specific CD8⁺ T cells was calculated based on GP₃₃₋₄₁ tetramer and CD45.2 congenic marker staining. Data represent the mean \pm SEM of eight mice per time point, from four experiments (B) Intracellular staining of Ki67, active Caspase 3, Bcl-2 and Bim by P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (gray line) or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (black line) effector CD8⁺ T cells at day 5 and 7 post-infection (pi). Numbers indicate the respective frequency of positive cells for each marker or its Mean Fluorescent Intensities (MFI). Results are representative of at least three experiments. (C) Cell surface expression of the indicated differentiation markers by P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (gray line) or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (black line) at day 5 and 7 pi. Numbers on histograms indicate the frequency or MFI from a representative experiment (n=14). (D) Dot plot and absolute numbers of SLEC or MPEC based on KLRG1 and CD127 expression from P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (filled circle) or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (opened circle) CD8⁺ T cells at day 7 pi. Numbers in dot plot indicate the percentage of each correspondent population from a representative experiment. SLEC and MPEC numbers represent the total of four independent experiments (n=12) (E) Intracellular expression of T-bet and Eomes in P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (gray line) or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (black line) cells at day 5 and 7 pi. Isotype control is shown in shaded gray and numbers indicate MFI (n=6). (F) Ratio of the frequency of Eomes⁺ T cells over the frequency of T-bet⁺ T cells amongst P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (black bar) or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (white bar) CD8⁺ T cells at day 7 pi (mean \pm SEM from two separate experiments, n=6). (G) Expression of the indicated genes evaluated by RTqPCR. Numbers indicate the fold decrease (upper panel) or increase (lower panel) in each expression level in P14 IL2R $\beta^{-/-}$ versus P14 IL2R $\beta^{+/-}$ CD8 T cells at day 7 pi (n=5). (** p<0.005 *** p<0.0005, NS p \geq 0.05)

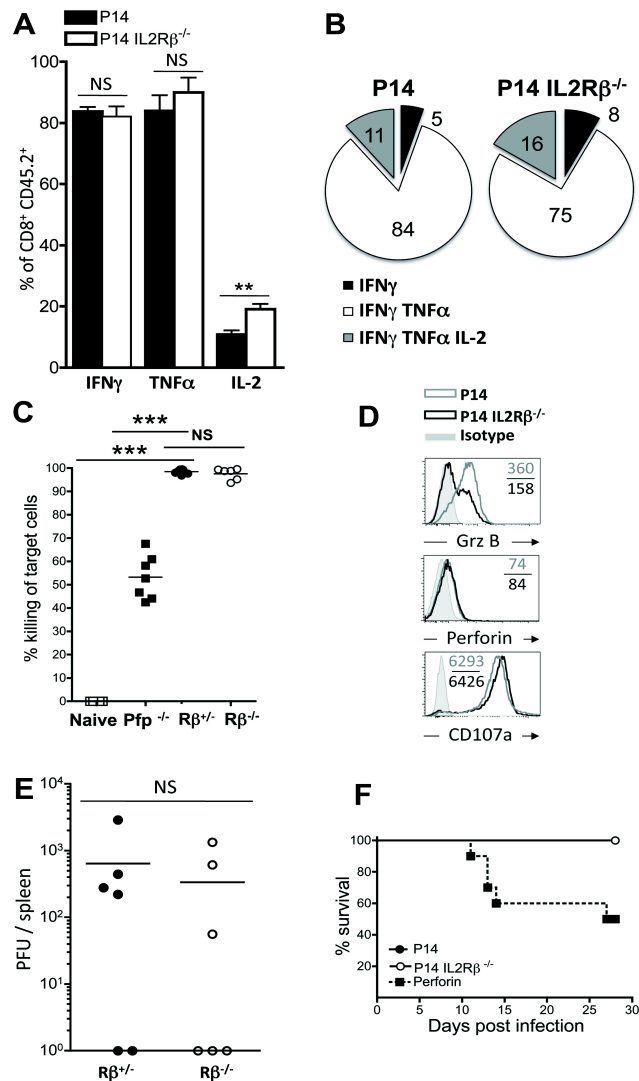


Figure 2 : IL2R β -deficient CD8 $^{+}$ T cells are potent cytotoxic cells despite a significant reduction in granzyme levels

(A) Frequency of P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (black bars) or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (white bars) CD8 $^{+}$ T cells expressing IFN γ , TNF α or IL-2 at day 7 pi after 4 hours *ex vivo* restimulation with GP₃₃₋₄₁ peptide (mean \pm SEM; n=11 per genotype). (B) Pie charts representing the percentage of splenic P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (left panel) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (right panel) effector CD8 $^{+}$ T cells secreting multiple cytokines simultaneously. Numbers indicate percentage of the correspondent phenotype. Pie charts are representative of two independent experiments each (n=6). (C) *In vivo* cytotoxic assay testing the killing function in 3 hours of day 7 P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (filled circle) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (opened circle) CD8 $^{+}$ effector T cells compared to

infected (filled square) and uninfected/naïve (opened square) Pfp^{-/-} cells. (D) Intracellular Granzyme B (Grz B), Perforin and CD107a expression of day 7 infected P14 IL2Rβ^{+/-} (gray line) or P14 IL2Rβ^{-/-} (black line) CD8⁺ T cells. Isotype control is shown in shaded gray. Numbers on histograms indicate MFI (n=8). (E) Viral titers in spleen of P14 IL2Rβ^{+/-} (filled circle) or P14 IL2Rβ^{-/-} (opened circle) recipient mice at day 7 pi (mean ± SEM; n=6 per genotype). (F) Naive perforin knock-out (Pfp^{-/-}) mice were infected with 2 X 10⁵ PFU of LCMV Armstrong 24 h after adoptive transfer of 2 X 10⁵ P14 IL2Rβ^{+/-} (filled circle) and P14 IL2Rβ^{-/-} (opened circle) T cells. Survival and clinical signs were followed over time (n=6-8). (** p<0.005, *** p<0.0005, NS p≥0.05).

