

Université de Montréal

Contrôle circadien de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique

Par

Chloé C. Nobis

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie Faculté de Médecine

Université de Montréal

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de PhD de la Faculté des Études Supérieures en
microbiologie et immunologie

Juin, 2019

© Chloé C. Nobis, 2019

Université de Montréal

Unité académique : Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de
Médecine

Cette thèse intitulée

Contrôle circadien de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique

Présenté par

Chloé C. Nobis

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Jacques Thibodeau
Président-rapporteur

Nathalie Labrecque
Directeur de recherche

Nicolas Cermakian
Codirecteur

Jean-François Gauchat
Membre du jury

Sheela Ramanathan
Examineur externe

Résumé

Les rythmes circadiens contrôlent de nombreux aspects de la physiologie chez les mammifères. Parmi ces processus physiologiques, les horloges circadiennes contrôlent entre autres la réponse immunitaire innée et adaptative. Depuis des décennies, de nombreuses études ont commencé à couvrir ce sujet. Cependant, le contrôle circadien de la réponse adaptative reste peu étudié. Dans le cadre de ce projet de recherche de doctorat, nous avons exploré le rôle des rythmes circadiens dans la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique par des cellules dendritiques.

Des travaux du laboratoire publiés par Erin E. Fortier et *al.* ont mis en évidence une différence jour/nuit dans l'expansion des lymphocytes T CD8 dont le récepteur T (TCR) est spécifique au complexe K^bOVA exprimé par les cellules dendritiques ainsi que dans le nombre de lymphocytes T CD8 CD44^{hi} IFN⁺ spécifiques pour l'antigène de l'ovalbumine (OVA)¹. En effet, la réponse des lymphocytes T CD8 est plus importante après une vaccination faite en milieu de jour (zeitgeber time (ZT) 6) par rapport à une vaccination faite en milieu de nuit (ZT18). Cependant, ces travaux de recherche n'ont pas démontré le rôle des horloges circadiennes dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.

Mes travaux de recherche de doctorat ont dans un premier temps confirmé l'implication des horloges circadiennes dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. Nous avons ensuite démontré la contribution des horloges circadiennes des cellules dendritiques ainsi que le rôle essentiel des horloges circadiennes des lymphocytes T CD8 dans ce rythme de réponse. De plus, nous avons montré que ce rythme avait un impact sur la capacité des lymphocytes T CD8 à contrôler une infection bactérienne (*Listeria monocytogenes*). En effet, les variations jour/nuit de la charge bactérienne dans la rate et le foie des souris de type sauvage étaient abolies dans les souris déficientes pour le gène des horloges circadiennes *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8. Dans un second temps, nous avons mis en évidence suite à l'analyse du transcriptome des lymphocytes T CD8 de souris naïves collectés toutes les 4 heures sur 48 heures que ces cellules sont plus enclines à être activées le jour et à l'opposé plus enclines à être inhibées la nuit. Ces résultats corrélaient avec le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la vaccination. Dans un dernier temps, nous avons confirmé que le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à

la présentation antigénique agissait de manière précoce dans l'activation de ces cellules. Pour cela nous avons irradié des souris de type sauvage et nous les avons ensuite reconstituées avec une moelle osseuse contenant 1% de précurseurs de cellules OT-I (lymphocytes T CD8 spécifiques au complexe K^bOVA, exprimant la chaîne du TCR V β 5. Après vaccination de ces souris en milieu de jour subjectif (*circadian time* (CT) 6) ou en milieu de nuit subjective (CT18), nous avons observé un rythme de la réponse des lymphocytes CD8 pour différents marqueurs impliqués dans la réponse précoce des lymphocytes T CD8, telles que CD69, CD5, IRF4, et la phosphorylation de S6 (marqueur de l'activité de mTOR) et de AKT.

L'ensemble des recherches de mon doctorat ont permis de mettre en évidence un tout nouveau mécanisme impliquant les horloges circadiennes dans la réponse des lymphocytes T CD8 en réponse à une vaccination. Une meilleure compréhension du fonctionnement des horloges circadiennes dans la réponse immunitaire permettra de mettre en place des nouveaux traitements personnalisés en fonction du type d'infection et du type de maladie, délivré à un certain moment de la journée dans le but d'améliorer l'efficacité tout en réduisant les effets secondaires.

Mots-clés : Lymphocytes T CD8, cellules dendritiques, vaccination, TCR, transcriptome, rythmes circadiens, horloges circadiennes.

Abstract

Circadian rhythms control various aspects of the physiology in mammals. Among these processes, circadian clocks control the innate and the adaptive immune responses. Since few decades, numerous studies started to uncover the role of the circadian system in the immune response. However, the circadian control of the adaptive immune response remains poorly studied. My PhD work focused on the circadian control of the CD8 T cell response to vaccination by dendritic cells.

Erin E. Fortier *et al.* published in *The Journal of Immunology* that wild type mice vaccinated with antigen presenting cells loaded with the OVA peptide present a day/night variation of the CD8 T cell response after a vaccination done during the middle of the day (zeitgeber time (ZT) 6) compared to a vaccination done during the middle of the night (ZT18)¹. Indeed, the proportion of CD8 K^bOVA⁺ cells and the proportion of CD8 CD44^{hi} IFN⁺ T cells were higher during the middle of the day than the middle of the night. However, this work showed a diurnal but not a circadian rhythm, that remained to be confirmed.

The first part of my PhD research confirmed a role of the circadian system in the rhythm of the CD8 T cell response to vaccination. We showed a contribution of the dendritic cell clock as well as an essential role of the CD8 T cell clock. Moreover, this rhythm impacts the ability to control an infectious challenge as shown by a circadian variation in bacterial load (*Listeria monocytogenes*) in wild type but not in mice lacking clock in mature CD8 T cells. The second part of my research focused on the analysis of the transcriptome of CD8 T cells from naive mice collected every 4 hours over 48 hours. We showed that CD8 T cells are more prone to be activated during the day and at the opposite are more prone to be inhibited during the night. These results are correlated with the rhythm of the CD8 T cell response to vaccination. Finally, during the third part of my PhD, we confirmed that the rhythm of the CD8 T cell response to antigen presentation was acting at the early stage of the CD8 T cell activation. We used wild type mice reconstituted with bone marrow cells containing 1% of OT-I precursor cells (CD8 T cells restricted for the K^bOVA complex, expressing the receptor chain of the TCR for the OVA peptide, V β 5) and vaccinate these mice during the middle of the subjective day (CT6) or during the middle of the subjective night (CT18). At the early stage of the CD8 T cell response to vaccination, we showed

a higher expression of several activation markers after a vaccination done during the middle of the day than during the middle of the night, such as CD5, CD69, IRF4 and the phosphorylation of S6 (marker of the mTOR activity) and AKT.

Altogether, my PhD work highlights a new mechanism involving the circadian system in the control of the immune response. A better understanding of how circadian clocks act on the immune response will allow implementing new treatment strategies in order to increase their efficacy as well as to decrease side effects.

Keywords: CD8 T cells, dendritic cells, vaccination, TCR, transcriptome, circadian rhythms, circadian clocks.

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	15
Liste des figures	17
Liste des sigles et abréviations	19
Remerciements	31
Chapitre 1 – Introduction	35
1. La réponse immunitaire.....	35
1.1 Généralités	35
<i>La réponse immunitaire innée</i>	35
<i>La réponse immunitaire adaptative</i>	36
1.2 Les cellules présentatrices d’antigènes	37
1.3 Les cellules dendritiques.....	37
<i>Développement des cellules dendritiques</i>	38
<i>Apprêtement et présentation antigénique</i>	40
Apprêtement et présentation antigénique via la molécule de CMH-I : antigène d’origine endogène.....	40
Apprêtement et présentation antigénique via la molécule de CMH-I : antigène d’origine exogène.....	42
Apprêtement et présentation antigénique via la molécule de CMH-II : antigène d’origine exogène.....	44
<i>Les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC)</i>	44
<i>Les cellules dendritiques et les thérapies vaccinales</i>	45

1.4	Les lymphocytes T	47
	<i>Développement des lymphocytes T</i>	47
	<i>Phase d'activation des lymphocytes T</i>	48
	La reconnaissance antigénique.....	49
	La signalisation du TCR.....	50
	La transduction du TCR	51
	La formation de la synapse immunologique	53
	Les molécules de costimulations.....	54
	Les facteurs solubles, les cytokines.....	55
	L'aide des lymphocytes T CD4.....	56
	<i>Phase de différenciation des lymphocytes T CD8 : propriétés et phénotypes cellulaires des lymphocytes T effecteurs</i>	57
	Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des lymphocytes T CD8	58
	L'adaptation métabolique.....	60
	<i>Phase de contraction des lymphocytes T</i>	63
	<i>Phase de mémoire des lymphocytes T</i>	63
2.	Les rythmes circadiens	64
2.1	Généralité	64
2.2	Mécanismes cellulaires et moléculaires des rythmes circadiens	65
	<i>Mécanismes cellulaires</i>	65
	L'horloge centrale : les noyaux suprachiasmatiques.....	65
	Les horloges périphériques.....	68
	<i>Mécanismes moléculaires</i>	71
	La boucle de rétroaction transcriptionnelle/traductionnelle des gènes des horloges circadiennes.....	72

Les modèles murins génétiquement modifiés pour l'études des rythmes circadiens.....	73
La fonction des gènes des horloges circadiennes : action sur les gènes contrôlés par les horloges circadiennes	75
2.3 Contrôle circadien de la réponse immunitaire	78
<i>Contrôle circadien de l'homéostasie du système immunitaire</i>	78
Rôle intrinsèque des horloges circadiennes	78
Rôle extrinsèque des horloges circadiennes.....	79
<i>Contrôle circadien de la réponse immunitaire innée</i>	82
Réponses immunitaires aux molécules dérivées de microbes.....	82
Réponses immunitaires à un microorganisme.....	85
<i>Contrôle circadien de la réponse immunitaire adaptative</i>	87
Prolifération des lymphocytes en réponse à un antigène	88
Réponse des lymphocytes T suite à une stimulation antigénique in vitro ou ex vivo....	89
Réponse des lymphocytes T suite à une stimulation antigénique in vivo.....	89
Chapitre 2 – Raisonnement et hypothèse	93
Chapitre 3 – Matériels et méthodes.....	95
1. Souris.....	95
2. Cytométrie en flux.....	95
3. Vaccination DC-OVA/DC-LPS	100
4. Bioluminescence des BMDC	101
5. Bioluminescence des lymphocytes T CD8.....	102
6. Transcription inverse, PCR quantitative et transfert de protéines.....	102
7. Test de migration des BMDC <i>in vivo</i>	103
8. Séquençage des ARN	104
9. Chimères hématopoïétiques	105

10.	Méthode d'analyse de l'intensité relative de fluorescence (RFI).....	106
11.	Stimulation <i>ex vivo</i> de cellules OT-I : analyse de la phosphorylation de cibles de la voie PI3K/AKT/mTOR.....	106
12.	Infection bactérienne avec <i>Listeria monocytogenes</i> -OVA (Lm-OVA)	107
13.	Schémas expérimentaux des figures 11, 15, 17, 18 et 20.....	107
14.	Analyses statistiques	107
Chapitre 4 – Résultats		109
1.	L'horloge des lymphocytes T CD8 module la réponse précoce des lymphocytes T CD8 ainsi que l'expression des gènes reliés à la signalisation du TCR en réponse à la présentation antigénique	109
1.1	Le niveau d'activation et de chargement des cellules dendritiques ne varie pas sur 24 heures	110
1.2	La différence jour/nuit de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique est d'origine circadienne.....	111
1.3	L'horloge des cellules dendritiques contribue à la différence jour/nuit de la réponse des lymphocytes T CD8 a la présentation antigénique.....	112
1.4	La migration des DC-OVA déficientes pour le gène <i>Bmal1</i> est altérée à CT6	116
1.5	Caractérisation des souris déficientes pour le gène <i>Bmal1</i> dans les lymphocytes T CD8 matures	117
1.6	Le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique n'est ni dû à un rythme de la migration des cellules dendritiques, ni dû à un rythme du nombre de lymphocytes T CD8 dans la rate des souris f/f et Δ/Δ	119
1.7	L'horloge des lymphocytes T CD8 est essentielle à la différence jour/nuit de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique	121
1.8	La variation circadienne de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique n'implique pas la nature de la chaîne V beta du TCR des lymphocytes T CD8	

1.9	Contrôle circadien des voies de signalisation impliquées dans l'activation/l'inhibition des lymphocytes T CD8	124
1.10	La régulation circadienne de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique agit à des temps précoces de la réponse des lymphocytes T CD8.....	129
1.11	La phosphorylation de S6 et d'AKT, facteurs clés des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, dans les lymphocytes T CD8 naïfs est fortement augmentée après une stimulation du TCR à CT6 par rapport à CT18.....	135
1.12	L'horloge des lymphocytes T CD8 contrôle les variations circadiennes dans le contrôle d'une infection avec <i>Listeria monocytogenes</i> -OVA suite à une vaccination avec des DC-OVA	137
Chapitre 5 – Discussion.....		139
1.	Les horloges circadiennes des cellules immunitaires contrôlent la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique	139
1.1	Une horloge circadienne contrôle la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique	141
1.2	Les horloges circadiennes des cellules dendritiques.....	142
	<i>Contribution des horloges circadiennes des cellules dendritiques dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 a la présentation antigénique</i>	142
	<i>Perspectives</i>	145
1.3	Les horloges circadiennes des lymphocytes T CD8	148
	<i>Contribution des horloges circadiennes des lymphocytes T CD8 dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 a la présentation antigénique</i>	149
	<i>Perspectives</i>	154
1.4	Fonctionnement et impact des horloges circadiennes des lymphocytes T CD8.....	156
Chapitre 6 – Conclusion.....		159
Références bibliographiques		161
Annexes.....		203

1. Liste des gènes des horloges circadiennes exprimés de manière rythmique dans les tissus et cellules de rats et souris.....203
2. Schémas expérimentaux205
3. Liste des gènes rythmés dans les lymphocytes T CD8 organisés par phase d'expression
208

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Phénotypes associés à l'altération des horloges circadiennes chez la souris	78
Tableau 2. –	Anticorps et réactifs utilisés en cytométrie en flux.	100

Liste des figures

Figure 1. – Développement des cellules dendritiques	39
Figure 2. – Apprêtement et présentation antigénique via les molécules de CMH-I (a) ou de CMH-II (b) ⁸³	41
Figure 3. – Voie intracellulaire de la présentation croisée dans les cellules dendritiques. Théorie de l'antigène d'origine cytosolique (gauche) et théorie de l'antigène d'origine vacuolaire (droite) ⁸⁵ . 43	43
Figure 4. – La signalisation du TCR suite à une stimulation antigénique	51
Figure 5. – Composition et organisation des noyaux suprachiasmatiques	67
Figure 6. – Boucle de rétroaction transcriptionnelle/traductionnelle des gènes de l'horloge. Légende : flèches verte (activation de la transcription), flèches rouges (inhibition de la transcription) 73	73
Figure 7. – Le niveau de chargement avec le peptide OVA ₂₅₇₋₂₆₄ et le niveau d'activation avec le LPS des BMDC ne varient pas entre les deux temps de vaccination.....	110
Figure 8. – Le rythme de la réponse des lymphocytes T CD8 est contrôlé par une horloge circadienne. 112	112
Figure 9. – L'absence d'horloge circadienne dans les cellules dendritiques n'influence pas le niveau de chargement avec le peptide OVA ₂₅₇₋₂₆₄ ainsi que le niveau d'activation des BMDC. 114	114
Figure 10. – L'horloge des cellules dendritiques contribue aux variations circadiennes de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.....	115
Figure 11. – L'absence du gène <i>Bmal1</i> dans les BMDC entraîne une diminution de la migration de ces cellules vers la rate.	116
Figure 12. – L'absence de l'horloge circadienne dans les lymphocytes T CD8 matures n'affecte pas le comportement des souris.....	118
Figure 13. – Le rythme de la réponse des lymphocytes T CD8 n'est pas dû à un rythme de la migration des BMDC ou du nombre de lymphocytes T CD8 de la rate.	120
Figure 14. – L'horloge circadienne des lymphocytes T CD8 matures est essentielle à la rythmicité de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.....	121

Figure 15. – La nature de la chaîne V beta du TCR des lymphocytes T CD8 n'est pas responsable de la rythmicité de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. 123

Figure 16. – Contrôle circadien des lymphocytes T CD8.....128

Figure 17. – L'Horloge circadienne des lymphocytes T CD8 contrôle la réponse précoce des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.....134

Figure 18. – La stimulation antigénique à CT6 de lymphocytes T CD8 naïfs entraîne une plus forte phosphorylation des protéines S6 et AKT.136

Figure 19. – L'horloge des lymphocytes T CD8 module les variations circadiennes dans le contrôle d'une infection avec *Listeria monocytogenes*-OVA suite à une vaccination avec des DC-OVA. 138

Liste des sigles et abréviations

5HT: 5-hydroxytryptamine (sérotonine)

6-OHDA: 6-hydroxydopamine

7-AAD: 7-aminoactinomycine D

ADN: Acide désoxyribonucléique

AICD: *Activation induced cell death*

AKT: Protéine kinase B

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

AP-1: *Activator protein 1*

APC: Allophycocyanine

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATP: Adénosine triphosphate

AVP: *Arginin vasopressin*

BATF: *Basic leucine zipper transcription factor*

BATF3: *Basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3*

BCL-XL: *B-cell lymphoma extra large*

BCL2: *B-cell lymphoma 2 protein*

BCL6: *B-cell lymphoma 6 protein*

BCR: *B cell receptor*

BFA: *Brefeldin A*

BHI: *Brain heart infusion*

BIM: *Bcl2-like protein 11*

BLIMP1: *B lymphocyte-induced maturation protein 1*

BMAL1: *Brain and muscle ARNTL-Like 1*

BMDC: *Bone marrow derived dendritic cells*

c-SMAC: *Central region of the supramolecular activation complex*

CCG: *Clock controlled genes*

CCL: *C-C chemokine ligand*

CCR: *C-C chemokine receptor*

CD: *Cluster of differentiation*

cDC: *Classical dendritic cell*

CDKN2A: *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A*

CDR1: *Complementarity determining region 1*

CDR2: *Complementarity determining region 2*

CDR3: *Complementarity determining region 3*

CFP: *Cyan fluorescent protein*

CFSE: *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CFU: *Colony Forming unit*

Clock: *Circadian locomotor output cycles protein kaput*

CMH-I: *Complexe majeur d'histocompatibilité de type I*

CMH-II: *Complexe majeur d'histocompatibilité de type II*

Cry1: *Cryptochrome 1*

Cry2: *Cryptochrome 2*

CSF-1: *Colony stimulating factor 1*

CSF-2: *Colony stimulating factor 2*

CT: *Circadian time*

cTEC: Cellule épithéliale thymique corticale

CTLA4: *Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*

CX3CR1: *C-X3-C motif chemokine receptor 1*

CXCL1: *C-X-C motif ligand 1*

CXCR4: *C-X-C motif chemokine receptor 4*

d-SMAC: *Distal region of the supramolecular activation complex*

Δ/Δ : Souris *Bmal1*^{flox/flox} – *E8I-Cre*^{+/-} (Souris déficientes pour le gène *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 matures)

DAG: *Diacylglycerol*

DAMP: *Danger associated molecular pattern*

DC-LPS: Cellule dendritique activée avec le LPS

DC-OVA: Cellule dendritique activée avec le LPS puis chargée avec le peptide OVA

DD: Dark dark (constante obscurité)

DMH: Hypothalamus dorsomédian

DN: Thymocyte double négatif

DP: Thymocyte double positif

DTR: *Diphtheria toxin receptor*

EAE: *Experimental autoimmune encephalomyelitis*

ENU: N-nitroso-N-éthylurée

Eomes: *Eomesodermin*

f/f: Souris *Bmal1*^{flox/flox} – *E8I-Cre*^{-/-} (Souris suffisantes pour le gène *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 matures)

FASL: *Fas ligand*

FBS: *Fetal bovine serum*

FDR: *False discovery rate*

Fig: Figure

Flt3: *Fms-like tyrosine kinase 3*

Flt3l: *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*

FOXO-1: *Forkhead box 1*

GABA: *Gamma-aminobutyric acid*

GHT: hypothalamique géniculaire

GITR: *Glucocorticoid-induced TNFR family related gene*

Glu: Glutamine

GLUT-1: *Glucose transporter 1*

gMFI: *geometric mean fluorescence intensity*

GR: Récepteur au glucocorticoïde

GRP: *Gastrin-releasing peptide*

GSK3B: Glycogène synthase kinase 3 bêta

HEPES: Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HIV: *Human immunodeficiency virus*

HLA: *Human leukocyte antigen*

HSC: *Hematopoietic stem cell*

HSV: *Herpes simplex virus*

ICAM: *Intercellular adhesion molecule*

ID2: *Inhibitor of DNA binding 2*

ID3: *Inhibitor of DNA binding 3*

IFN β : Interféron β

IFN: Interféron γ

IgG: Immunoglobuline G

IGL: *hypothalamique géniculaire*

IgM: Immunoglobuline M

IL: Interleukine

ILC: *Innate lymphoid cell*

IP3: Phosphoinositide 3-kinase

IRF4: *Interferon regulator factor 4*

IRF8: *Interferon regulator factor 8*

ITAM: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

JAK1: *Janus kinase 1*

JAK2: *Janus kinase 2*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

KLRG1: *Killer cell lectin-like receptor G1*

LAT: *Linker for activation of T cells*

LC: *Langerhans cell*

LCK: *Leukocyte C-terminal Src kinase*

LCMV: *Lymphocytic choriomeningitis virus*

LD: light dark (12 heures lumière/12 heures obscurité)

LM: *Listeria monocytogenes*

LM-OVA: *Listeria monocytogenes - OVA*

LPS: Lipopolysaccharide

LXR: *Liver X receptor*

MAMP: *microorganism-associated molecular pattern*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MLR: *Mixed leukocyte reaction*

MMP9: Matrix metallopeptidase 9

moDC: *Monocyte derived dendritic cell*

MOG: *Myelin oligodendrocyte protein*

MPEC: *Memory precursor effector cell*

MR: Raphé médian

MT1: Récepteur à la mélatonine 1

MT2: Récepteur à la mélatonine 2

mTEC: Cellule épithéliale thymique médullaire

mTOR: *Mammalian target of rapamycin*

NaCl: Sodium chlorure

NF- κ B: *Nuclear factor kappa B subunit 1*

NFAT: *Nuclear factor of activated-T cell*

NFIL3: *Nuclear factor interleukin 3 regulated*

NLR: *Nod like receptor*

NO: *Nitric oxide*

NP-CGG: *Chicken gamma globulin*

Npas2: Neural PAS domain protein 2

NPY: Neuropeptide Y

Nr1d1: *Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1*

NSC: Noyaux suprachiasmatiques

OVA: Peptide de l'ovalbumine

p-SMAC: *Proximal region of the supramolecular activation complex*

PACAP: Polypeptide activant l'adénylate cyclase

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cell*

PBS: *Phosphate buffer saline*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PD1: *Programmed cell death 1*

pDC: *plasmacytoid dendritic cell*

PDK1: *Pyruvate dehydrogenase kinase 1*

PDL1: *Programmed cell death 1 ligand*

PE: *Phycoerythrin*

Per1: Period1

Per2: Period2

PER2::LUC: PER2::LUCIFERASE

Per3: Period3

PFA: *Paraformaldéhyde*

PHA: *Phytohémagglutinine*

PI3K: *Phosphoinositide 3 kinase*

PIP2: *Phosphatidylinositol(4,5)biphosphate (PtdIns(4,5)P2*

PIP3: *Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*

PKC: *Protéine kinase C*

PLC: *Phospholipase C*

pré-DC: *Pré cellule dendritique*

PRR: *Pattern recognition receptor*

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

Rag2: Recombination-activating gene 2

RFI: *Relative fluorescence intensity*

RHEB: *Ras homolog enriched in brain*

RHT: Système hypothalamique rétinien

RIG-1: *Retinoic acid inducible gene 1*

ROR: *RAR related orphan receptor A*

ROS: *Reactive oxygen species*

RPMI: *Roswell park memorial institute medium*

RUNX3: *RUNX family transcription factor 3*

S1P1R: *Sphingosine-1-phosphate receptor 1*

SEM: *Standard error mean*

SIRP α : *Signal regulatory protein alpha*

SLEC: *Short lived effector cell*

SP: Thymocyte simple positif

STAT: *Signal transducer and activator of transcription*

TBET: *T-box 21*

TCR: *T cell receptor*

tDC: *Thymic dendritic cell*

TetOVA: Tetramère OVA

TGF β 1: *Transforming growth factor beta 1*

Th1: Lymphocyte T *helper 1*

Th17: Lymphocyte T *helper 17*

Th2: Lymphocyte T *helper 2*

TLR: *Toll like receptor*

TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*

TNFR: *Tumor necrosis factor receptor*

TRAF: *Tumor necrosis factor receptor-associated factor*

TRAIL: *Tumor-necrosis factor related apoptosis inducing ligand*

TRAILR: *Tumor-necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor*

VCAM: *Vascular cell adhesion molecule*

VIP: *Vasoactive intestinal peptide*

VSV: *Vesicular stomatitis virus*

ZAP70: *Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70*

ZT: *Zeitgeber time*

« Deviens ce que tu es »,

Nietzsche (1844-1900)

À toi, Louis.

Remerciements

Dans un premier temps, je souhaite remercier mes deux directeurs de thèse, le *Dr Nicolas Cermakian* et le *Dre Nathalie Labrecque* de m'avoir accueilli dans leur laboratoire respectif et de m'avoir permis de conduire ce projet de recherche fascinant dans le domaine de la *chron-immunologie*. Merci d'avoir été patient toutes ces années et de m'avoir formé pour devenir un jeune chercheur et pour le temps passé à discuter du projet de recherche ainsi que pour le travail fourni en arrière, corrections de résumés, d'articles de revues, de présentations, d'article scientifique, ainsi que l'opportunité de m'avoir laissé présenter mes travaux de recherche dans de nombreux congrès locaux, nationaux et internationaux.

Je souhaite remercier mes *lab mates* de mon premier *lab* : *Silke* et *Marc* pour les discussions intéressantes sur la chronobiologie et bien plus encore et qui ont su me redonner espoir quand je ne pensais pas y arriver ; *Christine* pour sa gentillesse et son honnêteté et *Lois* et *Catherine* des étudiantes d'été/honneurs qui ont toujours été agréables et très matures pour leur âge. Bien évidemment mon deuxième *lab* que je ne voyais pas souvent, mais qui dans la majorité du temps m'a fait beaucoup rire avec leurs histoires. *Livia* pour son savoir et son extrême gentillesse, *Salix* pour son savoir et sa sagesse, *Dave* pour son enthousiasme permanent, son aide pour des manips de nuit et son jingle : Chloé Nobis Métabolisme ! et *Jean-François* pour son humour et son enthousiasme pour la recherche.

Je remercie tout particulièrement de tout mon cœur *Geneviève (Gen)* qui a toujours été là pour moi au *lab* et en dehors lorsque tout allait bien ou mal. Qui a été une amie précieuse pendant toutes ces années et qui finalement a été un des piliers les plus importants lors de cette aventure. Merci mille fois pour tout.

Je remercie également mes plus proches amies d'ici et d'ailleurs : *Chloé* et *Lulu*, qui par des circonstances inattendues nous ont rapprochées et permis de développer une amitié forte et durable lors de cette aventure qu'est le doctorat. *Marianne*, *Sandrine* et *Florence* que je connais

depuis une vingtaine d'années maintenant et qui ont toujours étaient là pour moi alors que nous étions dans des pays voir des continents différents.

Je remercie également *Colleen, Dominique* et *Martine* pour leurs écoutes, sagesses, conseils et aides. Il est vraiment rare de rencontrer des personnes authentiques à qui l'on peut se confier et discuter de sujets légers comme de sujets sérieux.

Je remercie le *Dr Florian Storch* pour les quelques discussions sur la chronobiologie que nous avons eu lors de séminaires, congrès ou rencontre à l'Institut de recherche et pour son soutien dans le cheminement de mon doctorat.

Je remercie le *Dre Pétronela Ancuta*, le *Dr David Morse* et le *Dr Jacques Thibodeau* pour avoir fait partie de mes comités de suivi et lors de mon examen prédoctoral.

Je remercie tous nos collaborateurs, le *Dre. Sylvie Lesage*, le *Dre Kelly-Anne Pike*, le *Dre Simona Stäger*, le *Dr Florian Storch*, et le *Dr Michel Tremblay* pour nous avoir permis de lancer toutes nos colonies de souris et donc de pouvoir conduire ce projet de recherche.

Je remercie les membres de mon jury de soutenance de thèse, le *Dr Jean-François Gauchat*, le *Dre Sheela Ramanathan* et le *Dr Jacques Thibodeau* pour avoir accepté d'évaluer et de corriger mes travaux de recherche que j'ai conduits ces cinq dernières années.

Pour finir et non les moindres, je souhaite remercier ma famille pour tout leur soutien. Plus particulièrement ma *Maman* pour son soutien indéfectible tout au long de mes études et pour m'avoir toujours poussé à me dépasser. Je remercie également mon grand frère *Denis* qui ne le sait probablement pas, mais qui est un modèle de réussite dans la vie pour moi et que j'admire en tant que personne. Et bien évidemment ma petite sœur *Ophélie*, ne change pas tu es parfaite comme tu es.

Cinq années se sont achevées ici au Canada, et bien que j'aie souvent eu l'impression d'être figée et de ne pas avancer au rythme que je mettais imposé tant dans mon doctorat que dans ma vie personnelle, je me rends compte que c'est ici que je suis devenue qui je suis. Et pour tout ça, je souhaite remercier l'ensemble des personnes qui ont croisé ma route ici au Canada.

Chapitre 1 – Introduction

1. La réponse immunitaire

1.1 Généralités

Le système immunitaire met en place divers mécanismes afin de contrôler les infections, les maladies auto-immunes, et les cancers. Le système immunitaire se divise en deux systèmes interconnectés, composés d'un bras inné et d'un bras adaptatif. L'ensemble des cellules composant le système immunitaire est issu d'un précurseur commun dérivé de la moelle osseuse et sont donc d'origine hématopoïétique. Ainsi, le système immunitaire inné agit immédiatement et induit une réponse immunitaire précoce suite à une infection entre autres, mais ne permet pas la génération de mémoire immunitaire. La génération de mémoire immunitaire se fait via le système immunitaire adaptatif qui met en place des réponses spécifiques pour un antigène donné permettant une protection sur le long terme lorsque l'organisme sera une nouvelle fois en contact avec ce même antigène.

La réponse immunitaire innée

L'épiderme représente la première barrière physique contre le développement d'une infection. En effet, il est constitué de cellules épithéliales organisées ensemble via des jonctions serrées, entre autres, et représente une barrière entre le milieu intérieur et le milieu extérieur contenant les microbes. Ainsi l'intégrité de l'épiderme est essentielle à la protection de l'organisme contre des pathogènes. Cependant, une altération de ces surfaces épithéliales à la suite d'une coupure, brûlure, etc. entraîne une perte d'intégrité du tissu conduisant à l'entrée d'un pathogène dans l'organisme. Ainsi pour contrôler le début d'une infection, les cellules de la réponse immunitaire innée agissent immédiatement. La réponse immunitaire innée est déclenchée suite à la reconnaissance de signaux de dangers (DAMP : *danger-associated molecular patterns*) provenant de cellules en apoptoses, mais également en réponse à la reconnaissance de motifs (MAMP : *microorganism-associated molecular patterns*) conservés chez les virus et les bactéries. Ces signaux vont être captés par des récepteurs qui vont reconnaître des motifs communs aux pathogènes (PRR : *pattern recognition receptors*), tels que les récepteurs de type *Toll* (TLR : *toll*

like receptor), les récepteurs de type *Nod* (NLR : *nod like receptor*), etc. La famille des TLR, initialement découverte chez la drosophile², est composée de 13 récepteurs différents dont 10 ont été retrouvés chez l'humain³. Ces récepteurs sont soit localisés à la surface de la cellule sur la membrane plasmique et permettent la reconnaissance de motifs communs aux bactéries (TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10) ou soit localisés dans la membrane des endosomes des cellules et reconnaissent des acides nucléiques (TLR3, 7, 8 et 9). La reconnaissance de ces motifs par les cellules immunitaires innées va entraîner le déclenchement de réponses antibactériennes et antivirales ainsi que l'activation du système immunitaire adaptatif. Le système immunitaire adaptatif se mettra ainsi en place pour enrayer l'infection causée par l'entrée d'un microorganisme.

Il est intéressant de noter que plusieurs études ont mis en évidence le rôle des horloges circadiennes dans l'expression de certains de ces TLR (TLR3, 5, 8 et 9), donnant une nouvelle dimension dans le contrôle de la réponse immunitaire via d'autres systèmes^{4, 5, 6}. En effet, l'expression de ces TLR varie selon le moment de la journée. Ces horloges circadiennes responsables des rythmes circadiens permettent à l'organisme d'anticiper tout changement de l'environnement dû au cycle jour/nuit.

La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative repose sur de nombreuses cellules d'origine hématopoïétique, comprenant les lymphocytes T et les lymphocytes B. Cette réponse est spécifique à un antigène donné via la reconnaissance d'un peptide antigénique présenté par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) au récepteur des cellules T (TCR : *T cell receptor*) ou via la reconnaissance de protéines par le récepteur des cellules B (BCR : *B cell receptor*). Dans le cadre de mon projet de recherche de doctorat, seule la réponse T est pertinente et sera décrite et discutée. Ainsi, suite à l'activation des lymphocytes T naïfs, ces cellules vont proliférer et se différencier en lymphocytes T effecteurs matures capables d'éliminer l'infection causée par un pathogène ou d'éliminer des cellules tumorales. Ensuite, une partie de ces lymphocytes T vont survivre et se différencier en lymphocytes T mémoires qui auront pour fonction d'intervenir plus rapidement lors d'une seconde infection par le même pathogène.

1.2 Les cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules appartenant à la famille des cellules présentatrices d'antigènes sont les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B^{7, 8, 9}.

L'efficacité des cellules présentatrices d'antigènes repose sur leur capacité à capter un antigène d'origine exogène via phagocytose, endocytose médiée par des récepteurs ou pinocytose, et également via l'expression à leur surface de différentes molécules et/ou récepteurs. En effet, les cellules présentatrices d'antigènes en plus d'exprimer les complexes CMH-I et CMH-II ainsi que des molécules de costimulation (CD80/CD86) pour activer les lymphocytes T, doivent exprimer des PRR, tels que les TLR et les NLR, mais également l'expression de RIG-1 (*retinoic acid inducible gene 1*). Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance de signaux de dangers¹⁰ permettant de contrôler très tôt le développement d'une infection en limitant l'invasion d'un microorganisme ou le développement d'une tumeur en éliminant les cellules anormales. Les cellules présentatrices d'antigènes doivent également sécréter des cytokines suite à leur activation pour activer et induire la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs¹¹.

Parmi les cellules présentatrices d'antigènes, seules les cellules dendritiques sont considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.

1.3 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles par rapport aux macrophages et aux lymphocytes B comme l'a démontré une étude mesurant l'activation et la prolifération des lymphocytes T lors d'expériences de réactions lymphocytaires mixtes (MLR : *mixed leukocyte reactions*)^{8, 9}. Ces études de MLR ont démontré que les cellules dendritiques n'avaient besoin que d'une faible quantité d'antigènes par rapport aux macrophages et aux lymphocytes B (100 fois moins environ) pour activer un lymphocyte T faisant de ces cellules des acteurs majeurs dans la présentation antigénique^{9, 12}. De plus l'élimination des cellules dendritiques via l'usage du modèle murin CD11c-DTR (DTR : *diphtheria toxin receptor*) a permis de démontrer que ces cellules sont nécessaires à l'activation des lymphocytes T CD8 dans un contexte à la fois d'infection virale¹³, d'infection bactérienne¹⁴ et d'infection parasitaire¹⁴.

Dans un contexte non infectieux, les cellules dendritiques considérées comme des sentinelles sont localisées dans la zone marginale et la zone T de la rate ou dans les tissus non lymphoïdes dans le but de capter des antigènes tissulaires et de recirculer dans le sang et le réseau lymphatique. Les cellules dendritiques s'activent en réponse aux signaux de dangers, les DAMP et les MAMP qu'elles vont percevoir via leur PRR (TLR, NLR, etc.) et vont ensuite devenir matures, entraînant différentes modifications de leur phénotype telles que¹⁵ :

- Une augmentation de l'expression des CMH-I et CMH-II à la membrane plasmique,
- Une diminution de la capture d'antigène,
- L'acidification de la voie endosomale permettant la dégradation des antigènes en peptides antigéniques,
- L'augmentation de l'expression de récepteurs aux chimiokines permettant la migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes secondaires où elles activeront les lymphocytes T.

Développement des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques décrites comme des cellules adhérentes par le *Dr Ralph Steinman* en 1973, sont les sentinelles de la réponse immunitaire^{16, 17}. Les cellules dendritiques jouent un rôle à la fois dans la réponse innée lors de la phagocytose d'antigène, mais également dans la réponse adaptative lors de la présentation antigénique aux lymphocytes T. Ces cellules se développent à partir d'une cellule souche hématopoïétique (HSC : *hematopoietic stem cell*) présente dans la moelle osseuse donnant ainsi une cellule progénitrice myéloïde (MDP) qui va ensuite se différencier en cellules progénitrice commune (CDP) ou en monocytes qui donneront des moDC, des monocytes ou des cellules de langerhans (LC). Les cellules CDP vont se différencier soit en cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ou soit en cellules pré-DC qui donneront les cellules dendritiques classiques de type 1 (cDC1) ou de type 2 (cDC2). Les LC se développent également via un précurseur d'origine embryonnaire¹⁸ (**Figure 1**). Une récente étude a également mis en évidence un lignage distinct du lignage myéloïde dans le développement des cellules pDC¹⁹.

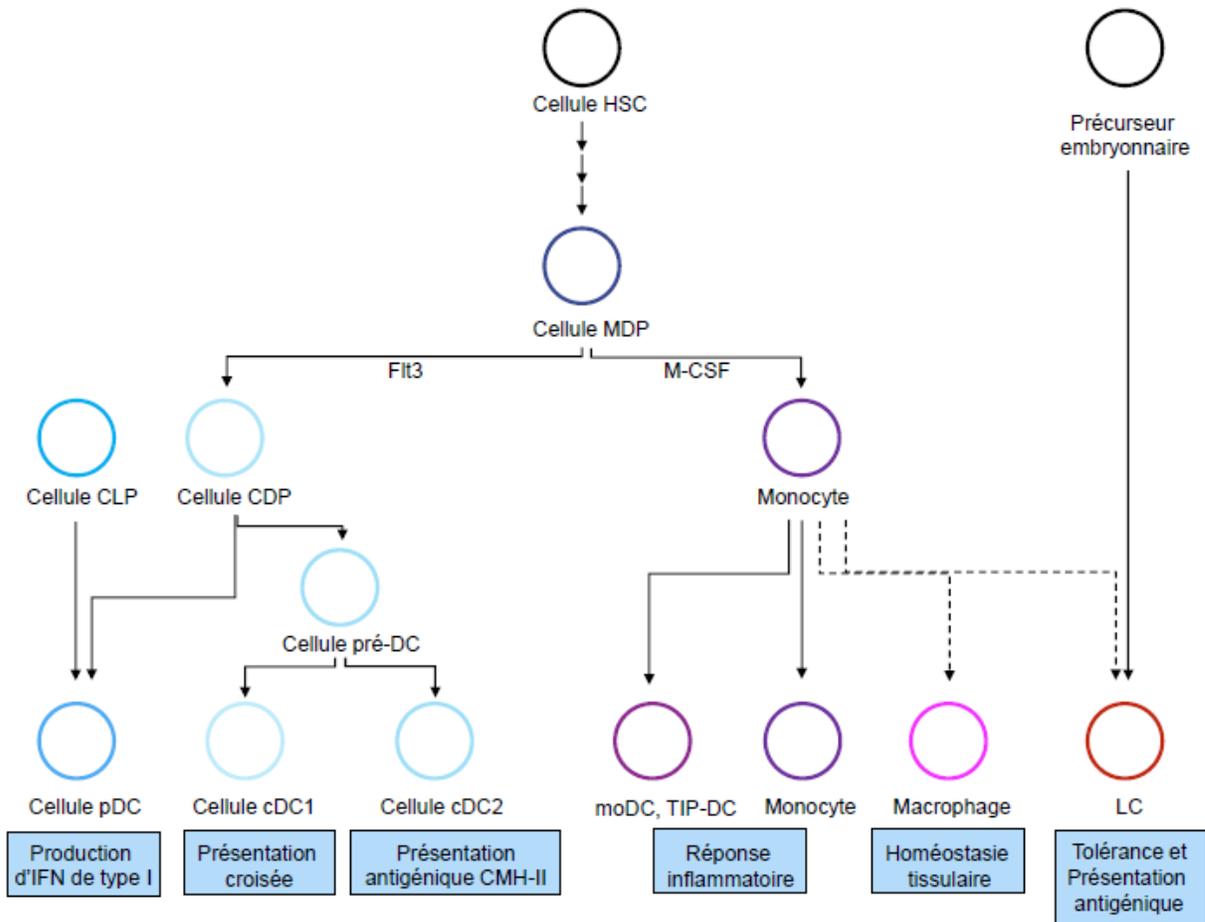


Figure 1. – Développement des cellules dendritiques

Représentation schématique du développement des cellules de la lignée myéloïdes basée sur la revue de Eisenbarth et *al.*¹⁸.

L'ensemble des choix de différenciation des cellules dendritiques répond à différents stimuli tels que les cytokines (Flt3L : *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*^{20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28}, CSF-1 : *Colony stimulating factor 1*^{29, 30, 31, 32, 33}, CSF-2 : *Colony stimulating factor 2*^{24, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47}, lymphotoxine β ^{48, 49, 50}, TGF- β 1 : *Transforming growth factor β 1*^{51, 52, 53, 54, 55}) présent dans le milieu environnant, mais également via l'action de certains facteurs de transcriptions (IRF4 : *Interferon regulator factor 4*⁵⁶, IRF8 : *Interferon regulatory factor 8*^{33, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65}, STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3*⁶⁶, STAT5 : *Signal transducer and activator of transcription 5*^{46, 65}, BATF3 : *Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3*^{64, 67, 68}, Zbtb46 : *Zinc finger and BTB domain containing 46*^{69, 70, 71}, E2-2^{72, 73},

Id2 : *Inhibitor of DNA binding* 2^{74, 75}, RelB⁷⁶, IKAROS⁷⁶, PU.1^{77, 78}, Notch RBP-J^{79, 80}) exprimés ou non par les cellules dendritiques.

Apprêtement et présentation antigénique

Les cellules dendritiques appréhendent puis présentent un antigène d'origine endogène ou exogène aux complexes TCR/CD3 des lymphocytes T. L'apprêtement puis la présentation antigénique se fait via les molécules de CMH-I ou de CMH-II. Chez l'humain, ces molécules sont nommées HLA-A, -B et -C (*human leukocyte antigen*) pour le CMH-I et HLA-DR, -DQ et -DP pour le CMH-II. Ce système est similaire chez la souris, avec les molécules H2-D, -K et -L pour le CMH-I et I-A, I-E pour le CMH-II. Les gènes codant les molécules de CMH sont les régions les plus polymorphes du génome datant de la divergence entre les humains et les chimpanzés⁸¹. De plus les partenaires moléculaires du CMH co-évoluent avec les gènes codant pour le CMH⁸².

L'apprêtement suivi de la présentation antigénique se met en place via différents processus en fonction du type d'infection, mais également en fonction de la nature du lymphocyte T que la cellule va activer (**Figures 2-3**). En effet, l'antigène présenté peut avoir plusieurs origines (endogène ou exogène)^{83, 84, 85}.

Apprêtement et présentation antigénique via la molécule de CMH-I : antigène d'origine endogène

La présentation antigénique via le CMH-I permet l'activation puis la différenciation des lymphocytes T CD8 naïfs en lymphocytes T CD8 effecteurs (**Figure 2a**)⁸³. Dans le cas d'une infection virale, le virus se réplique de manière intracellulaire. Les protéines virales vont être prises en charge par le protéasome 26S qui va entraîner la dégradation de la protéine virale en peptides antigéniques^{86, 87}. Les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ correspondent à la partie ayant une activité protéolytique active du protéasome 26S^{88, 89, 90}. Ainsi, chaque sous-unité va cliver les protéines après un certain type d'acides aminés, tel qu'un acide aminé acide pour la sous-unité $\beta 1$, un acide aminé basique pour la sous-unité $\beta 2$ et un acide aminé hydrophobe pour la sous-unité $\beta 5$. Dans le cas de certaines infections virales, l'IFN- γ induit des variants de ces sous-unités β , $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$ entraînant la formation de l'immunoprotéasome^{91, 92, 93}. Lorsque le peptide antigénique est généré,

celui-ci va transiter du cytosol vers la lumière du réticulum endoplasmique de manière ATP dépendante via un canal protéique formé des transporteurs TAP1 et TAP2⁹⁴. Chacune des sous unités des protéines TAP1/2 possède une partie centrale formée de 6 hélices alpha transmembranaires formant un canal dans la région N terminale où se trouve la fonction d'hydrolyse de l'ATP en ADP permettant le passage du peptide formé dans la lumière du réticulum endoplasmique⁹⁵. Le peptide antigénique sera ensuite lié au CMH-I qui migrera vers le Golgi puis vers la membrane plasmique de la cellule présentatrice d'antigène qui présentera à ce moment le complexe CMH-I – peptide antigénique aux TCR et corécepteur CD8 des lymphocytes T CD8.