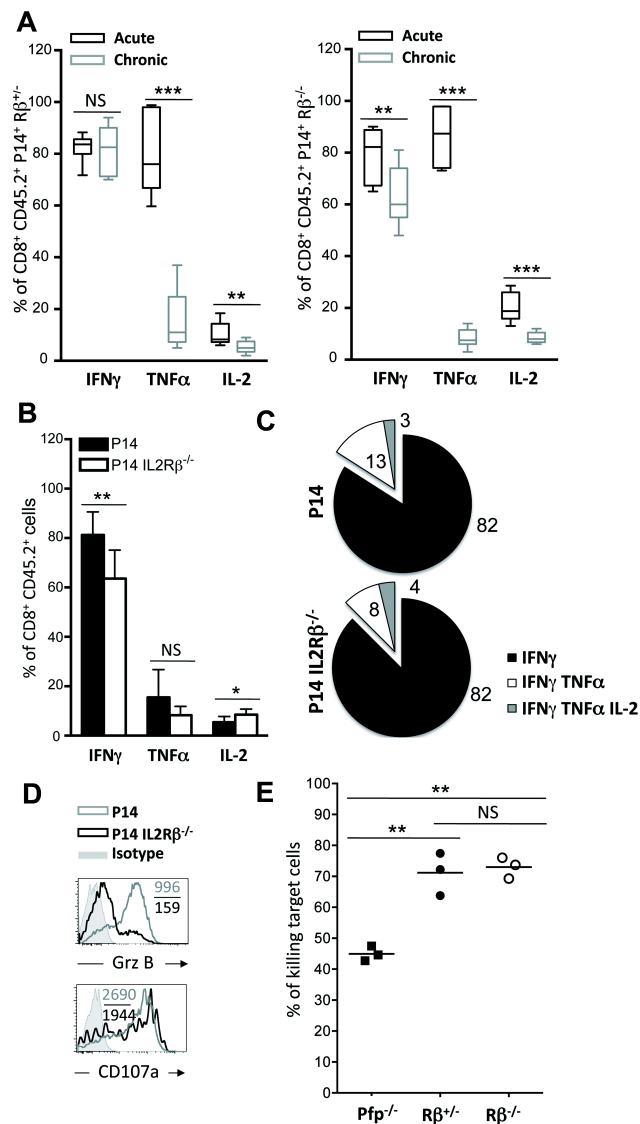


Figure 3 : IL-2 and IL-15 have minimal impact on effector functions during the acute phase of a chronic viral infection

10^4 P14 IL2R $\beta^{+/-}$ or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ CD45.2⁺ CD8⁺ T cells were adoptively transferred into naive CD45.1.2⁺ mice that were subsequently infected with 2×10^6 PFU of LCMV Clone 13. (A) Box plots comparing the respective production of IFN γ , TNF α and IL-2 by P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (left panel) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (right panel) cells at the peak of the response following infection with LCMV Armstrong (black boxes) or LCMV Clone 13 (gray boxes) (n=6). (B) Bar graph of IFN γ , TNF α and IL-2 production by P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (black bars) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (white bars) cells at day 8 after LCMV Clone 13 infection (n=10). (C) Pie charts

representing the percentage of splenic P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (left panel) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (right panel) effector CD8⁺ T cells secreting multiple cytokines simultaneously. Numbers indicate percentage of the correspondent phenotype. Data are representative of five independent experiments. (D) Granzyme B and CD107a levels of P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (gray line) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (black line) at day 8 pi. Isotype control is shown in shaded gray. Numbers represent the MFI (n=3-6). (E) 6-hour *in vivo* CTL assay of P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (filled circle) and P14 IL-2R $\beta^{-/-}$ (opened circle) effectors at day 8 pi in Pfp^{-/-} recipients. (* p<0.05, ** p<0.005 *** p<0.0005, NS p \geq 0.05).

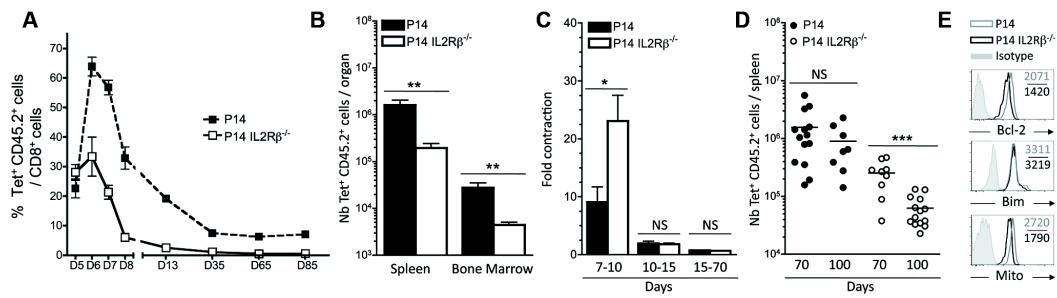


Figure 4 : IL-2 and IL-15 condition the generation and maintenance of the memory CD8 T cell pool