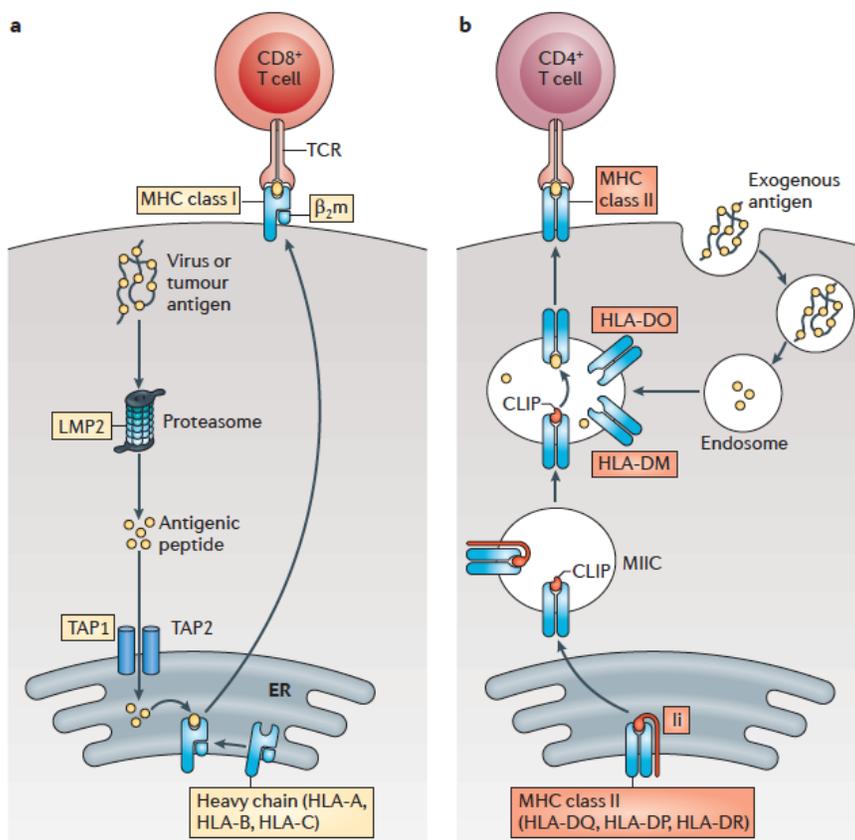


Figure 2. – Apprêtement et présentation antigénique via les molécules de CMH-I (a) ou de CMH-II (b)⁸³.

Apprêtement et présentation antigénique via la molécule de CMH-I : antigène d'origine exogène

Lorsque les cellules présentatrices d'antigène ne sont pas directement infectées, elles doivent mettre en place un mécanisme permettant la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD8 afin d'activer ces cellules naïves en cellules effectrices qui auront pour rôle de mettre en place des mécanismes permettant l'élimination des cellules infectées par le pathogène ou des cellules tumorales. Ce processus est appelé présentation croisée et a été décrit par le *Dr Michael Bevan* dès 1976⁹⁶.

La localisation cellulaire exacte où le processus de dégradation de l'antigène en peptides antigéniques est largement discutée depuis deux décennies⁸⁵. En effet, il existe la théorie de l'antigène d'origine cytosolique et la théorie de l'antigène d'origine vacuolaire (**Figure 3**)⁸⁵. Dans la première théorie, l'antigène est phagocyté puis exporté au cytosol où il sera pris en charge par le protéasome 26S, suivi du processus classique de présentation indiqué dans la section *Apprêtement et présentation antigénique via la molécule de CMH-I : antigène d'origine endogène (Figure 2a)*⁸³. La deuxième théorie émet l'hypothèse que l'antigène est dégradé en peptides antigéniques dans des phagosomes où il sera ensuite pris en charge et présenté via des molécules de CMH-I (**Figure 3**)⁸⁵. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle essentiel du protéasome 26S dans la présentation croisée d'antigènes aux lymphocytes T CD8, favorisant l'origine cytosolique de l'antigène. En effet, l'usage d'inhibiteurs du protéasome 26S diminue la capacité des cellules dendritiques à présenter un antigène d'origine exogène aux lymphocytes T CD8⁹⁷. De plus, Palmowski et *al.* en 2006 ont mis en évidence le rôle de l'immunoprotéasome dans la présentation croisée *in vivo*⁹⁸. Cependant Di Pucchio et *al.* en 2008, ont mis en évidence que la présentation croisée par des pDC se faisait dans les endosomes, sans transit de l'antigène vers le cytosol⁹⁹. Récemment Sengupta et *al.* ont découvert que la dégradation de l'antigène par le protéasome se faisait dans les vésicules endocytiques dans le cadre de la présentation croisée de l'antigène¹⁰⁰. Ces différentes études suggèrent que le mode de présentation de l'antigène suite à la phagocytose de celui-ci dépend de la nature de la cellule présentatrice d'antigène.

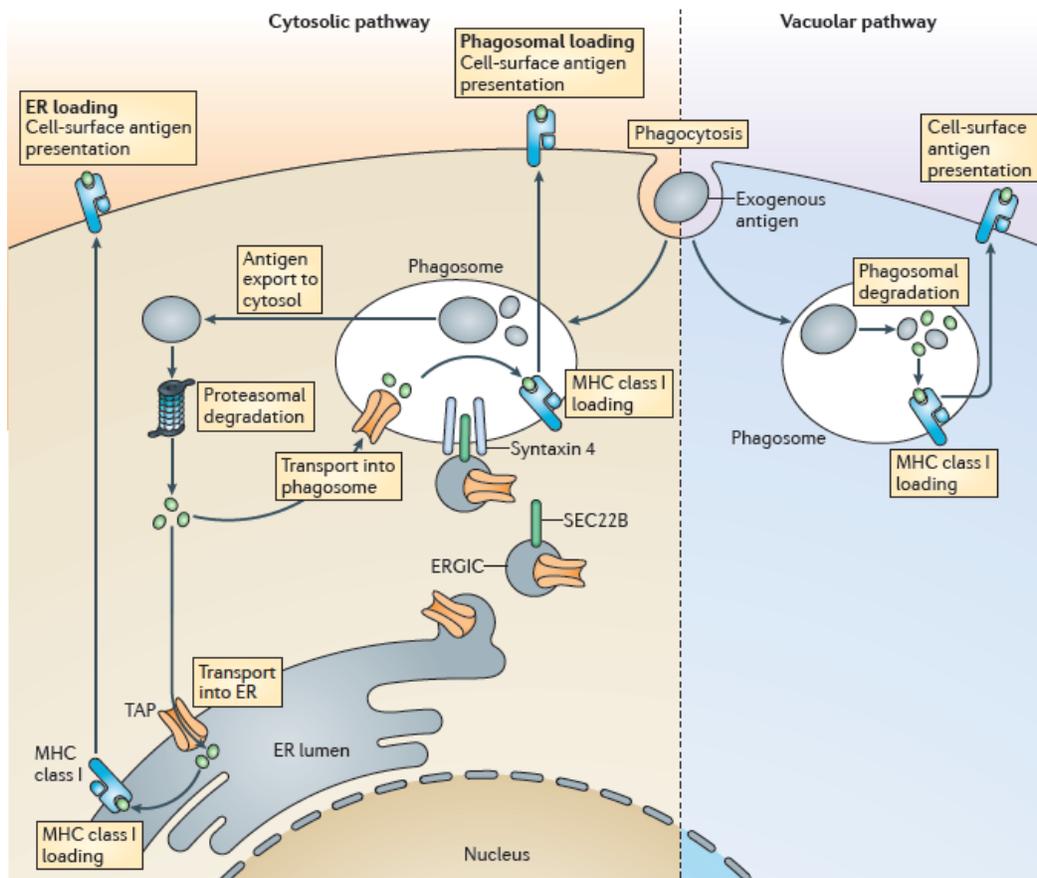


Figure 3. – Voie intracellulaire de la présentation croisée dans les cellules dendritiques. Théorie de l'antigène d'origine cytosolique (**gauche**) et théorie de l'antigène d'origine vacuolaire (**droite**)⁸⁵.

La nature de la cellule présentatrice d'antigène va définir sa capacité à faire de la présentation croisée. Ainsi les cDC1 ont une capacité élevée à faire de la présentation croisée contrairement aux cDC2^{101, 102}. Les LC sont quant à elles considérées comme des cellules n'ayant pas un rôle essentiel dans la présentation croisée d'antigène aux lymphocytes T CD8⁸⁵. Ainsi, la présentation croisée d'antigènes aux lymphocytes T CD8 représente une manière supplémentaire d'activer ces cellules dans le but de protéger l'organisme contre des infections de différentes natures.

Apprêtement et présentation antigénique via la molécule de CMH-II : antigène d'origine exogène

La présentation antigénique via le CMH-II permet l'activation puis la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocytes T CD4 auxiliaires (**Figure 2b**)⁸³. Seules les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes B) expriment les molécules de CMH-II. Des antigènes d'origines exogènes sont endocytés par des cellules présentatrices d'antigènes et dégradés par différentes protéases présentes dans la voie endocytique en peptides pouvant se lier aux molécules de CMH-II. Les complexes CMH-II – peptide antigénique formés vont ensuite migrer à la membrane plasmique où ils pourront être présentés aux complexes TCR/CD3 des lymphocytes T CD4⁸³.

Les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC)

Les BMDC générées *in vitro* représentent un des outils les plus utilisés pour l'analyse de la réponse des lymphocytes T que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Ainsi, il existe plusieurs cocktails cytokiniques permettant de différencier des progéniteurs myéloïdes présents dans la moelle osseuse en BMDC.

L'une des méthodes les plus utilisées pour générer des BMDC fait intervenir dans le milieu de culture du CSF-2 ainsi que de l'interleukine 4 (IL-4)³⁴. Ces cellules générées avec ce cocktail cytokinique sont très hétérogènes¹⁰³. En effet, nous allons retrouver deux types de cellules : dans la fraction adhérente, les cellules *GM-macro* et dans la fraction non adhérente, majoritairement des cellules *GM-DC* ainsi qu'une faible proportion de cellules *GM-macro* ayant un phénotype différent ainsi qu'une capacité d'activation des lymphocytes T CD8 différente. Ainsi les cellules *GM-macro* vont être CD11b^{hi} CMH-II^{lo} alors que les *GM-DC* vont être CD11b⁻ CMH-II^{hi}. Ces dernières vont également avoir un potentiel d'activation des lymphocytes T CD8 supérieur aux cellules *GM-macro*. Cependant, le phénotype de ces cellules dendritiques s'apparentera à des cellules dendritiques dérivées des monocytes et ayant un phénotype inflammatoire exprimant des molécules de costimulation, ainsi que des cytokines proinflammatoires telles que l'Interleukine 12 (IL-12), le TNF- α (*Tumor necrosis factor α*), mais également de l'interleukine 10 (IL-10) (antiinflammatoire) et de l'oxyde nitrique (NO) ainsi que la chimiokine CCL2 impliquée dans le recrutement des monocytes/macrophages à un site d'infection^{7, 104}.

Une autre méthode permettant la génération de BMDC est la culture de cellules de moelle osseuse avec du Flt3L impliqué dans la différenciation des cellules en cellules dendritiques^{20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28}. En effet, l'ajout de cette cytokine dans une culture de cellules de moelle osseuse permet de différencier les cellules en cDC et en pDC^{105, 106}. Ces cellules vont cependant avoir un phénotype différent par rapport aux cellules différenciées à partir de CSF-2 + IL-4. En effet, ces cellules vont sécréter de l'IL-12, mais très peu de TNF- α , d'IL-10 et de NO¹⁰⁴.

Dans le cadre de mon projet de recherche de doctorat, nous avons travaillé avec les BMDC différenciées à partir de CSF-2 + IL4 et nous avons collecté les cellules dites *GM-DC* peu adhérentes présentant une capacité d'activation des lymphocytes T CD8 supérieure aux BMDC adhérentes, dites *GM-Macro*¹⁰³.

Les cellules dendritiques et les thérapies vaccinales

Les cellules dendritiques par leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles sont considérées depuis des décennies comme un outil potentiel de vaccination dans le contrôle de la réponse immunitaire antitumorale ainsi que dans la réponse anti-infectieuse (bactérienne, virale et parasitaire). L'utilisation des cellules dendritiques dans le traitement d'infections de différentes natures (virale, bactérienne et parasitaire) ainsi que dans les traitements antitumoraux présente plusieurs avantages^{107, 108}. Ces cellules sont également les seules à être caractérisées comme des cellules présentatrices d'antigène professionnelles permettant donc une activation efficace des lymphocytes T. En effet, ces cellules ont la capacité de migrer dans la zone T des organes lymphoïdes afin de pouvoir activer les lymphocytes T et ainsi permettre une protection contre certaines infections^{107, 108}.

Les premières observations de souris traitées avec des cellules dendritiques chargées avec un antigène d'origine tumorale ont montré soit un ralentissement ou soit un retard de la croissance tumorale par rapport au groupe contrôle de souris non traitées^{109, 110, 111, 112, 113}. Cependant, bien qu'il soit essentiel de comprendre et de disséquer les mécanismes sous-jacents de la réponse immunitaire via l'usage de modèles murins, il est difficile de transposer ces résultats chez l'humain. Ainsi les thérapies vaccinales basées sur l'usage des cellules dendritiques restent un défi à mettre au point dans le traitement de cancers chez l'humain que différentes équipes de recherches ont

décidé de relever. Cependant, plusieurs questions se posent : la méthode de culture des cellules dendritiques (isolation de cellules dendritiques ou différenciation des cellules à partir de précurseurs), le type de cellules dendritiques (cDC, pDC, moDC, LC, BMDC), la méthode de maturation des cellules dendritiques, la technique de chargement des cellules dendritiques avec l'antigène tumoral (protéine native versus peptide antigénique), la route d'administration des cellules dendritiques, l'ajout d'adjuvant à la vaccination, etc.

Ainsi, les premières études chez l'humain dans le cadre de traitement de mélanome ont montré une efficacité des cellules dendritiques issues du sang périphérique dans l'induction de la réponse des lymphocytes T contre les cellules tumorales, mais faible par rapport aux attentes des expériences de MLR réalisées *in vitro* via l'usage de cellules dendritiques de la rate de souris^{8, 9, 11, 38}. Ces résultats pouvant être expliqués par l'utilisation des cellules dendritiques immatures. En effet, l'efficacité des cellules dendritiques dans l'activation des lymphocytes T repose sur leur capacité à présenter un antigène dans un premier temps, mais nécessite au préalable d'être activées via des signaux de dangers qui vont être reconnus par des PRR¹⁰. Ainsi l'activation des cellules dendritiques améliore le traitement que ce soit chez l'humain ou chez la souris^{114, 115, 116, 117, 118}. Cependant, d'autres études ont montré l'efficacité des cellules dendritiques dans l'activation des lymphocytes T contre d'autres types de tumeurs telles que les lymphomes diffus à grandes cellules B¹¹⁹, les myelomes¹²⁰, les carcinomes hépatiques^{121, 122, 123}, les glioblastomes¹²⁴, les leucémies myéloïdes aiguës¹²⁵. Plusieurs groupes de recherche se sont également penchés sur la question de la nature de l'antigène. En effet Takahashi et *al.* ont utilisé un peptide antigénique restreint au CMH-I¹²⁶, et Rosalia et *al.* ont chargé leurs cellules dendritiques avec un peptide synthétique long¹²⁷ alors que Binder et *al.* ont quant à eux donné la protéine native¹²⁸ et Palucka et *al.* ont utilisé des lysats de cellules tumorales comme source d'antigène¹²⁹ aux cellules dendritiques qui ont réalisé ainsi les processus d'apprêtement suivi de la présentation antigénique. Ces différentes études ont montré un effet favorable de la vaccination dans le pronostic vital de certains patients traités, cependant l'efficacité de ce type de traitement reste moindre par rapport aux essais cliniques utilisant des molécules bloquantes ciblant CTLA-4, PD-1 et PD-L1 exprimées à la surface des cellules tumorales et connues pour anergiser les lymphocytes T CD8^{130, 131, 132, 133, 134}. Ainsi il existe plusieurs essais cliniques combinant ces deux traitements afin de contrôler le développement de tumeurs afin de les éliminer^{135, 136, 137, 138}. D'autres chercheurs se sont intéressés au mode de la vaccination avec les cellules dendritiques. Ainsi Mitchell et *al.* ont publié une étude portant sur le

rôle de la combinaison de plusieurs types d'antigènes (antigène tumoral combiné avec un antigène d'origine bactérienne : toxine tétanique) mis en culture lors du chargement des cellules dendritiques dans la migration des cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques vers la zone T¹²⁴. En présence de l'antigène de la toxine bactérienne, une augmentation de la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques associée à une augmentation de la survie des patients a été observée.

D'autres études ont également mis en avant le rôle des thérapies vaccinales utilisant des cellules dendritiques contre certaines infections d'origine virale: le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), le virus de l'immunodéficience humaine (HIV)¹²⁶, le virus herpès simplex (HSV)¹³⁹, d'origine bactérienne : *Borrelia burgdorferi*, ou d'origine parasitaire : *Leishmania*¹⁰⁸ . En effet, l'ensemble de ces études a mis en avant le rôle des cellules dendritiques dans l'induction de la réponse des lymphocytes T et dans le contrôle des infections.

1.4 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative et sont caractérisés par l'expression à leur surface cellulaire d'un récepteur nommé TCR. Celui-ci est composé d'une chaîne gamma et d'une chaîne delta pour les lymphocytes T $\gamma\delta$ ou d'une chaîne alpha et d'une chaîne bêta pour les lymphocytes T $\alpha\beta$. Ces deux populations de lymphocytes T se développent dans le thymus à des stades différents (embryonnaire pour les lymphocytes T $\gamma\delta$ et tout au long de la vie pour les lymphocytes T $\alpha\beta$). Dans le cadre de cette thèse de doctorat, nous nous intéressons à la deuxième population de lymphocytes T, les lymphocytes T $\alpha\beta$ et plus particulièrement les lymphocytes T CD8.

Développement des lymphocytes T

Les lymphocytes T se développent dans le thymus à partir d'un précurseur lymphoïde commun issu de la moelle osseuse¹⁴⁰. Le développement de ces cellules se fait par deux processus successifs de sélection. La sélection positive dans un premier temps, afin de sélectionner les cellules capables de reconnaître un complexe CMH-peptide, suivi de la sélection négative

permettant d'éliminer les lymphocytes T reconnaissant les peptides du soi présentés par les CMH et donc l'élimination de lymphocytes T autoréactifs responsables de maladies auto-immunes.

Les premiers stades de développement se réalisent dans le cortex thymique où les thymocytes doubles négatifs (DN) réarrangent progressivement la chaîne β du TCR. Ces cellules deviennent des thymocytes doubles positifs (DP) et co-expriment les corécepteurs CD4 et CD8. Ainsi lors de ce stade de développement en cellules DP, les thymocytes vont réarranger la chaîne α du TCR formant ainsi un complexe TCR $\alpha\beta$ fonctionnel. Les cellules stromales du cortex thymique, les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC), expriment à leur surface des molécules de CMH-I/II présentant des peptides du soi qui peuvent interagir avec les TCR exprimés par les thymocytes DP. L'absence d'interaction, ou une interaction de faible affinité entraîne la mort par négligence des thymocytes DP. Cependant, une interaction d'affinité suffisante permet la sélection positive et donc la survie des thymocytes immatures¹⁴¹. Cette étape de sélection positive permet de tester la fonctionnalité du TCR $\alpha\beta$ réarrangé. La sélection positive permet également le choix de lignage des thymocytes DP vers un lignage T CD4 simple positif (SP) si le TCR interagit avec un complexe CMH-II-peptide ou vers un lignage T CD8 SP si le TCR interagit avec un complexe CMH-I-peptide. Les thymocytes SP migrent alors vers la médulla thymique composée de cellules dendritiques thymiques (tDC) et de cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) où ils subiront une étape de sélection négative essentielle à l'induction de la tolérance au soi^{142 143}. Ainsi les mTEC et les tDC présentant des antigènes du soi et notamment des antigènes du « soi » périphériques qui induiront la délétion, l'anergie ou la différenciation des thymocytes en cellules T régulatrices. Une fois développés et ayant un TCR $\alpha\beta$ réarrangé et fonctionnel, les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 gagneront la périphérie via la circulation sanguine et la circulation lymphatique pour circuler entre les différents organes lymphoïdes secondaires jusqu'à ce qu'une cellule présentatrice d'antigène présente un peptide antigénique via une molécule de CMH-I ou CMH-II aux lymphocytes T CD8 ou T CD4, respectivement.

Phase d'activation des lymphocytes T

Les lymphocytes T naïfs transitent entre les différents organes lymphoïdes secondaires via la circulation sanguine et la circulation lymphatique. Ainsi, lorsqu'une cellule présentatrice

d'antigène sera activée et présentera un antigène, celle-ci migrera dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires dans le but d'activer un lymphocyte T. Afin d'être activé un lymphocyte T naïf a besoin de recevoir 3 signaux :

- Une stimulation de son TCR via un complexe CMH – peptide antigénique présenté par une cellule présentatrice d'antigène,
- Une interaction avec la cellule présentatrice d'antigène via des molécules de costimulation,
- Un signal via des médiateurs solubles tels que l'IL12, l'IL2 et les IFN de type I.

La reconnaissance antigénique

La reconnaissance antigénique par le TCR des lymphocytes T est essentielle à l'activation de ces cellules¹⁴⁴. Cette reconnaissance se fait via le TCR qui est composé de deux chaînes, le TCR α et le TCR β reliés par des ponts disulfures. Le TCR possède un domaine dit constant, un domaine variable contenant les régions hypervariables (CDR 1 à 3, *complementarity determining regions*) permettant la reconnaissance de l'antigène, et également un domaine hydrophobe permettant au TCR de s'ancrer dans la membrane plasmique du lymphocyte T. Les CDR1 et CDR2 permettent au TCR d'établir une interaction avec la molécule de CMH alors que le CDR3, région la plus polymorphe parmi les CDR permet la reconnaissance du peptide antigénique. Le TCR forme un complexe avec un homodimère de CD3 ξ et les chaînes CD3 γ , CD3 ϵ et CD3 δ possédant des motifs ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) qui vont permettre de transduire le signal suite à une stimulation antigénique du TCR. Cependant, pour assurer leur survie, les lymphocytes T reçoivent en continu des signaux toniques provenant des cellules présentatrices d'antigènes (CMH-peptide du soi) en périphérie en combinaison de signaux reçus via le récepteur pour l'interleukine 7 (IL-7)^{145, 146}. La kinase de la famille des src sont les premières molécules à être activées suite à l'engagement du TCR^{147, 148} et sont essentielles et requises dans la formation du signal tonique pour la survie des lymphocytes T¹⁴⁹. Ainsi, la kinase LCK est constitutivement active dans les lymphocytes T naïfs et phosphoryle à des niveaux basaux les chaînes zêta associées au TCR¹⁵⁰. Cependant cette phosphorylation basale n'est pas suffisante pour activer les lymphocytes T, ce qui permet d'éviter que celui-ci soit activé et réponde contre des antigènes du soi.

La signalisation du TCR

Suite à l'engagement du TCR, la kinase Lck déjà liée au domaine cytoplasmique du corécepteur CD4 ou CD8 du lymphocyte T CD4 ou T CD8 respectivement va phosphoryler les motifs ITAM des chaînes gamma, delta et zêta du complexe TCR-CD3^{151, 152} (**Figure 4**). LCK va également phosphoryler la kinase ZAP70 qui va changer de conformation permettant de promouvoir son activité de kinase en ciblant différentes molécules, dont l'adaptateur LAT¹⁵³. Suite à la phosphorylation des tyrosines de l'adaptateur LAT, celui-ci va recruter plusieurs molécules qui vont avoir des rôles bien définis tel que l'adhésion cellulaire due à une augmentation de l'expression des molécules d'intégrines, l'expression de facteurs de transcription ayant un rôle dans l'activation, l'expansion clonale et la prolifération des lymphocytes T. Ainsi, le complexe LAT phosphorylé va interagir via son domaine SH2 avec la phospholipase C γ (PLC γ) entraînant l'hydrolyse du phosphatidylinositol(4,5)biphosphate (PtdIns(4,5)P2) (PIP2) en l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'IP3 va avoir une action dans la libération du calcium par le réticulum endoplasmique permettant d'activer la fonction phosphatase de la calcineurine en déphosphorylant le facteur de transcription NFAT alors que le DAG va agir sur l'activation de la protéine kinase C (PKC) ainsi que sur la voie Ras permettant la transcription de facteurs clés dans l'activation, la prolifération, et la différenciation des lymphocytes T. La protéine kinase FYN appartenant également à la famille des src va catalyser la formation de PIP3 à partir de PIP2 permettant l'activation de la kinase PDK1 qui phosphorylera la protéine AKT, facteur clé de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTORc essentiels à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. L'ensemble de ces voies de signalisation va entraîner l'activation de divers facteurs de transcription, tels que NF- κ B, NFAT, AP-1 permettant l'activation, l'expansion clonale, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T^{154,155, 156, 157, 158}. Cela permettra *in fine*, d'augmenter le nombre de précurseurs T spécifiques pour l'antigène présenté. En effet, le nombre de précurseurs de lymphocytes T CD8 spécifiques pour un antigène donné est relativement faible et peut varier de moins de 100 à quelques milliers de cellules en fonction du TCR considéré^{159, 160, 161}. Ainsi il est essentiel suite à l'activation des lymphocytes T CD8 par une cellule présentatrice d'antigènes d'entamer un programme transcriptionnel permettant de mettre en place une phase d'expansion clonale afin d'augmenter le nombre de lymphocytes T spécifiques pour l'antigène rencontré et de combattre l'infection.