(A) P14 IL2R $\beta^{+/-}$ and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ chimeric mice were generated as described in Fig 1 and the frequency of GP₃₃₋₄₁⁺ CD45.2⁺ CD8⁺ T cells from the blood of P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (filled circle) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (open circle) mice was evaluated over a 90-day time course. Results are representative of five to ten mice from three independent experiments. (B) Absolute numbers of GP₃₃₋₄₁⁺ CD45.2⁺ in spleen and bone marrow of P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (black bar) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (white bar) CD8⁺ T cells in mice at day 70 pi. Bar graph is representative of three independent experiments, n=9. (C) Bar graph representing the fold contraction of P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (black bar) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (white bar) cells between day 7 and 10 (left), day 10 and 15 (middle), day 15 and 70 (right) pi. The fold contraction was calculated by dividing the number of cells at one time point by the number of cells at the second time point. Data is representative of three distinct experiments (n=10). (D) Absolute number of CD45.2⁺ CD8⁺ T cells P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (filled circle) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (open circle) at day 70 and 100 pi. (E) Bcl-2, Bim and Mitotracker Deep Red staining was quantified by flow cytometry at day 70 pi. Results are representative of seven to thirteen mice from three independent experiments (n=7-14). (* p<0.05, ** p<0.005, NS p \geq 0.05)

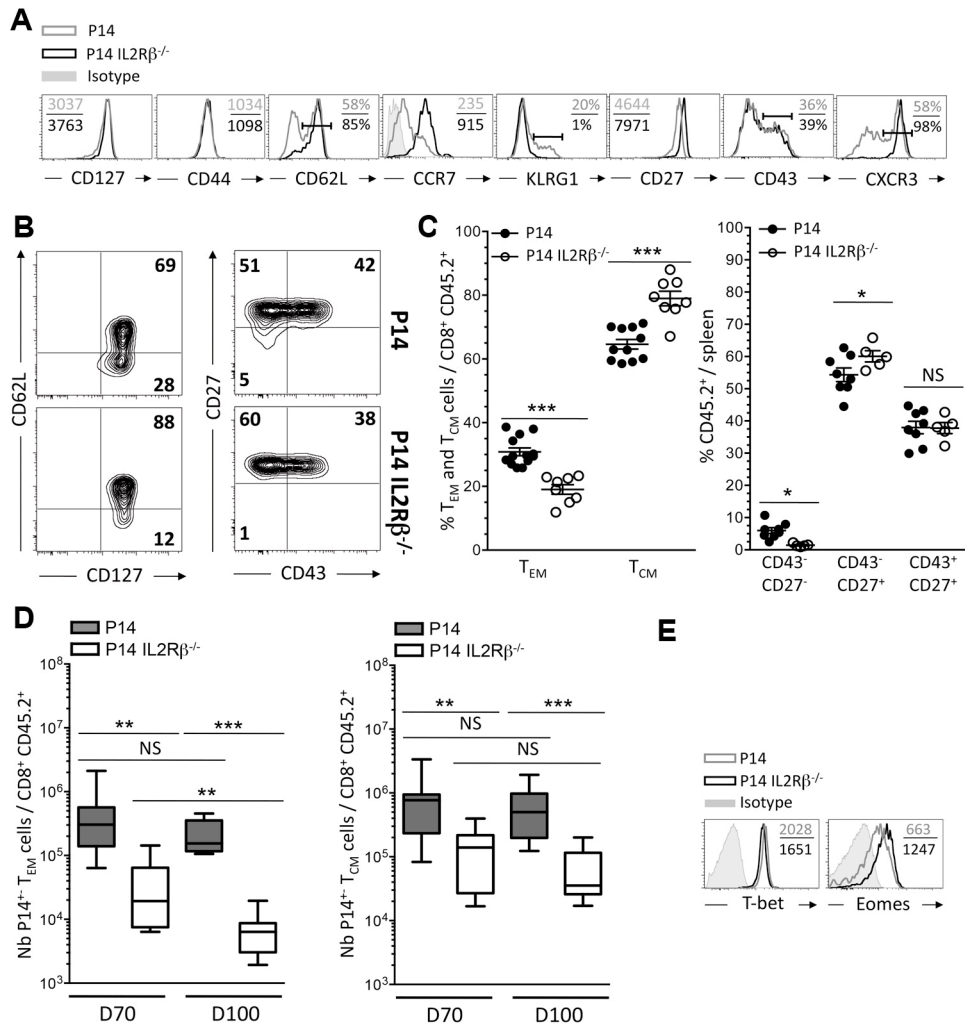


Figure 5 : T_{EM} cells are highly dependent on IL-2 and IL-15 signals for their maintenance

(A) Cell surface expression of the indicated molecules by P14 IL2Rβ^{+/-} (gray line) and P14 IL2Rβ^{-/-} (black line) at day 70 pi. Numbers on histograms indicate the respective frequency or MFI. Histograms are representative of 1 out of 4 independent experiments. (B) Dot plots of the expression of CD62L, CD127, CD27 and CD43 in the spleen by P14 IL2Rβ^{+/-} (top panel) and P14 IL2Rβ^{-/-} (bottom panel) memory CD8⁺ T cells. Numbers indicate the percentage of cells in each quadrant (n=8). (C) Frequency of T_{EM} (CD127^{hi} CD62L^{lo}) and T_{CM} (CD127^{hi} CD62L^{hi}) (left panel) and frequency of CD43⁻ CD27⁻, CD43⁻ CD27⁺ and CD43⁺

CD27⁺ cells (right panel) from P14 IL2R β ^{+/-} (filled circle) and P14 IL2R β ^{-/-} (opened circle) CD8⁺ T cells. (D) Numbers of T_{EM} (left graph) and T_{CM} (right graph) cells at day 70 and day 100 pi, from P14 IL2R β ^{+/-} (gray boxes) and P14 IL2R β ^{-/-} (white boxes) mice. Results are representative of three independent experiments (n=8-14). (E) Intracellular expression of T-bet and Eomes in P14 IL2R β ^{+/-} (gray line) and P14 IL2R β ^{-/-} (black line) memory CD8⁺ T cells. Numbers indicate respective MFI (n=6). (* p<0.05, *** p<0.0005, NS p \geq 0.05).