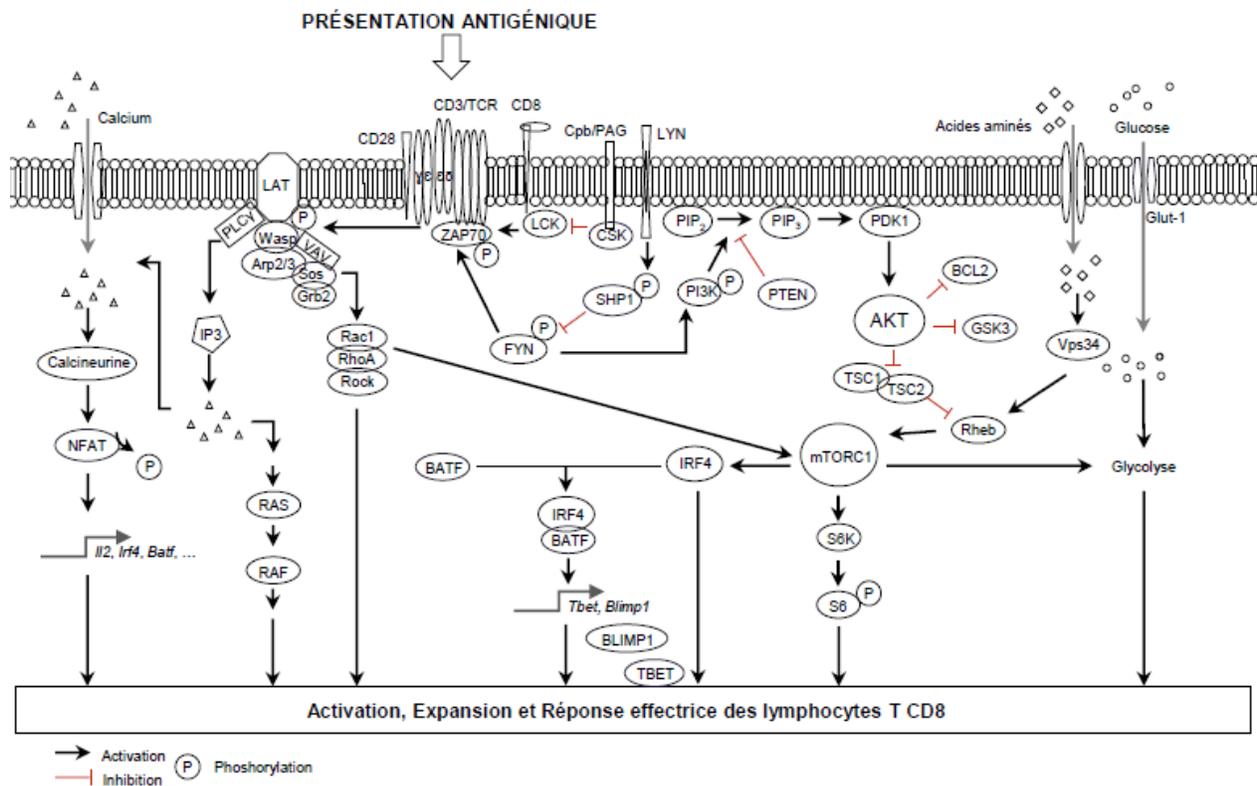


Figure 4. – La signalisation du TCR suite à une stimulation antigénique

La transduction du TCR

Pour qu'un lymphocyte T soit activé de manière optimale celui-ci doit avoir de nombreux TCR qui devront être engagés avec des complexes CMH-peptide^{154, 162}. Suite à l'engagement du TCR, la transduction du signal se fera via l'induction de différentes voies de signalisation. Au fil des décennies, plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer ce processus :

- Modèle de changement de conformation du TCR :

Plusieurs études ont mis de l'avant un changement de la conformation du complexe TCR/CD3 suite à une ligation de celui-ci avec un complexe CMH-peptide antigénique^{163, 164, 165, 166, 167}. Ainsi, Kjer Nielsen et *al.* entre autres, ont montré des changements de conformation au niveau des régions hypervariables d'un TCR donné pour un complexe CMH-peptide antigénique, plus particulièrement les CDR1 et CDR2 impliquées dans la reconnaissance du complexe CMH-peptide antigénique¹⁶³. Ces résultats suggèrent que l'immunodominance du TCR est associée à des propriétés structurales conférant une spécificité au récepteur pour son ligand et suggèrent un nouveau lien dans la transduction du signal suite à la reconnaissance de l'antigène par le TCR.

- *Modèle d'oligomérisation des récepteurs :*

Plusieurs groupes de recherche ont émis l'hypothèse de l'oligomérisation des récepteurs et corécepteurs dans le processus de reconnaissance antigénique. Ainsi, Delon *et al.* ont publié une étude démontrant que l'expression du corécepteur CD8 est nécessaire pour l'activation du lymphocyte T CD8 en réponse à une stimulation¹⁶⁸. La même année, Boniface *et al.* ont démontré que l'engagement de plusieurs TCR via une stimulation antigénique avec des trimères ou des tétramères CMH-peptide antigénique permettait une meilleure activation des lymphocytes T¹⁶⁹. Krogsgaard *et al.* ont mis en évidence via l'usage de dimères de complexe CMH-peptide antigénique, l'amplification de l'activation et la sensibilité de la reconnaissance de l'antigène¹⁶⁴.

- *Modèle de sensibilité et de sélectivité du TCR : (« Kinetic proof reading ») :*

Ce modèle propose qu'il existerait une notion de seuil. En effet, en dessous du seuil de stimulation du TCR, le recrutement d'intermédiaires pour l'activation des lymphocytes T serait moindre. Kersh *et al.* ont ainsi publié une étude qui met en évidence l'importance de la cinétique de la transduction du signal TCR dans l'efficacité de l'activation de cette cellule¹⁷⁰. En effet, en utilisant des ligands d'affinités identiques, mais ayant des demi-vies différentes, ils ont démontré via l'observation de la phosphorylation des motifs ITAM de la molécule CD3 qu'une interaction de plus longue durée permettait une meilleure activation du lymphocyte T. De plus, l'étude publiée par Kalergis *et al.* permet d'étayer cette théorie puisqu'ils ont montré que l'efficacité de l'activation d'un lymphocyte T requiert un temps optimal d'interaction avec un complexe CMH-peptide antigénique¹⁷¹.

- *Modèle de sensibilité et de sélectivité du TCR : Engagement du TCR en série*

Ce modèle de reconnaissance antigénique, décrit par Valitutti *et al.*, a mis en évidence qu'un petit nombre de complexes CMH-peptide antigénique pouvait interagir avec un grand nombre de TCR via un engagement en série de ce complexe sur les TCR à la surface d'un lymphocyte T^{172, 173}. De plus, Hudrisier *et al.* ont démontré que la réponse des lymphocytes T CD8 est corrélée avec une augmentation du taux de dissociation du TCR avec son complexe CMH-peptide antigénique qui lui est spécifique et non en fonction de l'avidité de ce complexe pour le TCR¹⁷⁴. En effet, ils ont mis en évidence une abolition de la mobilisation du calcium intracellulaire requis pour l'activation des lymphocytes T lorsque le TCR est engagé de manière permanente avec un complexe CMH-peptide antigénique¹⁷⁴. Une troisième étude publiée par le groupe de recherche du

Dr Ronald Germain, a démontré que le comportement pharmacologique d'un ligand du TCR est contrôlé par le taux de dissociation de celui-ci au TCR ainsi que par le recrutement de corécepteurs (le corécepteur CD4, dans l'activation des lymphocytes T CD4 dans cette étude) dans l'efficacité de l'activation d'un lymphocyte T CD4¹⁷⁵.

La formation de la synapse immunologique

Suite à la reconnaissance antigénique puis à la transduction du signal TCR, le cytosquelette du lymphocyte T va se réorganiser et permettre de mettre en place la synapse immunologique. Ceci permet d'amplifier le signal de stimulation et d'amplifier l'interaction entre la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T^{176, 177, 178, 179}. En effet, la synapse immunologique entraîne un regroupement rapide des TCR conduisant à une augmentation de la transduction du signal et donc à l'activation du lymphocyte T^{180, 181, 182, 183}. La synapse immunologique est composée de trois parties nommées SMAC (*region of supramolecular activation complex*) contenant des molécules positionnées de manière stratégique pour l'activation du lymphocyte T :

- cSMAC (région centrale) comprend le TCR, les corécepteurs CD4 ou CD8, la molécule de costimulation CD28 et les protéines accessoires LAT et PKC^{184, 185, 186}. Ces protéines sont essentielles à la reconnaissance de l'antigène, à la transduction du signal TCR et donc à l'activation du lymphocyte T.
- pSMAC (région proximale) comprend les molécules d'adhésions permettant l'interaction avec des molécules adhésives exprimées par les cellules présentatrices d'antigène permettant d'augmenter le temps d'interaction entre ces cellules pour une activation totale du lymphocyte T^{186, 187}.
- dSMAC (région distale) comprend les molécules CD93, CD44 et CD45. Cette dernière se retrouve en position distale en vue de diminuer son activité inhibitrice dans la transduction du signal TCR suite à une stimulation antigénique¹⁸⁸.

Les molécules de costimulations

Ces molécules représentent le deuxième signal dans l'activation d'un lymphocyte T. En effet, en absence de ces signaux le lymphocyte T va être anergisé et sera donc incapable d'être activé^{189, 190, 191}. Lorsque les cellules présentatrices d'antigène sont activées via leurs PRR, une augmentation de l'expression des molécules de costimulation va être observée. Ainsi, l'interaction entre les molécules exprimées par les cellules présentatrices d'antigène et celles exprimées par les lymphocytes T va entraîner une communication entre les cellules permettant un renforcement de la signalisation du TCR. En effet, cela va se traduire par une induction de voies de signalisation impliquées dans l'activation des lymphocytes T telle que la voie PI3K/AKT/mTOR. Il existe deux familles de molécules de costimulation, la famille des immunoglobulines de type CD28 et la super famille des récepteurs au TNF :

- Les Immunoglobulines de type CD28 :

Les molécules de CD28 retrouvées dans le cSMAC de la synapse immunologique sont exprimées de manière constitutive à la surface des lymphocytes T. CD80/CD86 sont les ligands de CD28 et sont exprimés par les cellules présentatrices d'antigène. L'interaction entre les molécules de costimulation permet l'activation, la prolifération ainsi que la survie des lymphocytes T CD8 activés. En effet, cela va entraîner le recrutement de la protéine PKC θ ^{192, 193} et de la protéine PI3K^{194, 195} dans le cSMAC de la synapse immunologique via son domaine YMNM entraînant une activation de nombreuses voies de signalisations impliquées dans l'activation du lymphocyte T (NFAT, AP1, NF- κ B, AKT/mTOR, glycolyse, JNK, MAPK). L'absence d'interaction entre CD80/CD86 et CD28 en présence d'une interaction avec un complexe CMH-I-peptide antigénique avec le TCR, va entraîner l'anergie du lymphocyte T^{196, 197, 198, 199, 200, 201}. En effet, premièrement cette interaction permet l'inhibition de l'expression de FASL inhibant ainsi la cascade de signalisation de l'apoptose induite par les caspases 8 et 10¹⁹⁷ et deuxièmement favorise l'expression des facteurs anti-apoptotiques BCL2 et BCL-XL²⁰². De plus, en absence d'expression de CD28, les lymphocytes T CD8 ne peuvent pas s'activer et vont être anergisés^{189, 190, 191, 203, 204}.

- Les récepteurs de la superfamille des TNF :

Les différentes molécules de costimulations de cette famille sont : OX40, CD27, GITR, 4-1BB, CD40 et CD30. L'interaction avec leur ligand respectif entraîne le recrutement de protéines adaptatrice TRAF (*TNF receptor associated factor*)^{205, 206} et permet d'induire la prolifération,

l'activité cytolytique des lymphocytes T CD8 ainsi que leur survie via l'induction de voies de signalisations similaires (NFAT, AP-1, NF- κ B, etc)^{207, 208, 209, 210}.

Les facteurs solubles, les cytokines

Les cytokines proinflammatoires représentent le troisième signal requis pour la prolifération et l'expansion clonale des lymphocytes T de manière optimale. Parmi ces cytokines, nous retrouvons :

- L'interleukine 12 :

Ces cytokines sont produites par les cellules dendritiques et les macrophages et entraînent la prolifération, l'expansion clonale et la survie des lymphocytes T CD8^{211, 212, 213}. L'interaction de l'IL-12 sur son récepteur va induire son signal et entraîner la transcription du facteur de transcription STAT4 permettant d'augmenter la capacité de transmission du signal de présentation antigénique au TCR^{214, 215}. Cette cytokine a plusieurs actions dans l'activation des lymphocytes T CD8. En effet, elle induit l'expression des facteurs chimioattractants : CCL1 et CCL17 qui vont permettre une augmentation de l'interaction entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène entraînant une activation optimale de la cellule²¹⁶. Elle induit également la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR^{217, 218, 219} qui va induire la phosphorylation de la protéine FOXO1 et entraîner sa dégradation par le protéasome^{219, 220} permettant ainsi l'induction de l'expression de facteurs impliqués dans la différenciation des lymphocytes T CD8 en lymphocytes T effecteurs de courte durée de vie (SLEC : *Short life effector cells*)^{217, 218, 219}. Suite à l'activation des lymphocytes T CD8, ces cellules vont se différencier en SLEC ou en précurseur de lymphocytes T mémoires (MPEC : *Memory precursor effector cells*), dont l'importance sera discutée plus bas.

- Les interférons de type I :

Les IFN de type I (IFN α et IFN β) interagissent avec leurs récepteurs IFNAR-I et IFNAR-II²²¹ qui entraînera une phosphorylation des facteurs de transcription STAT1 et STAT2 recrutées par les protéines adaptatrices JAK1 et JAK2. Ces facteurs de transcription vont dimériser et migrer vers le noyau où ils activeront la transcription de gènes cibles impliqués dans la l'activation des lymphocytes T CD8. Ces cytokines sont essentielles à la génération de lymphocytes T CD8 effecteurs puisqu'en absence des récepteurs pour ces cytokines, la génération de lymphocytes T

CD8 effecteurs est diminuée lors d'une infection avec le virus LCMV^{222, 223}. De plus des expériences *in vitro* ont démontré une meilleure activation des lymphocytes T CD8 si ces cellules sont pré-traitées avec de l'IFN de type I avant d'être stimulées²²⁴. Ces observations permettent de conclure un rôle important de ces cytokines dans l'activation des lymphocytes T CD8.

- *L'interleukine 2 :*

L'IL-2 est produite par les cellules présentatrices d'antigène ainsi que par les lymphocytes T. Suite à l'engagement du TCR, l'expression de CD25 (chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2) va être augmentée à la surface des lymphocytes T permettant l'induction de voies de signalisation impliquées dans l'activation des lymphocytes T et ceci à des temps précoces. Le maintien de l'expression de CD25 va se faire via des signaux induits par l'IL-2 entre autres et permettre l'expansion clonale, la prolifération et la survie des lymphocytes T CD8 en modulant l'expression de manière positive du facteur anti-apoptotique BCL2^{223, 225, 226, 227, 228, 229, 230}. L'IL-2 module également l'expression des facteurs de transcription BLIMP1 et TBET impliqué dans la différenciation des lymphocytes T CD8 en SLEC^{227, 231}.

L'aide des lymphocytes T CD4

Depuis des décennies, plusieurs groupes de recherche ont mis en évidence l'importance de la contribution des lymphocytes T CD4 dans la réponse des lymphocytes T CD8^{230, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238}. En effet, les lymphocytes T CD4 doivent être activés pour participer à l'activation optimale des lymphocytes T CD8. Ainsi ces lymphocytes T CD4 vont avoir des répercussions sur le long terme dans la capacité de prolifération et de survie des lymphocytes T CD8 lors d'une réexposition à un antigène. Celles-ci seront moindres en absence de l'aide CD4 lors de la primo infection^{238, 239, 240, 241, 242, 243, 244}.

L'aide CD4 agit également via la maturation des cellules présentatrices d'antigène en engageant la molécule CD40L qui va interagir avec le CD40 exprimé par les cellules présentatrices d'antigène^{230, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238}. Cette interaction va entraîner une augmentation de l'expression des molécules de costimulation ainsi qu'une augmentation de la présentation antigénique aux lymphocytes T CD8. De plus, une fois maturées par les lymphocytes T CD4, les cellules dendritiques vont sécréter les facteurs chimioattractants CCL3 et CCL4 permettant le

recrutement des lymphocytes T CD8 via l'expression de récepteur CCR5 dans les ganglions lymphatiques drainants, augmentant ainsi les chances d'interaction entre les deux cellules et ainsi l'activation des lymphocytes T CD8²⁴⁵.

Phase de différenciation des lymphocytes T CD8 : propriétés et phénotypes cellulaires des lymphocytes T effecteurs

Suite à l'engagement du TCR lors de l'activation des lymphocytes T, les lymphocytes T naïfs vont se différencier et devenir des lymphocytes T effecteurs avec une signature génique particulière^{246, 247}. Ainsi une diminution des molécules telles que CD62L et la molécule anti apoptotique BCL2 et à l'opposé une augmentation des molécules telles que CD43 et CD44 ont été observées dans un contexte d'infection avec le virus LCMV¹⁸⁶. Ces molécules ne sont pas les seules à varier puisque ces études ont mis en évidence des modifications de plusieurs milliers de gènes entre un lymphocyte T naïf et un lymphocyte T effecteur leur conférant une signature génique particulière^{246, 247}. Ce changement de programme transcriptionnel induit des modifications au niveau :

- De la prolifération des lymphocytes T²⁴⁸,
- De la migration des lymphocytes T effecteurs via l'induction de l'expression de S1P1R (*sphingosine 1 phosphate receptor*) et du récepteur aux chimiokines CXCR3, mais également via la répression de l'expression de CD62L et du récepteur aux chimiokines CCR7, permettant ainsi la sortie des lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires vers le site d'infection^{249, 250},
- L'acquisition des fonctions effectrices : sécrétion de cytokines (IL-2 et IFN γ) et de facteurs cytolytiques (GRANZYME B et PERFORINE) permettant de cibler et d'éliminer les cellules infectées^{250, 251, 252}.

Ces changements se font tout au long de l'activation des lymphocytes T. Ainsi lors du pic de la réponse des lymphocytes T CD8, il existe quatre populations de lymphocytes T effecteurs distinctes basées sur l'expression des molécules CD127 et KLRG1 (*Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*) :

- Les cellules exprimant fortement la molécule KLRG1 et faiblement CD127, les cellules SLEC (*Short live effector cells*),
- Les cellules exprimant fortement la molécule CD127 et faiblement KLRG1, les cellules MPEC (*Memory precursor effector cells*),
- Les cellules doubles négatives nommées EEC (*Early effector cells*). Ces cellules correspondent à des lymphocytes T nouvellement activés puisque ces cellules peuvent se différencier en cellules SLEC ou MPEC^{246, 253},
- Les cellules doubles positives pour les deux marqueurs. Ces cellules sont très peu discutées dans la littérature et n'ont pas encore de rôle bien défini dans la réponse T CD8.

Ainsi les cellules SLEC sont terminalement différenciées ce qui n'est pas le cas des cellules MPEC qui donneront des lymphocytes T mémoires. En effet, suite à une infection avec le virus LCMV, 8 jours post vaccination le transfert de cellules SLEC vers une souris infectée avec la souche bactérienne *Lm-GP33* (*Listeria monocytogenes* exprimant le peptide de la glycoprotéine du virus LCMV)²⁵⁴ ne donnera pas lieu à la différenciation en cellules mémoires. À l'opposé les cellules MPEC se différencieront en cellules mémoires²⁵⁴.

Ces choix de différenciation sont dictés par divers facteurs, tels que l'expression de facteurs de transcription, mais également l'adaptation métabolique des lymphocytes T.

Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des lymphocytes T CD8

De nombreux facteurs de transcription interviennent dans la différenciation des lymphocytes T CD8 naïfs en lymphocytes T CD8 effecteurs. Chaque facteur de transcription décrit dans la littérature a son propre rôle dans ce processus, mais travaille également de concert avec d'autres facteurs de transcription pour contrôler ce processus.

- TBET, EOMES, RUNX3 :

Il est connu depuis des décennies que les deux facteurs de transcription TBET et EOMES ont des fonctions similaires dans l'induction de gènes cibles pour l'activation et la survie des lymphocytes T CD8, mais cependant ont des rôles différents dans le choix de lignage de ces cellules en cellules SLEC ou en lymphocytes T CD8 mémoires. Ainsi, une forte expression de TBET et

une faible expression d'EOMES sera observée dans les cellules SLEC et à l'opposé une faible expression de TBET et une forte expression d'EOMES sera observée dans les cellules MPEC^{255, 256, 257, 258}. De plus, des souris déficientes pour le gène *Tbet* présenteront une inhibition de la génération des cellules SLEC lors d'une infection²⁵⁵. Autre que le choix de lignage SLEC/MPEC, l'expression de *Tbet* est rapidement induite dans les lymphocytes T CD8 et agit positivement sur l'expression de gènes cibles responsable des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8: *Ifnγ* et *Granzyme B*^{259, 260}. En effet, l'expression de ces gènes cibles est contrôlée via une collaboration entre les deux facteurs de transcription TBET et RUNX3²⁶¹. RUNX3 joue également un rôle dans le contrôle de l'expression d'*Eomes* et donc dans le contrôle de l'expression de la *Perforine* ainsi que dans le maintien de l'expression de l'*Ifng*²⁶².

- BLIMP1 et BCL6 :

Ces deux facteurs de transcription ont des actions opposées et s'antagonisent l'un l'autre. En effet, BLIMP1 inhibe l'expression de BCL6 en se liant à son promoteur favorisant ainsi le lignage en cellules SLEC^{263, 264, 265, 266}. En effet, BLIMP1 est impliqué dans la répression de gènes nécessaire à la différenciation des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T mémoires²⁶⁷. De plus des souris déficientes pour le gène *Blimp1* ne gèrent pas de cellules SLEC lors d'un contexte infectieux^{231, 267, 268, 269}. Il est également connu que le facteur de transcription BCL6 est impliqué dans la différenciation des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T mémoires^{264, 270}. Ainsi, le lignage SLEC/MPEC repose entre autres sur la balance d'expression de ces deux facteurs de transcription, BLIMP1 et BCL6.

- ID2 et ID3 :

L'expression de ces facteurs de transcription par les lymphocytes T CD8 agit également dans le lignage des lymphocytes T CD8 en cellules SLEC versus en cellules MPEC. ID2 est associé à la différenciation en cellules SLEC^{271, 272} alors que ID3 est lui associé à la transition des lymphocytes T CD8 effecteurs en lymphocytes T CD8 mémoires²⁷⁰.