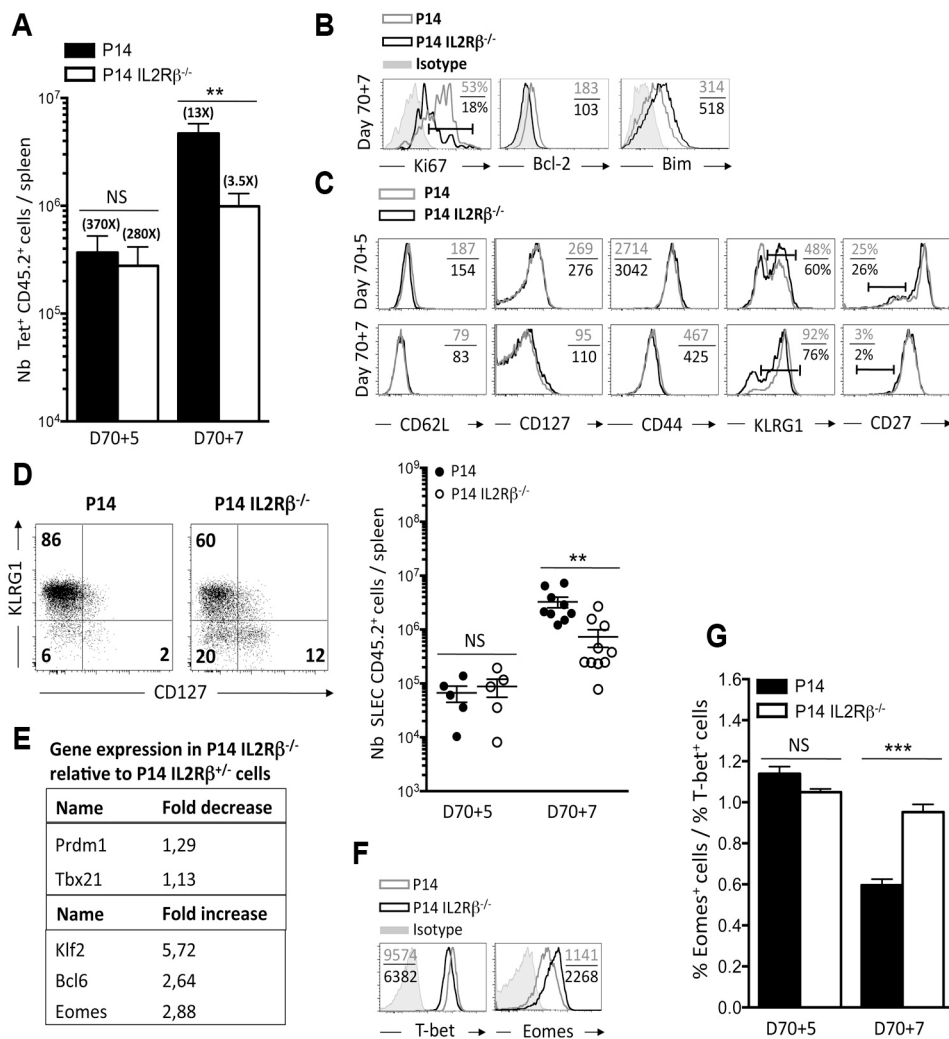


Figure 6 : IL2R β -deficiency restricts the expansion of secondary SLECs.

10^4 P14 IL2R $\beta^{+/-}$ or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ CD45.2⁺ memory CD8⁺ T cells were cell-sorted at day 70 pi and transferred into naive CD45.1.2⁺ mice subsequently infected with 2×10^5 PFU of LCMV Armstrong. Expansion of secondary effector CD8⁺ T cells was analyzed by flow cytometry at day 5 (day 70+5) and day 7 (day 70+7) post challenge. (A) Absolute numbers of P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (black bars) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (white bars) CD8⁺ T cells in the spleen at day 5 and 7 pi (mean \pm SEM of 6-9 mice per time point). Numbers in brackets indicate the fold expansion for each cell population. Day 70+5 fold expansion was calculated by taking into account a 90% mortality rate of transferred cells. (B) Intracellular staining of Ki67, Bcl-2

and Bim by P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (gray line) or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (black line) effector CD8 $^{+}$ T cells at day 5 and 7 pi. Numbers indicate respective frequency of positive cells or MFI for each marker. Results are representative of at least three experiments. (C) Cell surface expression of the indicated differentiation markers by P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (gray line) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (black line) secondary effectors at day 5 and 7 pi. Numbers on histograms indicate the frequency or MFI. Data are representative of 1 out of 3 independent experiments (n=10). (D) Frequency and total numbers of SLEC from P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (opened circle) or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (filled circle) CD8 $^{+}$ T cells at day 5 and 7 pi (mean \pm SEM, n=5). (E) Intracellular expression of T-bet and Eomes in P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (gray line) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (black line) T cells. Numbers indicate respective MFI. Isotype control is shown in shaded gray. (F) Expression of the indicated genes evaluated by RTqPCR. Numbers indicate the fold decrease (upper panel) or increase (lower panel) in each expression level in P14 IL2R $\beta^{-/-}$ versus P14 IL2R $\beta^{+/-}$ CD8 T cells at day 7 pi (n=5). (G) Ratio of the frequency of Eomes $^{+}$ cells over the frequency of T-bet $^{+}$ cells amongst P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (black bar) or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (white bar) T cells at day 7 pi (mean \pm SEM from two separate experiments, n=6). (** p<0.005 *** p<0.0005, NS p \geq 0.05)