- IRF4 et BATF :

Une absence d'expression du facteur de transcription BATF entraîne un défaut de différenciation des lymphocytes T CD8 en lymphocytes T CD8 effecteurs dans un contexte d'infection avec le virus LCMV, entre autres^{273, 274}. Des analyses de séquençage *ChIp-seq* publiées

par Kurachi et *al.* ont mis en évidence que l'absence de BATF perturbait l'expression des facteurs de transcription *Tbet* et *Blimp1*, mais cependant n'altérait pas l'expression des cytokines suggérant que BATF agirait lors des événements précoces de l'activation des lymphocytes T CD8²⁷³. De plus, Barnitz et *al.*, ont mis en évidence que BATF contrôlait la différenciation des lymphocytes T CD8 en cellules effectrices^{273, 275}. En effet, dans un modèle murin d'infection avec le virus LCMV il a été démontré suite à l'infection que l'expression de ce facteur de transcription était augmentée. De plus, l'expansion des lymphocytes T CD8 déficients pour ce gène en réponse à une infection avec le virus LCMV était grandement diminuée puisque le nombre total était diminué d'environ 400.

Trois études majeures ont mis en avant le rôle du facteur de transcription IRF4 dans l'expansion des lymphocytes T CD8 en réponse à des infections de type viral (le virus LCMV, et le virus de l'influenza)^{276, 277} et en réponse à une infection de type bactérienne (*Listeria monocytogenes*)²⁷⁸. En effet des souris déficientes pour le gène *Irf4* échouent dans l'élimination de la bactérie *Listeria monocytogenes*²⁷⁸. Ce défaut d'élimination de la bactérie est intrinsèque à l'absence d'expression d'*Irf4* dans les lymphocytes T CD8 puisque des souris déficientes pour *Irf4* infectées et transférées avec des lymphocytes T CD8 de type sauvages contrôlent l'infection. Des résultats similaires ont été trouvés lors d'infection avec le virus de l'influenza²⁷⁷ et le virus LCMV²⁷⁹. Ces trois études démontrent qu'en absence d'IRF4, les lymphocytes T CD8 peuvent être activés, mais cependant échouent dans le maintien de la prolifération et expansion clonale et ont une diminution des fonctions cytolytiques ainsi qu'une augmentation de l'apoptose^{276, 277, 278}. De plus Yao et *al.* ont mis en évidence que IRF4 se liait et inhibait l'expression du gène codant pour CDKN2A impliqué dans l'inhibition du cycle cellulaire d'une part²⁷⁷, mais également permettait à TBET de se lier aux promoteurs codant pour l'*Ifny* et codant pour le *Granzyme B* engendrant des fonctions effectrices de ces lymphocytes T CD8²⁷⁷. Une autre étude a mis en évidence qu'en absence d'IRF4 le processus d'adaptation métabolique des lymphocytes T CD8 lors de la reconnaissance antigénique était altéré²⁷⁶ suggérant un rôle de ce facteur de transcription à des temps précoces de l'activation des lymphocytes T CD8.

L'adaptation métabolique

L'un des changements les plus notables suite à l'engagement du TCR par le lymphocyte T lors de la reconnaissance antigénique est l'augmentation de la taille du lymphocyte T ainsi que le

changement de son métabolisme^{280, 281, 282}. En effet, le métabolisme de ces cellules s'adapte dans sa génération de l'énergie sous forme d'ATP via la phosphorylation oxydative des mitochondries lorsque ces cellules sont naïves vers un processus de glycolyse aérobie et de synthèse de lipides afin de fournir l'énergie nécessaire à la cellule lorsque celle-ci devient activée, pour induire les différents programmes transcriptionnels impliqués dans l'activation, l'expansion, la prolifération, la production de cytokines et la survie de ces cellules^{283, 284, 285, 286}. Lors de la stimulation du TCR, des signaux provenant de l'IL-2 et l'interaction du ligand de la molécule de costimulation CD28 entraînent une augmentation de la glycolyse en induisant l'activation de la protéine AKT via l'activation de la kinase PI3K^{194, 287}. Suite à cette activation, AKT va agir sur la voie de signalisation mTOR (*mammalian target of rapamycin*) qui entraînera la stimulation de la glycolyse en augmentant l'expression de transporteur de nutriments tel que GLUT-1^{288, 289, 290} permettant l'utilisation de glucose et l'expression de transporteur d'acides aminés favorable à la glycolyse^{291, 292, 293, 294, 295, 296}. Cette reprogrammation métabolique est connue sous le nom d'effet Warburg observé et décrit dans le métabolisme des cellules tumorales^{297, 298, 299}. Cependant, l'effet Warburg est également observé dans les cellules non cancéreuses telles que les lymphocytes T lors de leur activation³⁰⁰. Ainsi, la production d'ATP via la glycolyse aérobie est moindre comparé à la production via la phosphorylation oxydative. Ainsi de manière logique, une question se soulève concernant cette reprogrammation métabolique. Pourquoi choisir un mécanisme de production d'énergie moins efficace ? Une explication possible est que lors de la glycolyse aérobie, des acides aminés, des acides gras ainsi que du lactate seront formés et pourront être incorporés dans des composés de la cellule³⁰¹ permettant une prolifération plus rapide lors d'une infection et donc une expansion clonale rapide des lymphocytes T spécifiques pour un antigène donné, conférant un avantage dans la réponse immunitaire lors de l'infection³⁰². En revanche, le programme métabolique des lymphocytes T en quiescences (lymphocytes T naïfs et lymphocytes T mémoires) est différent puisqu'ils vont puiser leur énergie sous forme d'ATP produite par la phosphorylation oxydative des mitochondries ainsi que via l'oxydation des acides gras^{280, 283, 301}. En effet, dans le cas des cellules quiescentes, les facteurs de croissance vont avoir la capacité de moduler l'expression de transporteurs de nutriments permettant la survie des lymphocytes T³⁰³. De plus, les cellules en quiescence peuvent également faire appel au processus d'autophagie afin de produire l'énergie nécessaire à leur survie³⁰⁴.

L'un des régulateurs clés de l'adaptation métabolique des lymphocytes T lors de leur activation est la molécule mTOR. Une manière de voir l'activité de cette protéine est d'analyser la phosphorylation de ses cibles, telle que la protéine S6. En effet, la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR n'est pas unique aux lymphocytes T et permet l'augmentation des activités métaboliques pour la biosynthèse des composés cellulaires en réponse à des facteurs de croissances²⁹⁶. Ainsi, une augmentation de l'entrée de nutriments dans la cellule va entraîner l'activité glycolytique de la cellule et permettre la biosynthèse des composés cellulaires²⁹³. Il est donc bien documenté que l'inhibition de mTOR entraîne une inhibition de la prolifération des cellules³⁰⁵. Ainsi Araki et *al.* ont mis en évidence que l'inhibition de mTOR entraînait un choix de différenciation des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T mémoires. De plus l'usage de la metformin, un activateur de la protéine AMPK qui va avoir un rôle dans l'inhibition de mTOR permet la génération des lymphocytes T CD8 mémoires en réponse à une infection avec la bactérie *Listeria monocytogenes*³⁰⁶. Une autre étude a montré le rôle de la protéine *Gsk3 β* . En effet, l'inhibition de cette molécule va induire la différenciation des lymphocytes T nouvellement activés en lymphocytes T mémoires via l'inhibition de mTOR de manière AMPK dépendante³⁰⁷. Ainsi l'ensemble de ces études suggère que ces régulations métaboliques jouent un rôle dans le choix de différenciation des lymphocytes T CD8 activés.

Bien que la production du glucose soit requise et nécessaire à la prolifération des lymphocytes T ainsi qu'à leur survie lors de ce processus d'activation^{282, 308, 309}, peu est connu quant à l'adaptation du métabolisme des lipides dans la régulation de la réponse des lymphocytes T. Une étude a mis en évidence le rôle de la molécule LXR (*Liver X receptor*), facteur de transcription impliqué dans la régulation du cholestérol, des acides gras, et de l'homéostasie du glucose, dans la prolifération des lymphocytes T³¹⁰. En effet, des souris déficientes pour le gène *Lxr- β* présentent des hyperplasies lymphoïdes (ganglions lymphatiques et rate) suite à une stimulation antigénique. Cette étude met en évidence l'importance du métabolisme des lipides dans la réponse T. De plus, une autre étude publiée par Pearce et *al.* a montré le rôle de l'oxydation des acides gras dans la génération des lymphocytes T CD8 mémoires²⁸⁹. D'autres études ont également mis en évidence que les cellules présentatrices d'antigène contrôlaient la prolifération des lymphocytes T en régulant la disponibilité des acides aminés^{311, 312, 313}. Ainsi l'ensemble de ces études suggèrent un rôle du métabolisme des lipides et des acides aminés dans la réponse des lymphocytes T et leur choix de différenciation.

Les fluctuations métaboliques des lymphocytes T durant les différentes phases de la réponse des lymphocytes T permettent à ces cellules de pouvoir s'adapter et se mettre dans des meilleures conditions pour survivre et/ou combattre une infection par exemple.

Phase de contraction des lymphocytes T

Une majorité des lymphocytes T CD8 meurent par apoptose (90%) suite à l'élimination de l'infection. Seuls 10% de ces cellules deviendront des cellules mémoires qui pourront intervenir plus rapidement lorsque le même pathogène infectera l'hôte. Badovinac *et al.* ont mis en évidence que le processus de contraction des lymphocytes T CD8 suite à une infection est programmé, mais également régulé par l'inflammation^{314, 315}. En effet, ce groupe de recherche a montré que plus l'inflammation précoce est de forte intensité moindre est le nombre de lymphocytes T CD8 effecteurs qui survivent. Prlic *et al.* quant à eux ont mis en lumière le rôle essentiel du facteur proapoptotique BIM dans ce phénomène de contraction des lymphocytes T CD8 suite à l'élimination d'une infection³¹⁵. Ainsi, la phase de contraction n'est pas observée dans des souris déficientes pour ce gène.

La phase de contraction entraîne la mortalité des cellules par apoptose qui peut aussi être due à des signaux extrinsèques tels que l'engagement des ligands/récepteurs de mort cellulaire (FASL/FAS, TRAIL/TRAILR, TNF/TNFR). Les récepteurs de ces ligands ont des domaines de mort cellulaire qui vont permettre le recrutement entre autres des procaspases 8 et 10 et qui vont activer les caspases 3, 6 et 7 et entraîner l'apoptose³¹⁶.

Phase de mémoire des lymphocytes T

Suite à la phase de contraction, seuls 10% des cellules survivent et deviennent des lymphocytes T CD8 mémoires. Ces cellules vont avoir un phénotype différent des lymphocytes T CD8 naïfs. En effet, ces cellules vont exprimer plus de molécules de type intégrines α et β , molécules impliquées dans l'interaction cellulaire avec des cellules présentatrices d'antigène ainsi que dans la migration vers les organes lymphoïdes secondaires^{317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328}. Le réservoir de ces cellules spécifiques pour un antigène donné est également supérieur au réservoir des lymphocytes T CD8 naïfs spécifiques pour ce même antigène³²⁹. De manière très intéressante,

plusieurs études ont démontré que les lymphocytes T CD8 mémoires étaient plus sensibles que les lymphocytes T CD8 naïfs et n'avaient pas besoin de beaucoup de stimulation antigénique pour être activés^{323, 330, 331, 332, 333, 334}. De plus ces cellules sont aussi plus sensibles aux signaux de l'inflammation et peuvent être réactivées de manière indépendante à la reconnaissance d'un antigène^{335, 336}. En effet, Richer et *al.* dans deux publications ont mis en évidence que ces signaux inflammatoires augmentaient l'activation de la signalisation proximale du TCR en augmentant ainsi la sensibilité du TCR ainsi que l'expression de gènes cibles impliqués dans le cycle cellulaire^{337, 338}.

2. Les rythmes circadiens

2.1 Généralité

Les rythmes circadiens correspondent à des rythmes biologiques endogènes d'environ 24 heures. Cette observation a été publiée pour la première fois dans un rapport de l'Académie française des sciences en 1729 par Jean Jacques d'Ortous de Mairans. Le rapport décrit les mouvements des feuilles de la sensitive en fonction du cycle jour/nuit. En effet, les rameaux et les feuilles de cette plante se dirigent vers le soleil le jour et se replient et se contractent au coucher du soleil. Cependant, ces mouvements persistaient lorsque cette plante était placée en condition constante d'obscurité, ouvrant ainsi l'éventualité d'un facteur endogène à l'organisme dans ce rythme observé. De nombreuses études ont ensuite suivi et mis en évidence l'existence de ces rythmes circadiens dans divers organismes tels que l'humain et les modèles murins^{339, 340, 341}. Les rythmes circadiens sont contrôlés par des oscillateurs circadiens présents dans l'ensemble des tissus et des cellules d'un organisme³⁴². Ces oscillateurs agissent au niveau comportemental, mais également contrôlent de nombreux processus physiologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire. En effet, les horloges circadiennes contrôlent une multitude de processus via la régulation de la transcription de milliers de gènes³⁴³. Chez les mammifères, l'horloge centrale des rythmes circadiens est localisée dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) qui sont localisés dorsalement du chiasma optique dans la partie antérieure de l'hypothalamus. L'horloge centrale est synchronisée via les cycles jour/nuit et va jouer un rôle dans la synchronisation des horloges circadiennes périphériques, présentes dans les autres tissus et cellules de l'organisme. Les signaux

externes, tels que le cycle jour/nuit ou le rythme d'alimentation, permettant d'entraîner les horloges circadiennes sont appelés *zeitgeber*, pour donneur de temps. Cependant, en absence de signaux de l'environnement, la persistance des rythmes circadiens est observée et est ainsi caractérisée comme endogène à l'organisme. Ces rythmes d'origine endogène permettent à l'organisme de pouvoir anticiper tout changement de l'environnement dû au cycle jour/nuit entre autres.

2.2 Mécanismes cellulaires et moléculaires des rythmes circadiens

Les rythmes circadiens sont caractérisés par trois composantes essentielles :

- Les voies de signalisations entrantes permettant de transférer les informations provenant de l'environnement à l'horloge centrale, les NSC. Les NSC reçoivent les informations photiques directement par les yeux via les voies rétiniennes. En effet, des premières observations chez l'humain ont montré que l'absence des yeux bloquait l'information photique et ainsi les réponses circadiennes³⁴⁴. De plus, cela a ensuite été observé chez la souris dans des expériences d'énucléation³⁴⁵.
- Les horloges circadiennes (l'horloge centrale : les NSC et les horloges périphériques)
- Les voies de signalisations sortantes permettant de transférer les informations provenant des horloges circadiennes au reste de l'organisme.

Mécanismes cellulaires

L'horloge centrale : les noyaux suprachiasmatiques

Les NSC localisés dorsalement du chiasma optique dans la partie antérieure de l'hypothalamus chez les mammifères contrôlent les rythmes associés aux comportements ainsi qu'aux processus physiologiques. Ainsi, deux études majeures dans le domaine ont démontré que des lésions de ces noyaux abolissaient le rythme d'activité locomotrice de rats, mais également le rythme de sécrétion de la corticostérone par les glandes surrénales^{346, 347}. D'autres études ont mis en évidence que ces rythmes peuvent être partiellement restaurés après une greffe de NSC suite à

une lésion de ces tissus^{348, 349, 350}. Ainsi cette structure cérébrale est donc caractérisée comme l'horloge centrale des rythmes circadiens.

Les NSC reçoivent des informations d'origine photique directement via les voies rétiniennes qui permettent ainsi leur propre synchronisation avec le rythme jour nuit³⁵¹, mais permettent également d'envoyer des signaux d'origines nerveuses³⁵² ou humorales^{353, 354, 355} en périphérie dans le but de synchroniser les horloges périphériques^{349, 350, 356, 357}. Les signaux peuvent également émaner de rythmes circadiens contrôlés via le rythme de la température corporelle^{358, 359, 360}, mais également via le rythme d'alimentation. Cependant, bien que considérés comme le régulateur maître des rythmes circadiens, il existe certains tissus tels que la rétine, ou le bulbe olfactif qui vont présenter une synchronisation de leurs horloges circadiennes via un oscillateur local autre que les NSC^{361, 362, 363, 364}. D'autres tissus tels que le foie présente une synchronisation de ces horloges circadiennes via les NSC, mais également via un oscillateur local présent dans le foie^{363, 365, 366}. En effet, Kormann et *al.* ont mis en évidence la persistance de certains transcrits exprimés de manière rythmique dans le foie de souris ayant les horloges circadiennes altérées dans le tissu, tel que le gène *Per2* suggérant un contrôle via l'horloge centrale, les NSC³⁶⁵. Cependant la majorité des transcrits rythmiques chez les souris de type sauvage sont dépendant des horloges circadiennes des hépatocytes.

Les NSC sont composés de cellules neuronales et d'astrocytes, qui vont répondre à différents signaux neuronaux externes dans le but d'activer ou d'inhiber les fonctions des NSC. En effet, il existe trois voies neuronales majeures qui agissent sur les NSC (**Figure 5**) :

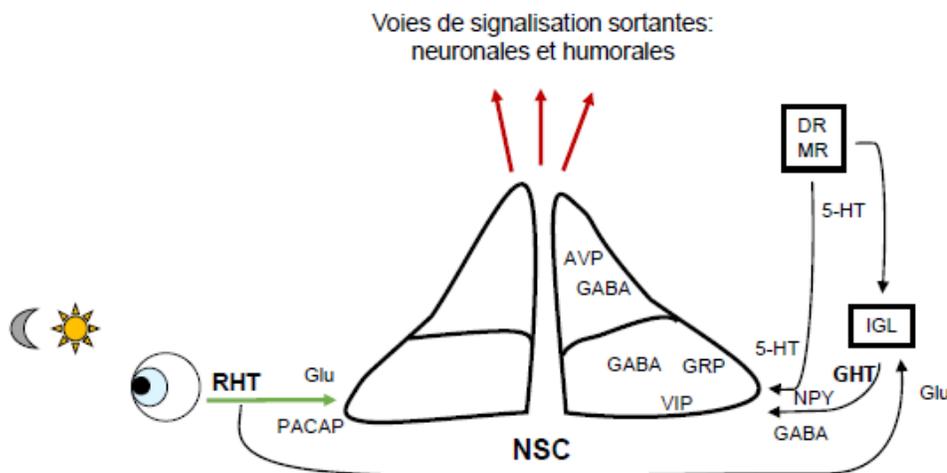


Figure 5. – Composition et organisation des noyaux suprachiasmatiques

Représentation schématique de la composition ainsi que des signaux arrivant dans et émanant des noyaux suprachiasmatiques. Légende : la flèche verte représente la voie entrante permettant de transférer les informations provenant de l'environnement à l'horloge centrale, les NSC et les flèches rouges représentent les voies de signalisations sortantes permettant de transférer les informations provenant des horloges circadiennes au reste de l'organisme. RHT (système hypothalamique rétinien), Glu (glutamine), PACAP (polypeptide activant l'adénylate cyclase), SCN (noyaux suprachiasmatiques), AVP (*Arginine vasopressin*), VIP (*vasoactive intestinal peptide*), GRP (gastrin-releasing peptide), NPY (polypeptide Y), 5-HT (sérotonine), GHT (système hypothalamique géniculaire), MR (raphé médian), IGL (feuillet intergéniculaire).

- *Le système hypothalamique rétinien (RHT)*

Le système hypothalamique rétinien contient des cellules ganglionnaires de la rétine contenant le photo-pigment mélanopsine. Ce système est considéré comme une voie directe d'action sur les NSC via la sécrétion des neurotransmetteurs : glutamate³⁶⁷ et le polypeptide activant l'adénylate cyclase (PACAP)³⁶⁸ jouant un rôle dans l'activation des fonctions des NSC. Ainsi le glutamate agit directement sur la dépolarisation et l'augmentation des potentiels d'action des neurones des NSC alors que le PACAP va avoir une action indirecte en modulant l'action du glutamate sur les NSC^{367, 368}

- *Le système hypothalamique géniculaire (GHT)*

Le système hypothalamique géniculaire contient des cellules du feuillet intergéniculaire³⁶⁹ (IGL) et représente une voie indirecte d'action sur les NSC via la sécrétion des neurotransmetteurs : polypeptide Y (NPY)³⁷⁰ jouant un rôle inhibiteur de la fonction des NSC et le GABA renforçant le signal du NPY. Ainsi, l'injection de NPY dans les NSC de hamster va avoir pour rôle de resynchroniser le comportement des animaux lors de la phase lumineuse du cycle circadien³⁷¹.

- *Le raphé médian (MR)*

Le raphé médian innerve la partie ventrale et centrale des NSC. Tout comme le système hypothalamique géniculaire, le MR va avoir une action inhibitrice de la fonction des NSC via la sécrétion de la sérotonine (5-HT)³⁷². En effet la sérotonine va inhiber l'activité neuronale des neurones des NSC.

Ces voies de signalisation vont agir sur les NSC qui vont ensuite envoyer des signaux neuronaux et humoraux aux tissus périphériques permettant de synchroniser les horloges périphériques présentes dans ces tissus.

Les horloges périphériques

De nombreuses études ont démontré que l'expression rythmique des gènes et protéines des horloges circadiennes dans les tissus périphériques persistait en culture *in vitro* en dehors de tous signaux provenant des NSC^{373, 374, 375}. Ainsi, bien que les NSC soient les régulateurs maîtres des rythmes circadiens, certains tissus et cellules en périphérie expriment leur propre oscillateur. Ainsi dans un premier temps, Balsalobre et *al.* ont mis en évidence qu'un choc de sérum induisait l'expression des gènes des horloges circadiennes suggérant un rôle des glucocorticoïdes dans le démarrage de novo ou dans la synchronisation des horloges circadiennes des fibroblastes³⁷⁴. Dans le même modèle de cellules *in vitro*, des fibroblastes de souris, Nagoshi et *al.* ont mis en évidence que ces cellules exprimaient leur propre oscillateur et de manière intrinsèque à la cellule tout comme les NSC³⁷⁶. Ces résultats suggèrent que les horloges circadiennes de ces cellules sont capables de générer des rythmes circadiens en absence de signaux provenant d'autres oscillateurs.

Les horloges circadiennes périphériques se synchronisent via :

- *Le système nerveux*

Les NSC agissent via le système sympathique et le système parasympathique dans le cas de la synchronisation des horloges des glandes salivaires et du foie^{377, 378, 379, 380}. Les NSC envoient des projections au niveau des noyaux paraventriculaires qui vont ensuite envoyer les signaux à ces deux tissus. Les NSC agissent aussi via le système sympathique (via les voies rétinienne, dans le transfert d'information d'origine photique) dans la synchronisation des horloges circadiennes des glandes surrénales influençant le relargage de glucocorticoïdes, hormone ayant un rôle dans la régulation des rythmes circadiens³⁷⁸, mais également dans la synchronisation des horloges circadiennes du foie.

- *Le système humoral*

Plusieurs hormones contrôlent et/ou sont contrôlées par les horloges circadiennes. Ainsi, voici une liste ci-dessous de certaines de ces hormones qui jouent un rôle dans le contrôle circadien de l'homéostasie du vivant et qui contrôlent également la synchronisation des horloges.