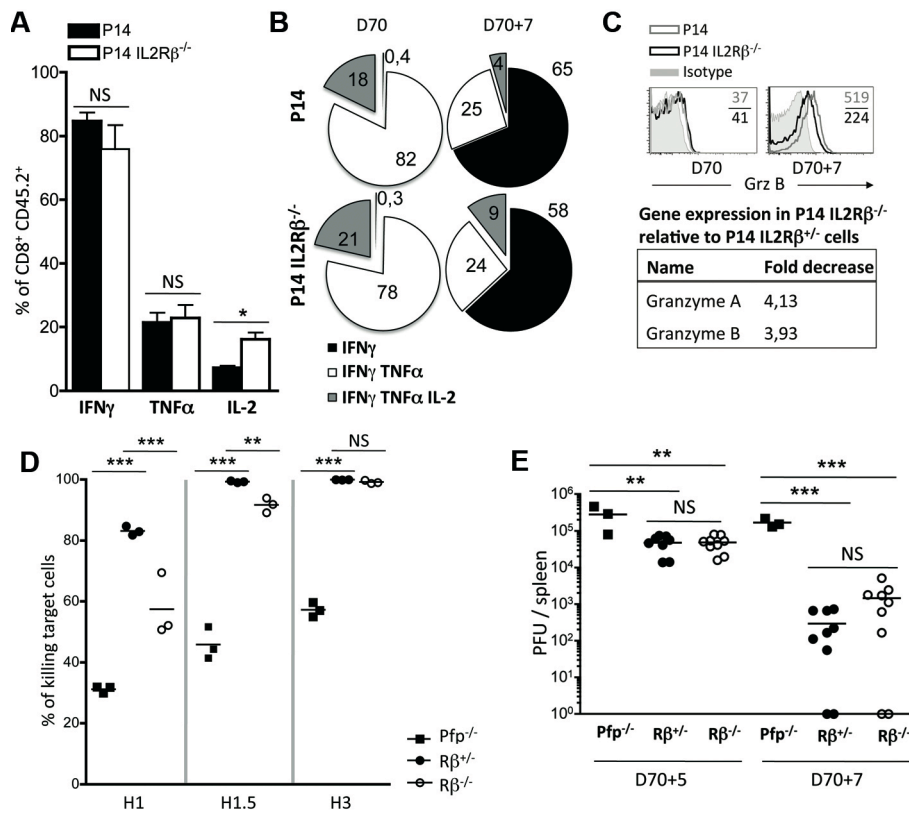


Figure 7 : IL2R β -deficient secondary effectors efficiently control a viral infection

(A) Intracellular cytokine staining for IFN γ , TNF α and IL-2, at day 7 post-challenge, from splenic P14 IL2R β ^{+/-} (upper) and P14 IL2R β ^{-/-} (lower) CD8⁺ T cells. Numbers indicate the percentage of cells in each correspondent quadrant and are representative of two independent experiments (n=6). (B) Pie charts representing the frequency of cells secreting multiple cytokines simultaneously at day 70 (prior to challenge), and at day 70+7 (7 days after challenge) among splenic P14 IL2R β ^{+/-} (upper panel) and P14 IL2R β ^{-/-} (lower panel) cells. Numbers indicate the percentage of each correspondent phenotype from one of two representative experiments (n=6) (C) Intracellular Grz B expression in splenic P14 IL2R β ^{+/-} (gray line) or P14 IL2R β ^{-/-} (black line) at day 70 pi and day 7 post challenge (D70+7). Isotype control is shown in shaded gray. Numbers on histograms indicate MFI (n=10). Expression of the indicated genes evaluated by RTqPCR. Numbers indicate the fold decrease between P14 IL2R β ^{-/-} versus P14

IL2R $\beta^{+/-}$ CD8 T cells at day 7 pi (n=4). (D) Target cell killing after *in vivo* transfer of GP₃₃₋₄₁-loaded splenocytes by P14 (filled circle) and P14 IL-2R $\beta^{-/-}$ (opened circle) effectors at day 7 pi in Pfp $^{-/-}$ recipients (filled square). Numbers below the x-axis indicate the number of hours since target cells were injected (E) Viral titers in P14 IL2R $\beta^{+/-}$ or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ spleens at day 5 and 7 pi (mean \pm SEM; n=3-9 per genotype). (* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005, NS p \geq 0.05)

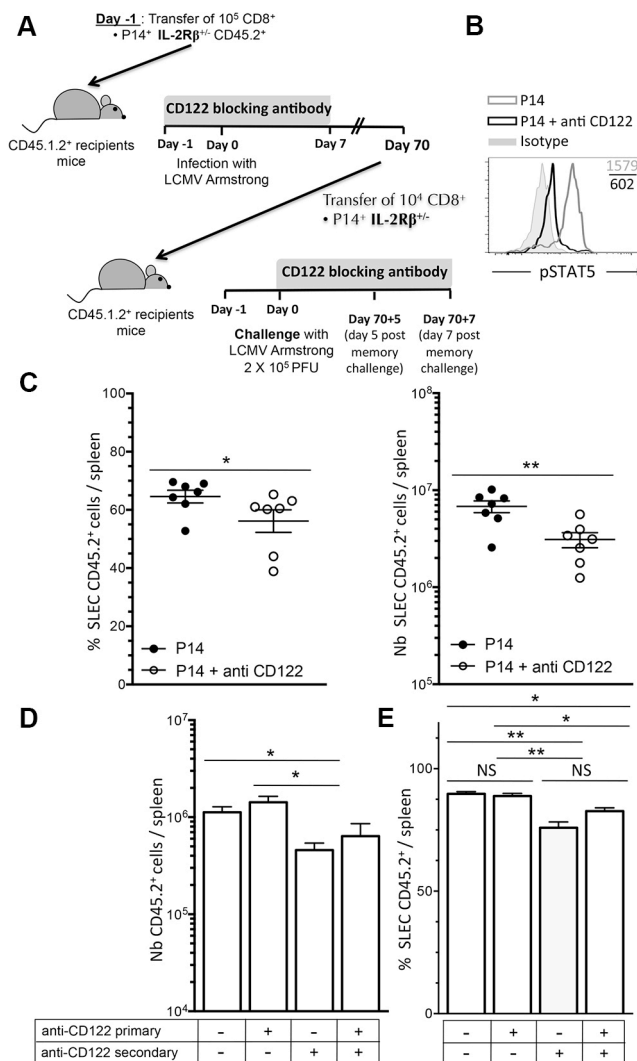
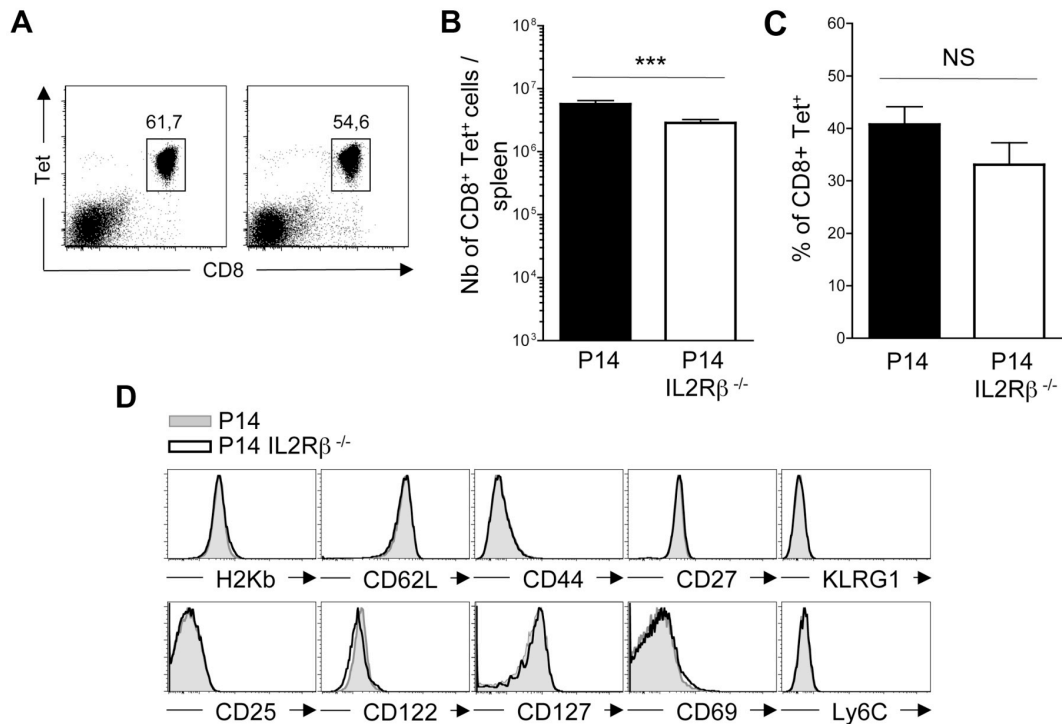


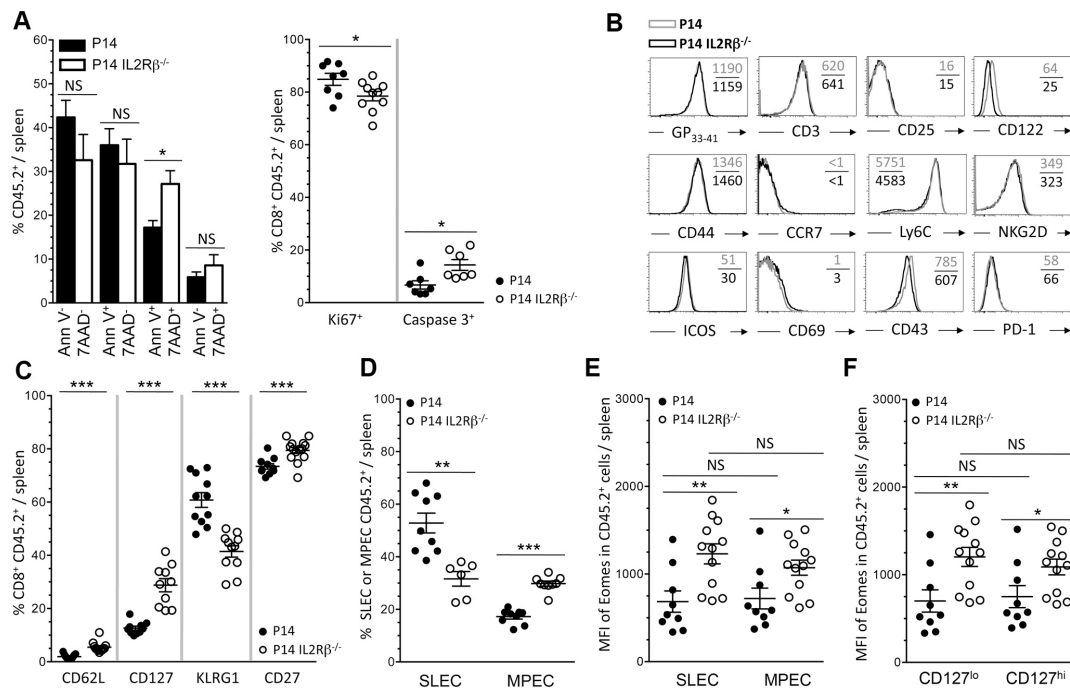
Figure 8 : Blocking CD122 signals during viral rechallenge restrains the expansion of secondary SLECs