La mélatonine :

Les NSC interagissent via le système sympathique avec la glande pinéale responsable de la sécrétion de la mélatonine. Cette hormone joue des rôles importants et est considérée comme un acteur clé dans le relai de l'information sur le cycle jour/nuit et joue ainsi sur le comportement, et le sommeil des mammifères entre autre³⁸¹. En effet, la mélatonine dont les récepteurs MT1 et MT2 sont exprimés sur les NSC entre autres, joue un rôle *in vivo* dans l'entraînement des rats gardés en conditions constante d'obscurité et des humains^{382, 383, 384, 385, 386, 387}. Également *in vitro*, il a été montré que cette hormone agirait sur l'amplitude ainsi que la phase d'explants de NSC mis en culture^{388, 389}. La mélatonine régule de plus la pression sanguine³⁹⁰ et joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire³⁹¹. Chez les humains et les primates, cette hormone agit également sur les glandes adrénégiques en inhibant la production de cortisol (hormone appartenant à la famille des glucocorticoïdes)^{392, 393, 394} connu comme ayant une action importante dans la synchronisation des horloges circadiennes périphériques.

Les glucocorticoïdes :

Balsalobre et *al.* ont mis en lumière le rôle des glucocorticoïdes dans la synchronisation des cellules telle que des fibroblastes *in vitro*³⁹⁵. En effet les NSC contrôlent la sécrétion de cette hormone par le cortex des glandes adrénégiques de manière rythmique avec un maximum de sécrétion tôt le matin ou en début de phase lumineuse pour les animaux diurnes et tôt en soirée ou en début de phase d'obscurité pour les animaux nocturnes^{396, 397, 398}. Ainsi, il a été démontré que l'injection de dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse) entraînait un décalage de la phase d'expression des gènes des horloges circadiennes dans les tissus périphériques *in vivo* chez le rat³⁹⁵. Mais également que l'injection de dexaméthasone à des souris lésionnées au niveau des NSC permettait la synchronisation de la machinerie circadienne du foie³⁹⁹. Finalement, dans un modèle murin de décalage horaire, Kiessling et *al.* ont identifié les glucocorticoïdes comme étant un acteur clé de la resynchronisation des horloges circadiennes⁴⁰⁰. L'ensemble de ces études tend vers un rôle important de cette hormone dans la synchronisation des horloges circadiennes périphériques.

La vasopressine :

La vasopressine est produite par les NSC, les paraventriculaires et les noyaux supraoptiques de l'hypothalamus. Les NSC régulent directement la sécrétion de cette hormone qui va avoir une action sur l'inhibition de la sécrétion de corticostérone^{401, 402}.

L'insuline, la ghrelin, l'adiponectine et la leptine :

Ces hormones ont des rôles dans les régulations métaboliques. La sécrétion de l'insuline présente un maximum autour de 17 heures et un minimum autour de 4 heures chez les humains, permettant son action de stockage de nutriments lors de la phase active. En effet, les horloges circadiennes jouent un rôle dans la sécrétion de l'insuline ce qui entraîne un défaut dans le contrôle de la glycémie. Ainsi une hypoinsulinémie^{403, 404} a été observée chez des souris déficientes pour le gène *Bmal1* (gène des horloges circadiennes essentiel au fonctionnement de celles-ci) ou des souris *Clock*^{Δ19/Δ19} (mutant génétiquement modifié des horloges circadiennes) et à l'inverse une hyperinsulinémie^{405, 406} a été observée chez des souris déficientes pour le gène *Cry* ou *Per*. De plus il a été démontré que l'insuline pouvait contrôler les horloges circadiennes. En effet, des expériences menées sur des cultures primaires d'hépatocytes de souris et de rats ont montré que l'insuline pouvait resynchroniser les horloges de ces cellules^{407, 408}.

La ghreline est une hormone produite par l'estomac et le pancréas. Une étude a mis en évidence que cette hormone contrôlait l'expression des gènes des horloges circadiennes dans les NSC entraînant une augmentation de l'appétit⁴⁰⁹.

L'adiponectine est sécrétée par le tissu adipeux et présente un pic de sécrétion entre 12 et 14 heures chez les humains^{410, 411}. Ainsi dans un modèle murin mimant un syndrome métabolique induit par une diminution de cette hormone, l'activité locomotrice de ces animaux était réduite suivie également d'un décalage de phase d'expression des gènes des horloges circadiennes dans le foie et les tissus musculaires des animaux⁴¹². La restauration de l'expression de cette hormone dans le foie des animaux résultait à un retour à la normale de l'activité locomotrice ainsi que de l'expression des gènes des horloges circadiennes dans le foie des animaux étudiés⁴¹².

La leptine est sécrétée par le tissu adipeux blanc en réponse à une augmentation du glucose hépatique et présente un pic de sécrétion au cours de la nuit chez les humains. Une étude a montré que cette hormone resynchronisait les gènes de l'horloge circadienne centrale, les NSC⁴¹³.

- *La température corporelle*

La température corporelle est connue pour être rythmée et présente son maximum en fin de soirée chez l'humain⁴¹⁴. Les oscillateurs périphériques peuvent être contrôlés par les variations de températures corporelles lors d'un cycle de vingt-quatre heures^{358, 365, 415, 416}. Ainsi, certains oscillateurs périphériques sont fortement influencés par celle-ci. Les fibroblastes, le foie, les reins et les poumons peuvent avoir leurs horloges circadiennes resynchronisées lorsque des explants de tissus ou de cellules sont incubés à de faibles températures^{358, 415 365}.

- *La prise des repas*

Le rythme d'alimentation est connu comme ayant un rôle important dans la synchronisation des horloges en périphérie dont les horloges circadiennes présentent dans le foie^{359, 360, 417, 418}. En effet, des expériences de restriction alimentaire le jour chez des rongeurs nocturnes entraîne une inversion de phase de l'expression des gènes de l'horloge dans le foie de ces animaux, ce qui n'est pas le cas concernant l'expression des gènes des horloges dans les NSC. De plus, l'activité locomotrice des animaux va augmenter juste avant la prise de repas des souris. Ce phénomène observé est appelé *Food anticipatory activity*. Ce processus n'est pas contrôlé par l'horloge centrale, puisque des animaux ayant des lésions des NSC présentent une persistance de ce phénomène d'anticipation d'activité⁴¹⁹. Ainsi, il doit exister un oscillateur local ou systémique autre que les NSC régulant ce processus. Plusieurs études ont écarté le rôle du bulbe olfactif⁴²⁰, de l'hypothalamus ventro-médian⁴²¹, des noyaux thalamiques paraventriculaires⁴²², et du système digestif⁴²³. D'autres études se sont intéressées à l'hypothalamus dorsomédian (DMH). Cependant l'ensemble de ces études se contredit. En effet Landry et *al.* ainsi que Moriya et *al.* ont mis de l'avant que le DMH n'était pas responsable du phénomène de *Food anticipatory activity*, alors Acosta-Galvan et *al.* ont montré que le DMH interagissait avec les NSC dans des conditions de restriction alimentaire, suggérant un rôle de cette structure cérébrale dans le contrôle de ce processus.

Mécanismes moléculaires

Les rythmes circadiens sont finement contrôlés par des horloges circadiennes composées de gènes de l'horloge qui sont exprimés de manière rythmique dans les cellules (**Figure 6**). L'identification et l'analyse des composants moléculaires des horloges circadiennes a permis de

mettre en lumière une conservation des mécanismes entre les différentes espèces, que ce soit les drosophiles, les cyanobactéries ou les mammifères par exemple^{339, 424, 425, 426}. L'identification des composants moléculaires des horloges circadiennes des mammifères n'est discutée dans la littérature que depuis environ deux décennies. Cependant le travail fourni par l'ensemble de la communauté scientifique dans le domaine a permis en peu de temps de mettre en lumière de nombreux mécanismes via l'usage de modèles murins déficients pour les gènes des horloges circadiennes.

La boucle de rétroaction transcriptionnelle/traductionnelle des gènes des horloges circadiennes

Les horloges circadiennes sont composées de gènes/protéines (facteurs de transcription) exprimés dans une grande majorité des tissus/cellules de manière rythmique avec une période d'environ vingt-quatre heures (**Figure 6**). Elles sont composées d'un complexe protéique CLOCK/BMAL1 qui régule positivement la transcription des gènes *Period* (*Per1-3*) et *Cryptochrome* (*Cry1-2*). Ces ARNm vont être ensuite traduits en protéines dans le cytoplasme des cellules. Ces protéines vont hétérodimériser avant d'être transloquées aux noyaux afin d'inhiber leur propre transcription en inhibant le complexe CLOCK/BMAL1. En parallèle de cette boucle de rétroaction, une deuxième boucle impliquant d'autres gènes de l'horloge intervient. Le complexe CLOCK/BMAL1 régule également la transcription des gènes *Rev-Erb* (α et β) aussi nommés *Nr1d1* et *Nr1d2* et des gènes *Ror* (α , β , et γ). Ces ARNm vont ensuite être traduits en protéines et vont avoir des actions antagonistes dans la régulation transcriptionnelle du gène *Bmal1*. Les gènes *Rev-Erb* vont inhiber alors que les gènes *Ror* vont activer la transcription du gène *Bmal1*. Chaque gène des horloges circadiennes va avoir un pic d'expression (on parlera d'acrophase : moment où le gène est le plus fortement exprimé sur vingt-quatre heures lors d'un cycle circadien) différent en fonction de la nature du gène, du tissu ou des cellules où il est exprimé. L'**annexe 1** résume l'expression des gènes des horloges circadiennes dans les tissus et cellules étudiés répertoriés dans la littérature chez les rongeurs (souris et rat).

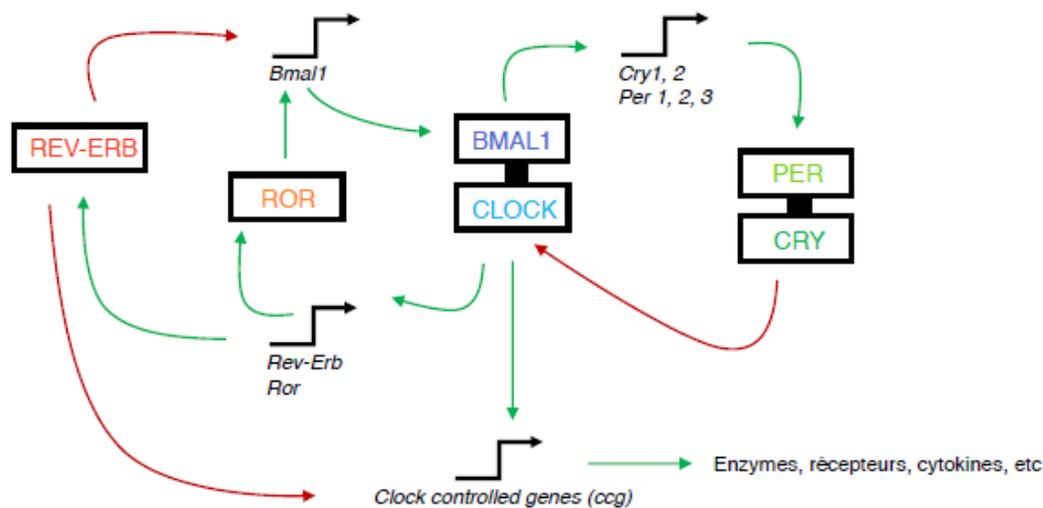


Figure 6. – Boucle de rétroaction transcriptionnelle/traductionnelle des gènes de l’horloge. Légende : flèches verte (activation de la transcription), flèches rouges (inhibition de la transcription)

Les modèles murins génétiquement modifiés pour l’études des rythmes circadiens

Le premier gène des horloges circadiennes identifié chez les mammifères est le gène *Clock*⁴²⁷. Il a été découvert suite à une expérience de mutagenèse via l’usage de N-nitroso-N-éthylurée (ENU). Cette étude a permis d’identifier et d’isoler une souris ayant une activité locomotrice arythmique lorsque celle-ci était placée en condition constante d’obscurité, donnant ainsi le premier mutant des horloges circadiennes, la souris *Clock*^{Δ19/Δ19}. Ce mutant présente une mutation au niveau de l’exon 19 (changement d’un nucléotide A vers un nucléotide T), exon codant pour le domaine d’interaction avec le partenaire moléculaire BMAL1. King et *al.* ont ensuite mis en évidence que cette mutation résultait en la formation d’un mutant dominant négatif⁴²⁸. Les souris *Clock*^{Δ19/Δ19} placées dans un cycle jour/nuit de douze heures de lumière et douze heures d’obscurité (cycle LD) vont avoir un comportement locomoteur similaire aux souris de type sauvage. Cependant lorsque ces souris sont placées dans un environnement constant d’obscurité (cycle DD), elles vont avoir un comportement locomoteur arythmique^{427, 429}. D’autres modèles ont ensuite suivi, tels que les souris déficientes pour le gène *Clock*. Cependant, ces souris présentent un comportement locomoteur similaire aux souris de type sauvages, qui est dû à l’analogue protéique NPAS2 qui substitue la fonction de la protéine CLOCK^{430,431}. D’autres types de souris permettant l’analyse des rythmes circadiens existent, telles que les souris déficientes pour les gènes *Cry1* et

Cry2, qui sont des mutants résultant d'une mutation entraînant une perte de fonction de la protéine. Les souris *Cry2* mutantes vont avoir une période allongée⁴³², alors que les souris déficientes pour les deux gènes vont avoir un comportement locomoteur arythmique lorsqu'elles sont placées dans un cycle DD^{433, 434}. Il existe également des mutants pour les gènes *Period (1-3)*, mais qui vont avoir une période plus courte de 0.5 à 1 heure en fonction du mutant^{435, 436, 437, 438, 439}. La délétion uniquement du gène *Bmal1*⁴⁴⁰ est le seul modèle murin où l'abolition des rythmes circadiens a été observé dans les NSC et les tissus périphériques^{441, 442, 443}. Ces différents modèles génétiques ont permis de faire avancer la compréhension des rythmes circadiens et les mécanismes moléculaires associés.

Dans la section : *Mécanismes cellulaires, l'horloge centrale*, nous avons établi basé sur la littérature que certains tissus tels que le foie avaient leur propre oscillateur permettant de contrôler de manière rythmique certains processus physiologiques. L'ensemble des études qui en découlent ont dans la grande majorité utilisée des modèles murins génétiquement modifiés dont la fonction des horloges circadiennes a été abolie uniquement à l'échelle de certains tissus ou de certaines cellules via différents mécanismes. Ainsi, prenons l'exemple de l'étude de Kornmann et *al.* qui démontre qu'en absence d'horloge fonctionnelle dans les hépatocytes, la majorité des gènes exprimés de manière rythmique dans des souris de type sauvage est dépendante de l'horloge locale alors que d'autres gènes sont dépendants d'autres horloges³⁶⁵. Cette étude s'inscrit parmi tant d'autres dans la description du rôle essentiel des horloges circadiennes dans le contrôle circadien de la transcription de gènes. Cependant, l'usage de ces différents modèles murins ne permet pas de conclure que les horloges affectées par la délétion sont responsables de l'abolition des rythmes observés. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'horloge étudiée est un relai à des rythmes en amont de cette horloge ou qu'au contraire l'horloge étudiée génère des rythmes de certains facteurs qui vont eux avoir une action sur le rythme du processus étudié. De plus, les protéines des horloges circadiennes, via leur fonction de facteurs de transcription agissent dans le contrôle de l'expression de milliers de gènes de manière rythmique ou non, on parlera de gènes contrôlés par les horloges circadiennes (ccg)^{444, 445}.

L'usage de ces différents modèles murins dans le contrôle circadien de la réponse immunitaire sera abordé plus en détail dans les prochaines sections.

La fonction des gènes des horloges circadiennes : action sur les gènes contrôlés par les horloges circadiennes

Les protéines des horloges circadiennes de par leur fonction de facteur de transcription contrôlent l'expression de nombreux gènes. Ainsi dépendamment du tissu ou des cellules étudiés, le nombre de ccg peut varier de 5 à 25%^{343, 361, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455}. Cependant si l'on compare entre deux tissus, tels que les NSC versus le foie^{449, 456} ou le foie versus le coeur⁴⁵⁷, seulement 10% environ des gènes rythmés sont en commun entre ces tissus. De plus en fonction du tissu ou du type de cellule considéré, les gènes des horloges circadiennes vont être exprimés de manière rythmique ou non avec des phases d'expression similaires ou différentes (**Annexe 1**). Un exemple pourrait être la famille des gènes *Ror* (α , β , et γ). En effet, en fonction des tissus analysés la phase d'expression des gènes va être différente^{458, 459}. De plus, dans les NSC l'expression rythmique de *Ror α* est robuste alors que dans les tissus en périphérie l'oscillation circadienne de ce gène va être légère⁴⁶⁰. De manière intéressante, un autre variant du gène *Ror*, *Ror γ* , n'est pas exprimé dans les NSC, mais est exprimé dans les tissus périphériques et participe au fonctionnement des horloges circadiennes dans ces tissus^{459, 460} (**Annexe 1**). Une analyse de l'ensemble des études publiées dans le domaine, permet de conclure que la contribution de chaque gène des horloges circadiennes ainsi que son rôle dans le fonctionnement des horloges circadiennes peuvent varier d'un tissu à l'autre. On notera en effet, qu'en fonction du gène des horloges circadiennes muté ou éliminé (**Tableau 1**) les souris présenteront un phénotype avec des caractéristiques similaires, telles qu'une abolition du rythme du comportement locomoteur lorsque les souris sont placées dans un cycle DD, mais présenteront aussi des caractéristiques différentes, telle que l'infertilité pour les souris déficientes pour le gène *Bmal1*⁴⁴⁰, ou le développement de syndrome métabolique pour les souris *Clock* ^{$\Delta 19/\Delta 19$} ⁴⁶¹ ou l'altération de la mémoire pour des souris déficientes pour le gène *Npas2*⁴⁶². Ainsi, il est intéressant de noter que tous les gènes des horloges circadiennes ne sont pas rythmés ou peuvent avoir des phases d'expression différentes dans tous les tissus et qu'une délétion de ces gènes peut entraîner des phénotypes différents en fonction du gène touché. En effet, ces observations permettent de spéculer quant au rôle des gènes des horloges circadiennes dans le contrôle de l'expression des ccg dans les cellules des différents tissus. Puisque chaque tissu a sa propre fonction, nous pouvons penser que la régulation circadienne des ccg impliquée dans des processus physiologiques va dépendre du moment où l'organisme aura le plus besoin de susciter un processus physiologique en particulier telles que la régulation du sommeil ou

de la glycémie. De plus en fonction de la cellule ou du tissu considéré, les gènes contrôlés par les horloges circadiennes peuvent être différents, alors que les facteurs rythmiques comme CLOCK, BMAL1, REV-ERB alpha et DBP sont exprimés de manière ubiquitaire. Plusieurs possibilités peuvent expliquer ce phénomène. En effet, Menet et *al.* ont mis en évidence que les facteurs de transcription CLOCK et BMAL1 appartenaient à la famille des facteurs de transcription dit pionniers qui modulent l'accessibilité de la chromatine aux différents facteurs permettant l'activation ou l'inhibition de la transcription des gènes⁴⁶³. Dans une seconde étude, Menet et *al.* ont découvert que CLOCK et BMAL1 promouvaient l'accessibilité des régions dites *enhancers* des gènes, permettant de faciliter la liaison de cofacteurs et de facteurs de transcription entraînant ainsi l'activation de la transcription des gènes⁴⁶⁴. Ainsi ces deux études permettent de spéculer sur le fonctionnement de ces facteurs rythmiques dans le contrôle de l'expression des ccg en fonction du tissu ou de la cellule étudiée. En effet, un rôle possible serait que ces facteurs de transcriptions rythmiques contrôlent l'ouverture/la fermeture de la chromatine de nombreux gènes dans l'ensemble des cellules/tissus de l'organisme mais que cependant l'expression rythmique de gènes variant d'un tissu à un autre serait dû en plus de la présence ou non des cofacteurs et molécules importantes à la transcription à un certain moment de la journée. Ainsi des gènes impliqués dans la physiologie des macrophages tels que *Mmp9* et *Cx3cr1* seront contrôlés par les horloges circadiennes de ces cellules, ce qui ne sera pas le cas dans les cellules du foie⁴⁶⁵.

Gène altéré	Phénotype	Références
<i>Bmal1</i>	Infertilité Développement d'arthrose Glucogénèse anormale Lipogénèse anormale Glucogénèse anormale Arythmie du comportement locomoteur Altération du sommeil	440, 466, 467, 468, 469
<i>Clock</i>	Syndrome métabolique	461, 466, 470, 471

	<p>Glucogénèse anormale</p> <p>Altération du sommeil</p> <p>Arythmie du comportement locomoteur (cycle DD prolongé)</p> <p>Comportement locomoteur anormal en réponse à des psychostimulants</p>	
<i>Per1</i>	<p>Développement de cancer</p> <p>Comportement locomoteur anormal en réponse à des psychostimulants</p>	472, 473, 474
<i>Per2</i>	<p>Développement de cancer</p> <p>Comportement locomoteur anormal en réponse à des psychostimulants</p> <p>Syndrome de phase de sommeil avancé</p>	474, 475, 476, 477
<i>Per3</i>	<p>Syndrome de phase de sommeil retardé</p>	478, 479
<i>Cry1/Cry2</i>	<p>Altération du sommeil</p>	480
<i>Rora</i>	<p>Ataxie cérébelleuse</p> <p>Métabolisme osseux anormal</p>	481, 482, 483, 484
<i>Rorb</i>	<p>Difficultés locomotrices</p> <p>Dégénération rétinienne</p> <p>Cécité</p> <p>Difficulté de reproduction chez les mâles</p>	485
<i>Rory</i>	<p>Développement des organes lymphoïdes anormal</p> <p>Homéostasie anormale des lymphocytes</p>	486, 487, 488
<i>Npas2</i>	<p>Altération du sommeil</p> <p>Altération de la mémoire</p>	462, 489

2.3 Contrôle circadien de la réponse immunitaire

Les rythmes circadiens contrôlent de nombreux processus physiologiques chez les mammifères, incluant la réponse immunitaire innée et adaptative. Ainsi de multiples études ont mis en évidence le rôle clé des rythmes circadiens dans le maintien de l'homéostasie de la réponse immunitaire, ainsi que dans le contrôle de la réponse immunitaire lors d'une infection, de maladies auto-immunes ou lors de développement de cancers^{490, 491, 492}. Ces différentes études ont mis en évidence plusieurs mécanismes intrinsèques ou extrinsèques à la cellule ou au tissu étudié, démontrant le caractère complexe du fonctionnement des horloges circadiennes. Les sections ci-dessous introduiront point par point le rôle des horloges circadiennes dans l'homéostasie du système immunitaire, de la réponse immunitaire innée puis de la réponse immunitaire adaptative.

Contrôle circadien de l'homéostasie du système immunitaire

Dans le cas du système immunitaire, l'homéostasie représente la capacité de celui-ci à s'adapter et d'ajuster son environnement interne dans le but de maintenir un état de constante dynamique. Dans le cadre des rythmes circadiens, plusieurs études ont caractérisé le rôle de certains gènes des horloges circadiennes dans le développement et la différenciation de certaines cellules impliquées dans la réponse immunitaire. D'autres études ont également caractérisé le rôle des horloges circadiennes dans la recirculation des cellules immunitaires dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes et non lymphoïdes.

Rôle intrinsèque des horloges circadiennes

Les gènes des horloges circadiennes peuvent contrôler le développement de sous populations de cellules du système immunitaire : les cellules lymphoïdes innées (ILC)⁴⁹³, ainsi que la différenciation de sous populations de lymphocytes T CD4 : les cellules T *helper* 17 (Th17)⁴⁹⁴. Ces études démontrent via l'usage de plusieurs modèles murins déficients pour le gène des horloges

circadiennes *Rev-Erb α* ou *Nfil3* un rôle intrinsèque de la machinerie des horloges circadiennes dans la différenciation des lymphocytes T CD4 en lymphocytes Th17 et dans le développement des ILC. *Nfil3* appartient à la deuxième boucle de rétroaction des horloges circadiennes. Son expression est négativement régulée par *Rev-Erb α* . Ainsi Yu *et al.* ont démontré que le gène *Nfil3* inhibait la différenciation des lymphocytes T CD4 en lymphocytes Th17 via la régulation de l'expression du gène *Ror γ* ⁴⁹⁴. Cette étude a démontré que des souris déficientes pour le gène *Rev-Erb α* avaient moins de lymphocytes Th17 que des souris de type sauvage et qu'à l'inverse des souris déficientes pour le gène *Nfil3* présentaient une augmentation du nombre des lymphocytes Th17 par rapport aux souris de type sauvage. Ce même groupe de recherche a également démontré le rôle du gène *Nfil3* dans le développement des cellules lymphoïdes innées⁴⁹⁴.

Le rythme de recirculation des cellules immunitaires dans le sang est observé depuis plusieurs décennies chez les humains et les souris. Plusieurs mécanismes ont été mis en évidence dont le rôle essentiel et intrinsèque du gène *Bmal1* dans les cellules myéloïdes⁴⁹⁵, et les lymphocytes T⁴⁹⁶. Ces deux études ont utilisé des modèles de souris transgéniques permettant la délétion du gène *Bmal1* uniquement dans les cellules myéloïdes ou dans les lymphocytes T matures. Ainsi, la délétion du gène des horloges circadiennes *Bmal1* dans les cellules myéloïdes, et les lymphocytes T entraîne une ablation du rythme de recirculation de ces cellules dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires^{495, 496}.

Rôle extrinsèque des horloges circadiennes

À l'opposé des lymphocytes Th17 et des ILC, le développement des lymphocytes B est régulé également par le gène des horloges circadiennes, *Bmal1*⁴⁹⁷, mais de manière extrinsèque aux lymphocytes B. Sun *et al.* ont mis en évidence une diminution du nombre de lymphocytes B dans le sang, la moelle osseuse et la rate de souris déficientes pour le gène de l'horloge *Bmal1*⁴⁹⁷. Via un système de chimères hématopoïétiques, cette étude a permis de déterminer quel compartiment (hématopoïétique versus non hématopoïétique) était responsable de cette diminution du nombre de lymphocytes B. Ainsi des souris de type sauvage ont été irradiées puis greffées avec des cellules de moelle osseuse de souris déficientes pour le gène *Bmal1* dans le but d'étudier le rôle des horloges circadiennes du compartiment hématopoïétique dans un premier temps. L'analyse du nombre de lymphocytes B ne variait pas en comparaison aux souris de type sauvage contrôles reconstituées

avec une moelle osseuse issue de souris de type sauvage pour l'expression du gène *Bmall*. Cependant, les souris déficientes pour le gène de l'horloge *Bmall* irradiées et reconstituées avec une moelle osseuse issue de souris de type sauvage présentaient le même phénotype que les souris déficientes pour le gène *Bmall*. Ainsi, cette étude a mis en évidence le rôle du gène de l'horloge *Bmall* dans le développement des lymphocytes B de manière extrinsèque aux lymphocytes B. Ainsi ces résultats montrent que les horloges circadiennes d'autres cellules que les lymphocytes B, dans le cas de cette étude, de cellules d'origine non hématopoïétiques peuvent contrôler des mécanismes physiologiques de ces cellules. Cependant le mécanisme sous-jacent reste à être déterminé. Nous pouvons émettre l'hypothèse que BMAL1, via son action de facteur de transcription, agit sur la transcription de gènes impliqués dans la communication cellulaire entre les cellules non hématopoïétiques et les lymphocytes B permettant ainsi leur développement dans la moelle osseuse.

Tel que mentionné plus haut dans la section *Contrôle circadien de l'homéostasie du système immunitaire, Rôle intrinsèque des horloges circadiennes*, la recirculation des cellules immunitaires dans le sang est rythmique. Ces études se sont portées sur l'analyse de la recirculation des lymphocytes T dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate). Ainsi plusieurs mécanismes ont été mis en évidence :

- Les voies adrénergiques

Tel que mentionné plus haut dans la section *Mécanismes cellulaires, les horloges périphériques*, les glucocorticoïdes ont une action sur la synchronisation des horloges périphériques. Dans le cadre du rythme de recirculation des cellules immunitaires dans le sang, plusieurs études ont mis en évidence une corrélation négative entre la concentration plasmatique de cortisol et le nombre de lymphocytes T dans le sang. En effet, le nombre de lymphocytes T est à son maximum dans le sang en fin de nuit lorsque la concentration plasmatique du cortisol est à son minimum chez les humains. D'autres études ont démontré directement l'implication du cortisol dans le rythme de recirculation des lymphocytes. Ainsi Dimitrov *et al.*, ont mis en évidence que l'injection de prednisolone, un analogue synthétique du cortisol, chez les humains entraînait une diminution du nombre de lymphocytes T dans le sang⁴⁹⁸. Ces résultats ont également été observés chez les rongeurs^{499, 500}. En effet, le rythme du nombre de lymphocytes T dans le sang des souris était aboli après une ablation chirurgicale des glandes surrénales responsable de la sécrétion de

glucocorticoïdes, suggérant un rôle des NSC ou des horloges circadiennes des glandes surrénales dans le contrôle du rythme de la recirculation de ces cellules. Cohen *et al.*, ont également décrit chez la souris qu'en réponse au cortisol les lymphocytes T quittaient le sang et se relocalisaient dans la moelle osseuse⁴⁹⁹.

Une étude récente conduite chez la souris a mis en évidence que le nombre de lymphocytes T CD4 et le nombre de lymphocytes B variaient lors d'un cycle circadien dans le sang, la lymphe, et les ganglions lymphatiques drainants (ganglions axillaires, brachiaux, et inguinaux)⁵⁰¹. L'analyse du rythme du nombre de lymphocytes T CD8 n'ayant pas été réalisée par cette étude ne suggère pas qu'il n'existe pas. Les voies adrénurgiques seraient responsables de cette variation circadienne dans cette étude, puisque le rythme de recirculation de ces cellules dans le sang, la lymphe et les ganglions lymphatiques était aboli chez des souris déficientes pour le récepteur adrénurgique $\beta 2$ ainsi que dans le cas de souris traitées avec le 6 hydroxydopamine (6-OHDA) ayant pour rôle d'éliminer de manière pharmacologique les voies adrénurgiques. Cette étude suggère ainsi un rôle des NSC ou des horloges circadiennes des glandes adrénurgiques dans ce rythme de recirculation des cellules.

Une autre étude a mis en évidence le rôle des voies adrénurgiques dans le rythme de recrutement des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse ainsi que dans le rythme de recrutement de leucocytes dans les tissus squelettiques musculaires⁵⁰². En effet, l'élimination des voies adrénurgiques innervant les ganglions lymphatiques cervicaux ou inguinaux a permis de conclure un rôle essentiel de ces voies dans le recrutement de leucocytes dans les tissus périphériques.

L'ensemble de ces études suggèrent ainsi que l'horloge centrale ou les horloges circadiennes des glandes adrénurgiques contrôleraient ce rythme. Cependant, tout comme le développement des lymphocytes B, nous pouvons aussi spéculer que d'autres horloges contrôleraient les horloges circadiennes présentes dans les glandes adrénurgiques par exemple.

- Les facteurs chimiotactiques

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des facteurs chimiotactiques (chimiokines et récepteurs associés) et des facteurs de migration dans le rythme de recirculation des cellules immunitaires dans le sang. Ainsi, dans un premier temps l'expression rythmique de *Ccl2* par les cellules myéloïdes pourrait expliquer le rythme de circulation de ces cellules dans le

sang^{495, 503}. Dans un second temps, Scheiermann et *al.* ont montré un rythme des molécules impliquées dans la migration des cellules, telles que P-sélectine, E-sélectine, ICAM1, et VCAM à la surface des cellules endothéliales^{502, 504}. Ce même groupe de recherche a confirmé un rythme de l'expression de *Cxcr4*, récepteur de chimiokine impliqué dans le recrutement de leucocytes dans la moelle osseuse, mais également de lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires⁵⁰⁴. Le rythme d'expression de ce récepteur aux chimiokines avait été observé à la surface des lymphocytes T en réponse au rythme du cortisol plasmatique^{498, 505}, mais également à la surface des leucocytes de souris et d'humain en réponse aux dérivés réactifs de l'oxygène⁵⁰⁶. De plus Shimba et *al.* ont démontré dans un élégant système l'action des glucocorticoïdes sur l'expression rythmée de *Cxcr4* en réponse au rythme d'expression du récepteur pour l'interleukine 7 dans le recrutement des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires⁵⁰⁷.

Une autre récente étude a mis en évidence un rythme de l'expression du gène codant pour CCR7, impliqué dans le recrutement de lymphocytes T dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires, dans le contrôle du rythme de recirculation de ces cellules dans le sang, la lymphe, et les ganglions lymphatiques⁴⁹⁶.

- Autres

D'autres études ont démontré via l'usage de modèle de souris transgéniques le rôle extrinsèque de la recirculation des cellules du système immunitaire. En effet, la délétion du gène codant BMAL1 dans les cellules endothéliales entraîne une ablation du rythme de recirculation des leucocytes dans le sang et les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes^{502, 504}. Ainsi de manière non intrinsèque aux cellules en migration, les horloges circadiennes peuvent agir dans le rythme de recrutement et de recirculation de ces cellules.

Contrôle circadien de la réponse immunitaire innée

Réponses immunitaires aux molécules dérivées de microbes

Les cellules de la réponse immunitaire innée reconnaissent des motifs de pathogènes via des récepteurs de signaux de dangers, des PRR. Ainsi l'expression à la surface des cellules du

système immunitaire inné de certains de ces récepteurs, tels que TLR5, TLR9, TLR3, TLR4 et TLR8, est modulée par les horloges circadiennes^{4,5,6}.

Il est connu depuis 1960 que la susceptibilité des souris à un syndrome d'infection général (septicémie) induit par injection de lipopolysaccharide (LPS) varie en fonction du moment de la journée où la maladie est induite⁵⁰⁸. Ainsi, une étude récente de Spengler et *al.* a mis en évidence une différence jour/nuit (ZT6/ZT18) dans le niveau d'inflammation, et la mortalité des animaux plus importante en milieu de jour (ZT6) suite à l'induction d'une septicémie à des souris qu'en milieu de nuit (ZT18)⁴. De plus ce résultat corrèle avec l'intensité d'activation de la voie de signalisation NF- κ B qui est accentué à ZT6. Cette étude a démontré que la protéine des horloges circadiennes CLOCK interagissait avec la sous unité p65 de NF- κ B entraînant une augmentation transcriptionnelle de son activité et ainsi une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. De plus, Keller et *al.* ont mis en évidence que des macrophages de la rate collectés toutes les quatre heures puis stimulés *ex vivo* avec du LPS présentaient un rythme dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 et le TNF- α ⁴⁵². L'induction de septicémie via l'injection de LPS par voie intrapéritonéale à des souris en début de jour subjectif (CT0) ou en début de nuit subjective (CT12) montre également une différence jour/nuit, avec une exacerbation de l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires : l'IL6, l'IL12, codant pour les chimiokines : CCL5, CXCL1 et CCL2⁴⁹⁵. Cette étude démontre que l'usage de souris transgéniques n'exprimant pas le gène des horloges circadiennes *Bmal1* dans les cellules myéloïdes ne montre plus de différence jour/nuit dans la sécrétion de l'Il6 après induction de la septicémie suggérant que la variation circadienne de la réponse immunitaire suite à l'induction d'une septicémie est intrinsèque aux cellules myéloïdes. De plus, Keller et *al.* avait écarté le rôle des voies adrénérgiques dans le contrôle circadien de la réponse à une septicémie puisque les variations journalières persistaient chez des souris ayant subi une chirurgie d'ablation des glandes surrénales. Finalement, Curtis et *al.* ont également observé une accentuation de la mortalité, et du niveau inflammatoire des souris injectées avec le LPS en début de nuit (ZT12) par rapport à des souris injectées en début de jour (ZT0). Cette étude a mis en lumière que le micro ARN miR-155 ciblait BMAL1 et inhibait l'activité de NF- κ B. L'ensemble de ces études mettent en évidence le rôle des horloges circadiennes dans le contrôle de la réponse immunitaire à un choc septique. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du gène des horloges circadien *Rev-Erb α* . En effet, des souris déficientes pour ce gène ne présentent plus de différence jour/nuit dans l'expression de

l'IL6 suite à l'induction du choc septique et présentent également une augmentation de l'expression⁴⁹⁵. Des résultats similaires ont été trouvés chez l'humain, où l'expression de ce gène des horloges circadiennes dans les macrophages dérivés des monocytes été réduite via l'usage d'ARN interférant. À l'opposé, la surexpression de REV-ERB α a montré une diminution de la sécrétion de l'IL6 suite à une stimulation avec du LPS⁵⁰⁹. Une autre étude, menée sur la réponse inflammatoire suite à l'inhalation de LPS chez des souris de type sauvage a montré que cette réponse était rythmique dû à un rythme de recrutement des neutrophiles dans les poumons⁵¹⁰. Alors que le rythme de recrutement de ces cellules suite à l'exposition au LPS chez des souris déficientes pour le gène *Rev-Erb α* est aboli et est associé à une diminution de l'expression de l'IL6⁵¹¹. Dans leur ensemble, ces études tendent à démontrer que les variations circadiennes de la réponse immunitaire en réponse au LPS chez des souris sont contrôlées de manière intrinsèque aux cellules myéloïdes via l'action de protéines de horloges circadiennes (CLOCK, BMAL1 et REV-ERB).

Dans le cadre de la reconnaissance d'autres motifs de pathogènes tels que les îlots CpG (ADN), Silver et *al.* ont publié une étude sur le contrôle circadien de la réponse des macrophages⁵. Ainsi, le TLR9 reconnaît des motifs îlots CpG d'origines bactériennes et virales entraînant une réponse inflammatoire via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence une corrélation positive entre le niveau d'expression maximum de ce récepteur à la surface des macrophages, en milieu de nuit et la magnitude de la réponse lorsque les cellules sont stimulées avec des ligands de ce récepteur en milieu de nuit⁵. En effet, ils ont observé une augmentation de l'expression de la cytokine TNF α , de la chimiokine permettant le recrutement des monocytes et des macrophages au site inflammatoire : CCL2 ainsi que des molécules de costimulation CD80 et CD86.

Les TLR3 et TLR8 reconnaissent les ARN d'origine bactérienne et virale entraînant également une réponse pro-inflammatoire. Ces deux récepteurs sont exprimés de manière rythmique à la surface des macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer⁶. Dans le cas d'induction d'un syndrome d'infection général par ligation caecale chez la souris, le rythme circadien de la réponse observé est associé au rythme d'expression du *Tlr2* ainsi qu'à l'horloge des leucocytes⁵¹².

Réponses immunitaires à un microorganisme

Les horloges circadiennes contrôlent la réponse immunitaire impliquée dans différents types d'infections d'origine bactérienne, virale, et parasitaire.

- Infection de type bactérienne

Plusieurs études menées chez la souris ont montré un rôle des horloges circadiennes dans le contrôle de la magnitude de la réponse immunitaire en fonction du moment où les souris sont infectées avec des bactéries. En effet, des souris infectées avec la souche bactérienne *Diplococcus pneumoniae*, ou *Salmonella Typhimurium* ou *Listeria monocytogenes* entraînait une augmentation de la mortalité ou de la charge bactérienne dans les tissus étudiés lorsque les souris étaient infectées le jour par rapport à la nuit^{513, 514, 515}.

Dans le cas de l'étude du contrôle circadien de la réponse immunitaire des souris à *Salmonella Typhimurium*⁵¹⁵, l'augmentation de la mortalité des souris infectées le jour par rapport à la nuit était associée à une augmentation du nombre de CFU dans le côlon des souris ainsi qu'un score de la pathologie élevé (infiltration des monocytes, des cellules polynucléaires neutrophiles, érosion de la surface du côlon, etc.). Les auteurs ont également démontré une contribution des horloges circadiennes puisque le rythme de marqueurs liés à l'inflammation dans le côlon de ces souris était aboli dans des souris *Clock*^{Δ19/Δ19}.

Dans le cas de l'étude du contrôle de la réponse immunitaire des souris à *Listeria monocytogenes*⁵¹⁴, les auteurs ont observé un rythme de la recirculation des monocytes inflammatoires dans le sang et la rate avec un maximum en milieu de jour (ZT4-ZT8), ainsi qu'un rythme de recrutement de ces cellules dans le péritoine inflammé induit par injection de thioglycollate (modèle d'inflammation du péritoine), avec un maximum à ZT8 par rapport à ZT0 et ZT12. Les auteurs ont également mis en évidence, une augmentation de la mortalité des souris lorsqu'elles sont infectées avec la souche bactérienne *Listeria monocytogenes* à ZT8 par rapport à ZT0, associé à une augmentation des molécules liées à l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires, chimiokines) : IL1β, IL6, TNFα, IFNγ et CCL2 (chimiokine impliquée dans le recrutement des monocytes et des macrophages au site inflammatoire) dans le péritoine, et une augmentation de CCL2, IL1β, IL6, et IFNγ dans le sérum des souris infectées à ZT8 ainsi qu'à une augmentation du nombre de monocytes inflammatoires recrutés au site inflammé. De manière intéressante, l'oscillation de ces cellules était abolie dans les souris déficientes pour le gène des

horloges circadiennes *Bmal1* dans les cellules myéloïdes, suggérant un rôle intrinsèque à ces cellules dans le recrutement des cellules au site inflammatoire ainsi que dans le contrôle circadien de la réponse immunitaire à *Listeria monocytogenes*.

- Infection de type viral

D'autres études utilisant des modèles d'infection virale ont également montré un rôle des horloges circadiennes dans le contrôle de la magnitude de la réponse en fonction du temps où les souris sont infectées. Ainsi, Gadnidge et *al.* ont mis en évidence le rôle de la protéine des horloges circadiennes REV-ERB dans le contrôle d'une infection avec le virus de la stomatite vésiculaire (VSV)⁵¹⁶. Dans cette étude, les auteurs ont montré que des souris infectées par voies intranasales avec le VSV à ZT12 ont un meilleur taux de survie que des souris infectées à ZT0, ceci est associé à une augmentation de la chimiokine CCL2 à ZT0 ce qui pourrait expliquer l'exacerbation de l'inflammation à ZT0 et donc l'augmentation de la mortalité des souris lorsqu'elles sont infectées à ce moment de la journée.

Une deuxième étude a également mis en évidence le rôle des horloges circadiennes dans le contrôle de la réplication du virus de l'herpès. En effet, le rythme observé était aboli dans les souris déficientes pour le gène *Bmal1*⁵¹⁷.

- Infection de type parasitaire

Les infections parasitaires, telles que *Aspergillus fumigatus*, *Leishmania major*, et *Trichuris muri* sont également contrôlées par les horloges circadiennes^{518, 519, 520}. Ainsi les études de Kiessling et *al.* et de Hopwood et *al.* ont démontré un rôle intrinsèque des horloges circadiennes des cellules du système immunitaire^{519, 520} (les cellules myéloïdes dans le cas de l'étude de Kiessling et *al.* et les cellules dendritiques dans le cas de l'étude de Hopwood et *al.*)

Dans le cas des infections avec le parasite *Leishmania major*, l'étude de Kiessling et *al.* a mis en évidence que des souris infectées avec ce parasite au niveau du coussinet plantaire présentaient une augmentation du nombre de parasites au niveau du site d'infection ainsi que dans les ganglions lymphatiques proches du site d'infection (ganglion poplité) après une infection à CT15 par rapport à CT3⁵²⁰. Ceci est associé avec une augmentation du nombre de macrophages 3 heures post infection et une augmentation du nombre de cellules polynucléaires neutrophiles 6 heures post infection dans la cavité péritonéale des souris infectées à CT15 par rapport à CT3. Cette différence jour/nuit est contrôlée par les horloges circadiennes des cellules du système immunitaire,

autre que des lymphocytes T et des lymphocytes B, puisque des souris reconstituées avec une moelle osseuse de souris déficientes pour les gènes *Bmal1* et *Rag2* puis infectées à CT15 ou CT3 ne présentaient plus de rythme circadien de la charge parasitaire dans les cellules présentes dans le site d'infection (péritoine), et dans le recrutement de cellules polynucléaires neutrophiles et de macrophages.

Dans la deuxième étude, Hopwood *et al.* ont mis en évidence le rôle des horloges circadiennes des cellules dendritiques dans le contrôle de la magnitude de la réponse à une infection avec *Trichuris muris*⁵¹⁹. En effet, en fonction du moment de la journée où les souris sont infectées la cinétique d'expulsion du parasite et donc d'élimination de l'infection variait. Ainsi la charge parasitaire dans le côlon et le caecum des souris était plus importante après une infection à ZT12 par rapport à ZT0. De plus, l'analyse de marqueurs (IgG1 et IL13) associés à la réponse immunitaire induite par ce type d'infection, une réponse immunitaire impliquant les lymphocytes T CD4 *helper 2* (Th2) a permis de mettre en évidence une augmentation de ces marqueurs dans le sérum suite à une infection faite à ZT0. Les différences jour/nuit observées étaient abolies dans des souris déficientes pour le gène des horloges circadiennes *Bmal1* dans les cellules dendritiques, suggérant un rôle essentiel de l'horloge de ces cellules dans le contrôle de l'infection pour ce parasite. Le mécanisme par lequel l'horloge des cellules dendritiques agirait sur ce rythme de réponse n'est cependant pas clair.

Contrôle circadien de la réponse immunitaire adaptative

Le contrôle circadien de la réponse immunitaire adaptative via les lymphocytes T et les lymphocytes B a été observé dans différentes études conduites depuis quelques décennies⁵²¹. Trois études pionnières dans le domaine ont établi en 1976 qu'il existait un lien entre les rythmes circadiens et la réponse antigène spécifique^{522, 523, 524}. En effet, Eskola *et al.* ont mis en évidence un rythme de réponse des lymphocytes T dans une expérience de MLR plus important en fin de matinée, milieu de journée par rapport au reste de la journée chez l'humain⁵²³. Alors que Kaplan *et al.* ont mis en évidence que la réponse à une stimulation *in vitro* des cellules du sang de patient avec l'antigène streptokinase streptodornase était plus importante la nuit par rapport au reste de la journée⁵²⁴. Finalement la troisième étude publiée dans le domaine par Fernandes *et al.* a mis en évidence chez la souris, que la réponse des splénocytes à une immunisation avec des globules

rouges de moutons était exacerbée en fin de phase d'obscurité/début de phase lumineuse⁵²². Ainsi ces trois études ont contribué à l'observation d'un rythme de réponse immunitaire à un antigène. D'autres études ont ensuite été conduites, permettant d'analyser plus en détail la prolifération, la sécrétion de cytokines à une stimulation antigénique *in vitro* et *in vivo*.