(A) Recipient mice were treated ip with 200 μ g of anti-CD122 (TM- β 1) or LTF-2 (control antibody) every other day starting one day prior to cell transfer until day 6 post infection or post challenge. (B) Intracellular staining of phospho STAT5 (Y694) in P14 IL2R β ^{+/-} CD45.2⁺ effectors CD8⁺ T cells treated or not with the anti-CD122 antibody. (C) Frequency and absolute numbers of primary SLECs in P14 IL2R β ^{+/-} (filled circle) and P14 IL2R β ^{+/-} anti-CD122 treated (opened circle). SLEC numbers represent the total of three independent experiments (n=7). (D-E) 10^4 P14 IL2R β ^{+/-} CD45.2⁺ memory CD8⁺ T cells were cell-sorted at day 70 and

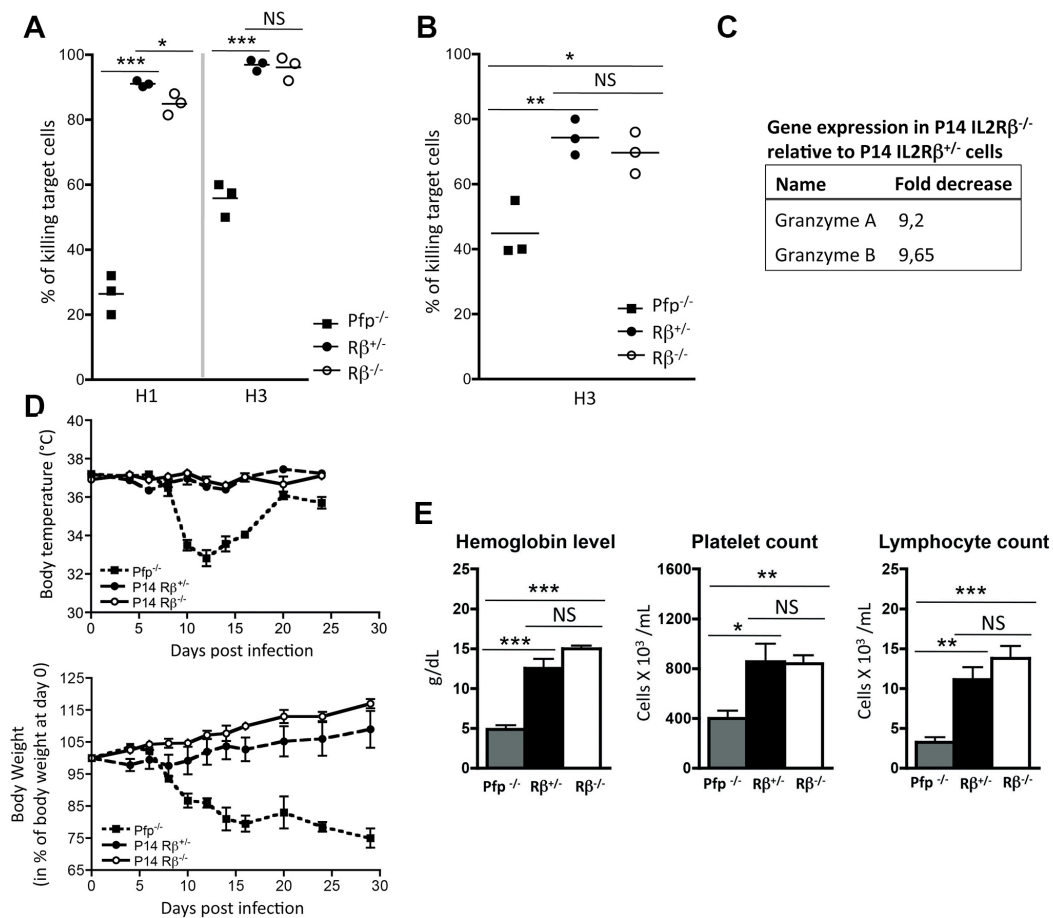
transferred into naive CD45.1.2⁺ mice subsequently infected with 2 X 10⁵ PFU of LCMV Armstrong. (D) Absolute numbers of CD45.2⁺ cells at day 7 post-challenge in P14 IL2Rβ^{+/-} and P14 IL2Rβ^{+/-} anti-CD122 treated upon primary or secondary infection or both (n=3). (E) SLEC frequencies of CD45.2⁺ cells at day 7 post-challenge in P14 IL2Rβ^{+/-} and P14 IL2Rβ^{+/-} anti-CD122 treated upon primary or secondary infection or both (n=3). (* p<0.05, ** p<0.005, NS p≥0.05)



Supplementary Figure 1: IL2R β deficiency allows for the development of a naïve CD8 T cell pool. (A) Flow cytometry analysis of P14 IL2R $\beta^{+/+}$ and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ splenocytes using CD8 antibody and GP₃₃₋₄₁ tetramer. Numbers in dot plots indicate the percentage of each correspondent population. (B-C) Absolute numbers and frequency of total splenic CD8⁺ Tetramer⁺ T cells in P14 IL2R $\beta^{+/+}$ and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ mice. Ten mice (5-9 weeks of age) of each genotype were analyzed (***) $p < 0.0005$, NS $p \geq 0.05$). (D) Cell surface expression of the indicated molecules by P14 IL2R $\beta^{+/+}$ (shaded) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (line) CD8 T cells at baseline. All results are representative of at least three separate experiments.

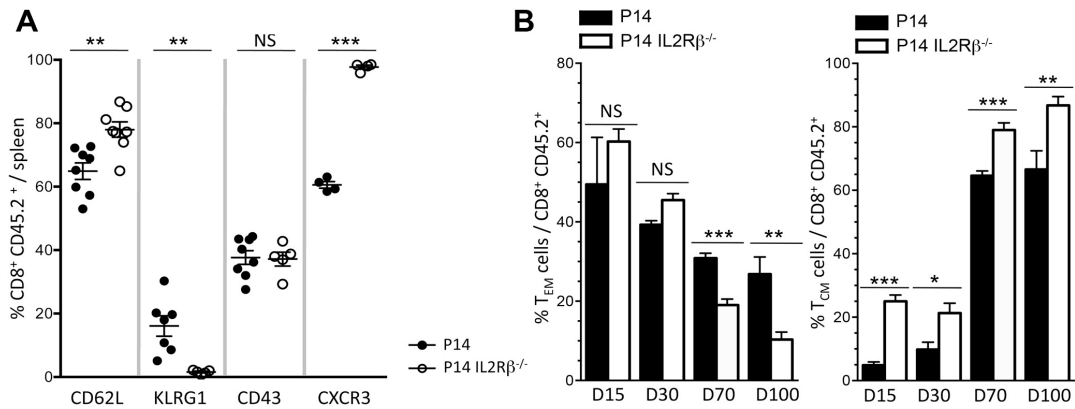


Supplementary Figure 2: IL-2 and IL-15 dependent signals condition the survival and differentiation of primary effectors. (A) Bar graph (left panel) representing the distinct proportions of Annexin V⁺ and/or 7-AAD⁺ in P14 IL2Rβ^{+/-} (black bars) P14 IL2Rβ^{-/-} (white bars) at day 7 pi (n=6). Right panel representing the individual frequency of Ki67⁺ or active caspase-3⁺ P14 IL2Rβ^{+/-} or P14 IL2Rβ^{-/-} CD8⁺ T cells at day 7 pi (n=7). (B) Cell surface expression of the indicated molecules by P14 IL2Rβ^{+/-} (gray line) or P14 IL2Rβ^{-/-} (black line) effector CD8⁺ T cells at day 7 pi. Results are representative of at least three experiments. (C) Individual frequency of the indicated molecules on P14 IL2Rβ^{+/-} (filled circle) or P14 IL2Rβ^{-/-} (opened circle) CD8⁺ T cells at day 7 pi. Results are representative of at least three experiments. (D) Frequency of SLEC and MPEC from P14 IL2Rβ^{+/-} (filled circle) or P14 IL2Rβ^{-/-} (opened circle) CD8⁺ T cells in spleen at day 7 pi. Bar graph is representative of four independent experiments (n=9) (E) MFI of Eomes in SLECs and MPECs of P14 IL2Rβ^{+/-} (filled circle) or P14 IL2Rβ^{-/-} (opened circle) CD8⁺ T cells at day 7 pi (n=9). (F) MFI of Eomes in CD127^{lo} and CD127^{hi} P14 IL2Rβ^{+/-} (filled circle) or P14 IL2Rβ^{-/-} (opened circle) CD8⁺ T cells at day 7 pi (n=9). (* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005, NS p≥0.05)



Supplementary Figure 3: IL2R β -deficient effector cells efficiently kill target cells and prevent the development of HLH in perforin-deficient mice infected with LCMV Armstrong. 10^5 (Figures A, C-E) or 10^4 (Figure B) naive P14 IL2R $\beta^{+/-}$ or P14 IL2R $\beta^{-/-}$ CD8 $^+$ T cells were adoptively transferred into naive perforin-deficient (Pfp $^{-/-}$) mice that were subsequently infected with 2×10^5 PFU of LCMV Armstrong. (A) *In vivo* cytotoxic assay testing the killing function in 1 and 3 hours of day 7 P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (filled circle) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (opened circle) CD8 $^+$ effector T cells compared to infected (filled square) and uninfected/naïve (opened square) Pfp $^{-/-}$ cells. (B) *In vivo* cytotoxic assay testing the killing function in 3 hours of day 7 P14 IL2R $\beta^{+/-}$ (filled circle) and P14 IL2R $\beta^{-/-}$ (opened circle) CD8 $^+$ effector T cells compared to infected (filled square) and uninfected/naïve (opened square) Pfp $^{-/-}$ cells. (C) Expression of the indicated genes evaluated by RTqPCR. Numbers indicate the fold decrease between P14 IL2R $\beta^{-/-}$ versus P14 IL2R $\beta^{+/-}$ CD8 T cells at day 7 pi (n=5) (D) Mean body weight (upper panel) and

mean core body temperature (lower panel) of Pfp^{-/-} (filled square) mice transferred with P14 IL2Rβ^{+/-} (filled circle) and P14 IL2Rβ^{-/-} (opened circle) CD8⁺ T cells. The data are representative of the mean ± SEM for 6 to 10 mice per group. (E) Hemoglobin level, platelet count and lymphocyte count at day 12 pi in P14 IL2Rβ^{+/-} (black bars), P14 IL2Rβ^{-/-} (white bars) chimeric mice and nonchimeric Pfp^{-/-} (gray bars) mice. Gray-shaded area represents the normal values for naive Pfp^{-/-} control mice (mean ± SEM). Differences are not significant between P14 IL2Rβ^{+/-} and P14 IL2Rβ^{-/-} groups but each of them is statistically different from the Pfp^{-/-} control group. (* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005, NS p≥0.05)



Supplementary Figure 4: IL-2 and IL-15 dependent signals condition the maintenance of T_{EM} cells.

(A) Individual frequency of the indicated molecules on P14 IL2Rβ^{+/-} (filled circle) or P14 IL2Rβ^{-/-} (open circle) CD8⁺ T cells at day 70 pi. Results are representative of at least three experiments. (B) Bar graph representing the frequency of T_{EM} (left panel) and T_{CM} (right panel) amongst P14 IL2Rβ^{+/-} (black bars) and P14 IL2Rβ^{-/-} (white bars) cells over a 100-day time course. Results are representative of four to thirteen mice per time-point from four independent experiments. (* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005, NS p≥0.05)