Prolifération des lymphocytes en réponse à un antigène

Suite à la reconnaissance antigénique, les lymphocytes T vont enclencher un programme permettant leur activation, prolifération/expansion clonale, et leur sécrétion de cytokines. Il est admis chez l'humain que la concentration de cortisol plasmatique est à son minimum en milieu de nuit et est à son maximum le matin. Ainsi, une étude a montré que la prolifération des lymphocytes en réponse à la toxine tétanique était plus importante lorsque le niveau de concentration plasmatique du cortisol est à son plus bas la nuit⁵²⁵. Une autre étude a mis en évidence que dépendamment du moment où l'adjuvant de Freund est injecté en sous-cutané à des rats, cela entraînera une différence dans le niveau de prolifération des lymphocytes T^{526, 527}. Ainsi les cellules des ganglions lymphatiques restimulées avec de la Concanavalin A permettant de stimuler les lymphocytes T et d'entraîner leur prolifération est plus importante lors de la phase lumineuse que ce soit chez des jeunes ou des vieux rats. Cependant l'amplitude du rythme observé de prolifération des lymphocytes T CD8 chez les jeunes rats était diminuée chez les vieux rats. Ce qui n'est pas le cas pour les lymphocytes T CD4. Ces résultats suggèrent qu'il existe plusieurs facteurs impliqués dans le rythme de prolifération des lymphocytes T dont l'âge, et que cela peut jouer sur un sous-type de cellule en particulier. Nos laboratoires ont mis en évidence que la prolifération des lymphocytes T était dépendante des horloges circadiennes¹. En effet, des lymphocytes T CD4 et T CD8 de souris de type sauvage ont été collectés puis stimulés *ex vivo* avec un anti-CD3 et un anti-CD28. Ces cellules proliféraient plus en fin de phase lumineuse/début de phase d'obscurité par rapport au reste de la journée. De plus ce rythme observé était aboli chez des souris *Clock*^{Δ19/Δ19}, suggérant une contribution des horloges circadiennes dans le contrôle du rythme de prolifération des lymphocytes T.

Réponse des lymphocytes T suite à une stimulation antigénique in vitro ou ex vivo

Plusieurs études menées chez l'humain et la souris ont montré qu'il existait un lien entre les rythmes circadiens et la réponse des lymphocytes T et des lymphocytes B suite à une stimulation antigénique. Ainsi, chez l'humain la stimulation antigénique de cellules du sang avec de la toxine tétanique montre qu'il y a un nombre plus élevé de cellules qui produisent de l'IFN γ en début de nuit et de cellules qui produisent plus d'IL2 en milieu de nuit⁵²⁸. Une autre étude a mis en évidence un rythme du nombre de lymphocytes T CD4 IFN γ ⁺ et du nombre de lymphocytes T CD4 IL2⁺ après une stimulation des cellules du sang avec de la PMA ionomycine⁵²⁹. Lors de cette étude, le transcriptome des lymphocytes T CD4 IFN γ ⁺ a montré que le moment où il y avait une sécrétion augmentée d'IFN γ par ces cellules, il y avait un enrichissement en gènes impliqués dans la signalisation de la voie NF- κ B impliquée dans l'activation des lymphocytes T. Une autre étude menée par notre laboratoire chez des sujets humains simulant le travail de nuit a montré qu'il y avait un avancement de phase du rythme de sécrétion de l'IFN γ et de l'IL2 suite à une stimulation avec du PHA par rapport au même sujet humain étant placés dans une simulation de travail de jour⁵³⁰. Cependant, l'avancement de phase de ce rythme n'est pas associé à un rythme du nombre de lymphocytes T sécrétant ces cytokines ou au rythme de sécrétion de la mélatonine, marqueur de l'horloge centrale, puisque ces deux rythmes ne variaient pas que ce soit des sujets ayant été dans un cycle de travailleur de nuit versus un cycle de travailleur de jour. Ces résultats suggèrent que le rythme du nombre des lymphocytes T dans le sang pourrait être contrôlé par l'horloge centrale ce qui ne serait pas le cas du rythme de sécrétion des cytokines en réponse à une stimulation antigénique. Ainsi, ces études permettent de mettre en évidence la contribution de plusieurs horloges circadiennes dans le contrôle de la réponse immunitaire.

Réponse des lymphocytes T suite à une stimulation antigénique in vivo

Plusieurs études publiées dans les 10 dernières années ont permis de faire avancer la recherche dans la compréhension du rôle des rythmes circadiens dans la réponse immunitaire adaptative. Les travaux publiés par notre laboratoire en 2011 ont mis en évidence une différence jour/nuit dans la réponse des lymphocytes T CD8 suite à une vaccination faite avec des cellules dendritiques chargées avec le peptide de l'ovalbumine, OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) (DC-OVA)¹. En

effet, des souris de type sauvage ont été vaccinées avec des DC-OVA à ZT6 ou à ZT18 et l'analyse de l'expansion clonale des lymphocytes T CD8 spécifique pour le complexe K^bOVA a été déterminé 7 jours post vaccination où la réponse immunitaire dans le contexte de ce type de vaccination est à son maximum. En parallèle les splénocytes de ces souris vaccinées ont été restimulés *ex vivo* avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ dans le but d'analyser les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8, le pourcentage de cellules sécrétant de l'IFN γ . Dans cette étude nos laboratoires ont mis en évidence que l'expansion clonale ainsi que le pourcentage de lymphocytes T CD8 CD44^{hi} IFN γ ⁺ étaient plus importants après une vaccination faite à ZT6 par rapport à ZT18. D'autres études de recherche ont suivi et ont commencé à déterminer les mécanismes moléculaires possibles de ce rythme de réponse immunitaire adaptative.

Ainsi Hemmers et *al.* ont statué une absence du rôle des horloges des lymphocytes T dans le rythme de réponse de ces cellules à une infection avec *Listeria monocytogenes*⁵³¹. En effet, dans leur étude ils ont mis en évidence que ce soit chez des souris de type sauvage ou déficientes pour le gène *Bmall* dans les lymphocytes T, un rythme du pourcentage de lymphocytes T CD4 IL2⁺ et de lymphocytes T CD8 IL2⁺, suggérant que l'horloge des lymphocytes T n'est pas impliquée dans ce rythme de réponse.

Suzuki et *al.*, Druzd et *al.* ainsi que Shimba et *al.* ont mis en évidence que le rythme de la réponse des lymphocytes B et des lymphocytes T respectivement dépendait du nombre de ces cellules dans les organes lymphoïdes secondaires au moment où la stimulation antigénique est induite (ganglions lymphatiques dans ces deux études)^{496, 501, 507}.

Ainsi, dans l'étude de Suzuki et *al.* les auteurs ont immunisé les souris à ZT5 (moment où il y a le moins de lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques) ou ZT17 (moment où il y a le plus de lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques) dans les oreilles avec du NP-CGG permettant de stimuler la réponse humorale, et donc la réponse des lymphocytes B⁵⁰¹. Les auteurs ont observé une production d'IgM et IgG1 ainsi qu'une expansion clonale des lymphocytes B ayant répondu à la stimulation antigénique plus importante suite à l'immunisation faite à ZT17 par rapport à ZT5. L'ablation des voies adrénérergiques via l'usage de molécule telle que le 6-OHDA, a permis d'observer une abolition de rythme du nombre de lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques ainsi qu'une abolition du rythme de réponse de ces cellules suite à l'immunisation avec le NP-CGG. Ces résultats suggèrent que les voies adrénérergiques contrôlent le rythme de la

recirculation des lymphocytes B d'une part et que cela à des conséquences fonctionnelles d'une autre part, puisque le moment où le nombre de cellules est son maximum correspond au moment où la réponse suite à une stimulation antigénique est plus importante.

Druzd et *al.* ont montré des résultats similaires à cette étude, mais dans un contexte de stimulation antigénique de la réponse des lymphocytes T⁴⁹⁶. Dans leur étude les auteurs ont utilisé de modèle murin de la sclérose en plaques (EAE, Experimental autoimmune encephalomyelitis), en immunisant des souris avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) à ZT8 (moment où il y a le moins de lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques) ou ZT20 (moment où il y a le plus de lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques). L'analyse du score de la maladie ainsi que le niveau de démyélinisation de la moelle épinière au niveau de la région lombaire des souris a montré une exacerbation de la maladie lorsque les souris ont été vaccinées à ZT8 par rapport à ZT20. De plus, ce rythme de réponse est aboli chez des souris déficientes pour le gène *Bmall* dans les lymphocytes T. Ces résultats suggèrent que l'horloge intrinsèque des lymphocytes T contrôle le rythme de la recirculation des lymphocytes T d'une part et que cela à des conséquences fonctionnelles d'autre part, puisque le moment où le nombre de cellules est son maximum correspond au moment où la réponse suite à une stimulation antigénique est plus importante.

La troisième étude publiée très récemment en 2018 par Shimba et *al.* a identifié un autre mécanisme dans la recirculation des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires⁵⁰⁷. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des souris déficientes pour le gène codant pour le récepteur pour les glucocorticoïdes (GR) dans les lymphocytes T pour démontrer qu'en absence de l'expression de ce gène dans les lymphocytes T, l'oscillation de ces cellules est abolie. De plus, tout comme les deux précédentes études, les auteurs ont démontré que le moment où il a le plus de lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires correspond au moment où la réponse est la plus forte à une stimulation antigénique. En effet, des souris de type sauvage ont été infectées avec la souche bactérienne de la *Listeria monocytogenes*-OVA à ZT4 (moment où il y a le moins de lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques) ou à ZT16 (moment où il y a le plus de lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques) et ont observé que l'expansion des lymphocytes T CD8 spécifique pour le complexe K^bOVA était plus importante après infection à ZT16 par rapport à ZT4. Cette différence jour/nuit était abolie dans les souris déficientes pour les GR dans les lymphocytes T. Ainsi cette troisième étude contribue à la compréhension des mécanismes

moléculaires impliqués dans le rythme de recirculation des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires, le sang, et la lymphe et donc la contribution de ce rythme dans le rythme de réponse de ces cellules suite à une stimulation antigénique.

Les trois études présentées ci-dessus posent des conclusions similaires expliquant pourquoi le système immunitaire adaptatif va être enclin à répondre de manière plus efficace à un moment donné de la journée par rapport à un autre : le rythme de recirculation des lymphocytes T et des lymphocytes B dans le sang, la lymphe et les ganglions lymphatiques. Cependant les mécanismes moléculaires décrits dans ces trois études par lesquels ce rythme de recirculation des cellules est possible sont différents. Ainsi, l'ensemble des résultats de ces deux études nous montre la complexité du contrôle circadien de la réponse immunitaire adaptative.

Chapitre 2 – Raisonnement et hypothèse

Les rythmes circadiens permettent d'anticiper tout changement de l'environnement dans le but de permettre à l'organisme de maintenir un équilibre homéostatique. Ainsi les rythmes circadiens contrôlent de nombreux aspects de la physiologie du vivant, incluant la réponse immunitaire innée et adaptative. Trois études ont ouvert le chemin dans l'observation du contrôle circadien de la réponse immunitaire adaptative en 1976^{522, 523, 524}. Depuis, plusieurs groupes de recherches ont développé des outils et mis en place des protocoles expérimentaux permettant de comprendre le rôle des horloges circadiennes dans cette réponse immunitaire antigène spécifique médiée entre autres par les lymphocytes T.

Il a été reconnu récemment par l'organisme mondial de la santé que le travail de nuit connu pour altérer les rythmes circadiens était un facteur de risque dans le développement de cancers. Ainsi il est essentiel d'essayer de comprendre comment les horloges circadiennes contrôlent la réponse immunitaire dans un but de mettre en place des thérapies permettant d'améliorer les effets de molécules déjà existantes, mais également dans le but de diminuer les effets secondaires.

Aux laboratoires, Erin E. Fortier et *al.* ont mis en évidence un rythme diurne de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique par des cellules dendritiques¹. Des souris C57BL/6J vaccinées avec des DC-OVA à ZT6 présentaient une meilleure expansion des lymphocytes T CD8 dont le TCR est spécifique au complexe K^bOVA par rapport à un groupe de souris vacciné à ZT18¹. De plus lorsque les souris vaccinées à ZT6 étaient sacrifiées 7 jours post vaccination à ZT18 et inversement lorsque les souris étaient vaccinées à ZT18, mais sacrifiées à ZT6 les résultats étaient identiques, soit une meilleure expansion des lymphocytes T CD8 suite à une vaccination faite à ZT6, suggérant que cette différence jour/nuit prend place très tôt dans l'activation des lymphocytes T CD8 par les cellules dendritiques.

L'hypothèse de recherche de cette thèse de doctorat est qu'une horloge circadienne contrôle la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique, et que l'horloge responsable est celle des lymphocytes T CD8. Ainsi les objectifs de ma thèse de doctorat étaient les suivants :

- Déterminer la nature du rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique par des cellules dendritiques. En effet, les travaux de nos laboratoires ont

été réalisés dans un cycle LD ne permettant pas de conclure à un rythme circadien et donc à un rythme initié par les horloges circadiennes.

- Identifier la ou les horloge(s) circadienne(s) responsables de ce rythme.
- Identifier le/les mécanisme(s) moléculaire(s) sous-jacent(s) à ce rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique par des cellules dendritiques.

Chapitre 3 – Matériels et méthodes

1. Souris

Les souris C57BL/6J (numéro de catalogue 000664)⁵³², *Bmal1*^{ff} (fond génétique C57BL/6J, numéro de catalogue 007668)³⁶¹, PER2::LUC (fond génétique C57BL/6J, numéro de catalogue 006852)³⁷³ et B6.SJL-*Ptprc*^a *Pepc*^b/BoyJ (numéro de catalogue 002014)⁵³³ ont été achetées chez *Jackson Laboratory*. Les souris OT-I *Rag2*^{-/-}^{534, 535} (fond génétique C57BL/6N, numéro de catalogue 2334-F et 2334-M) ont été achetées chez *Taconic*. Les souris *E8I-Cre*^{+/-536} (fond génétique C57BL/6N) ont été obtenues du laboratoire du Dr Michel Tremblay (Centre de recherche sur le cancer Rosalind et Morris Goodman, Université McGill). Les souris *Bmal1*^{+/-440} (fond génétique C57BL/6J) ont été obtenues du laboratoire du Dr Kai-Florian Storch (Centre de recherche de l'institut en santé mentale Douglas, Université McGill) et croisées dans le but d'obtenir des souris *Bmal1*^{+/+} et *Bmal1*^{-/-}. Les souris (C57BL/6J X B6.SJL)_{F1} (CD45.1/CD45.2) ont été obtenues par le laboratoire du Dre Simona Stäger (INRS, Institut national de la recherche scientifique Armand Frappier). Les souris *Bmal1*^{ff} et *E8I-Cre*^{+/-} ont été croisées dans le but d'obtenir des souris *E8I-Cre*^{+/-} *Bmal1*^{ff} (souris déficiente pour le gène *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 matures, Δ/Δ) et des souris *E8I-Cre*^{-/-} *Bmal1*^{ff} (souris suffisante pour le gène *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 matures, f/f). L'ensemble des colonies de souris ont été maintenues à l'animalerie du Centre de recherche de l'institut universitaire en santé mentale Douglas. Toutes les expériences menées sur les souris ont été conduites au Centre de recherche de l'institut universitaire en santé mentale Douglas. L'utilisation des souris a été approuvée par le comité d'éthique du Centre de recherche de l'institut universitaire en santé mentale Douglas et est en accord avec le conseil canadien de protection des animaux.

2. Cytométrie en flux

Le détail des anticorps et réactifs utilisés sont dans le tableau ci-dessous (Tableau 1). Les expériences ont été réalisées soit avec un FACSCalibur (BD Biosciences) au Centre de recherche de l'institut universitaire en santé mentale Douglas, un LSR II Fortessa, LSR II ou FACSCanto (BD

Biosciences) au Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont et les analyses ont été réalisées avec le logiciel FlowJo (version 9.3.2).

L'ensemble des marquages de surface des cellules a été réalisé à 4°C pendant 20 minutes dans une solution de marquage FACS maison (recette pour 1L : 10 g de DMEM sans rouge phénol, 30 ml d'HEPES 1M, 30 ml de sérum de cheval, 10 ml de solution de sodium azide à 10%, complété jusqu'à obtention d'un litre de solution avec de l'eau déionisée) à l'exception du marquage avec le tétramère K^bOVA qui a été réalisé à 37°C pendant 15 minutes. Le tétramère K^bOVA a été tétramérisé aux laboratoires (Centre de recherche de l'institut universitaire de santé mentale Douglas ou Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont) à partir des monomères fournis par le laboratoire du Dr Alain Lamarre. Ainsi, 250 µg de monomères ont été incubés toute la nuit sous agitation faible à 4°C avec 80 µl total de streptavidine couplé avec le fluorochrome phycoérythrine (PE), ajouté à coup de 5 µl toutes les 5 minutes. Le tétramère a ensuite été filtré dans une colonne amicon® Ultra 0.5 ml (UFC510024) le lendemain matin puis testé sur un mix de splénocytes issus de souris OT1 *Rag2*^{-/-} et issus de souris C57BL/6J (ratio 10:90), suivi d'un marquage de surface classique réalisé à 4°C pendant 20 minutes avec les anticorps anti-CD8 et anti-CD44 puis lavés avec la solution de marquage FACS avant d'être analysés par cytométrie en flux.

Les marquages intracellulaires, tels que l'IFN γ ont été réalisés sur des cellules préalablement fixées avec de la paraformaldéhyde (PFA) 2%. Les cellules ont été perméabilisées avec une solution de perméabilisation (0.5% saponine dans une solution de marquage pour le FACS faites maison) pendant 10 minutes puis lavées avec la solution de perméabilisation avant d'être marquées avec l'anticorps anti-IFN γ pendant 30 minutes à température pièce. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec la solution de perméabilisation suivie d'un lavage avec la solution de marquage FACS avant d'être marquées avec des anticorps anti-CD8, et anti-CD44 pendant 20 minutes à 4°C puis lavées avec la solution de marquage FACS avant d'être analysés par cytométrie en flux.

Les marquages intracellulaires, tels que les facteurs de transcription (ex : IRF4, T-bet) ont été réalisés sur des cellules fixées puis perméabilisées avec le kit FoxP3 (eBioscience™, numéro de catalogue : 00-5523-00). Les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-IRF4 et anti-Tbet pendant 30 minutes à 4°C puis lavées une fois avec la solution de perméabilisation du kit et lavées

une fois avec la solution de marquage FACS. Les cellules ont ensuite été marquées pour les marqueurs de surface pendant 20 minutes à 4°C puis lavées avec la solution de marquage FACS avant d’être analysés par cytométrie en flux.

Les marquages intracellulaires, tels qu’effectués pour les protéines phosphorylées (pS6 et pAKT) ont été réalisés sur des cellules fixées puis perméabilisées avec la trousse BD Cytofix/Cytoperm™ (BD Bioscience, numéro de catalogue : 10574475). Les splénocytes ont été incubées 30 minutes à 37°C dans un milieu appauvri en facteurs de croissance (milieu RPMI 1640 1% FBS), suivi d’une restimulation de 30 minutes avec 2 µg/ml de peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ dans du milieu RPMI 1640 complet 10% FBS. Les cellules ont ensuite été marquées pour les marqueurs de surface CD8, CD45.1, et CD45.2 pendant 20 minutes à 4°C, puis ont été lavées avec la solution de marquage FACS puis fixées avec la trousse de fixation/perméabilisation de la compagnie BD Biosciences (#554714). Les cellules ont ensuite été lavées avec la solution de perméabilisation de la trousse suivi du marquage des protéines phosphorylées S6 (sérine 235 et 236) et AKT (sérine 473) pendant 30 minutes à 4°C puis lavées avec la solution de marquage FACS avant d’être analysés par cytométrie en flux.

L’analyse de l’apoptose a été réalisée via un marquage Annexin V et 7-AAD. Les cellules ont été préalablement marquées pour les marqueurs de surface pendant 20 minutes à 4°C, puis lavées avec la solution de marquage FACS. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS 1X puis lavées avec du *binding buffer* (recette pour 50 ml : 250 µl de CaCl₂ 0.5M, 1.4 ml de NaCl 5M, 0.5 ml HEPES 1M, complétée jusqu’à obtention de 50 ml avec de l’eau déionisée). Les cellules ont ensuite été suspendues avec la solution de binding buffer et l’Annexin V et le 7-AAD puis directement analysées par cytométrie en flux.

Produit	Clone	Fluorochrome	Fournisseur	Expérience
CD8a	5.3-6.7	PeCy7	Biolegend	Chimères et stimulation <i>ex vivo</i>
CD8a	5.3-6.7	PerCP	Biolegend	Tous sauf les chimères et les stimulations <i>ex vivo</i>

Produit	Clone	Fluorochrome	Fournisseur	Expérience
CD44	IM7	APC	Biolegend	Tous sauf les chimères et les stimulations <i>ex vivo</i>
CD44	IM7	APC Fire	Biolegend	Chimères et stimulation <i>ex vivo</i>
CD44	IM7	FITC	Biolegend	Tous sauf les chimères et les stimulations <i>ex vivo</i>
IFN γ	XMG1.2	FITC	Biolegend	Toutes les manips IFN γ
IFN γ	XMG1.2	APC	Biolegend	Toutes les manips IFN γ
V β 5.1/5.2	MR9-4	FITC	Biolegend	Toutes les manips V β
V β 17	KG23	FITC	Biolegend	Toutes les manips V β 2.1
CD45.1	A20	BV421	Biolegend	Chimères et stimulation <i>ex vivo</i>
CD45.1	A20	FITC	Biolegend	Chimères
CD45.2	104	PE	Biolegend	Chimères et migration des cellules dendritiques
CD45.2	104	AF700	Biolegend	Chimères
CD62L	MIL-14	BV421	Biolegend	Chimères
IRF4		PE	Biolegend	Chimères

Produit	Clone	Fluorochrome	Fournisseur	Expérience
CD69	H1.2F3	APC	Biolegend	Chimères
CD5	53-7.3	PerCP	Biolegend	Chimères
CD98	RL388	AF647	Biolegend	Chimères
CD71	RI7217	BV421	Biolegend	Chimères
I-A ^b	AF6-120.1	FITC	Biolegend	Marquage des cellules dendritiques
CD86	GL-1	PE	Biolegend	Marquage des cellules dendritiques
CD11c	N418	APC	Biolegend	Marquage des cellules dendritiques
K ^b	AF6-88.5	Biotin	Biolegend	Marquage des cellules dendritiques
Streptavidin		PerCP	Biolegend	Marquage des cellules dendritiques
K ^b OVA	25-D1.16		Maison	Marquage des cellules dendritiques
IgG-I	RMG1-1	PE	Biolegend	Marquage des cellules dendritiques (2 nd K ^b -OVA)
Annexin V		FITC	Biolegend	Marquage apoptose
7-AAD			Biolegend	Marquage apoptose

Produit	Clone	Fluorochrome	Fournisseur	Expérience
pS6 (Ser235/236)	cupk43k	PE	eBioscience	Chimères et stimulation <i>ex</i> <i>vivo</i>
pAKT (Ser473)	SDRNR	APC	eBioscience	Chimères et stimulation <i>ex</i> <i>vivo</i>
TetOVA		PE	Maison	Marquage expansion
CFSE			Biolegend	Migration des cellules dendritiques

Tableau 2. – Anticorps et réactifs utilisés en cytométrie en flux.

3. Vaccination DC-OVA/DC-LPS

Les cellules de la moelle osseuse ont été cultivées en plaque 6 puits avec du milieu RPMI 1640 complet 10% FBS supplémenté avec 500 U/ml de GM-CSF (Invitrogen) et 250 µl d'IL4 (surnageant de cellules P-815IL4, fait maison) à jour 0, 2, 3, et 6 jusqu'à l'obtention de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC). La maturation des BMDC a été induite avec 1 µg/ml de lipopolysaccharide (LPS) (Millipore Sigma) à jour 6 suivie d'une incubation toute la nuit avec 2 µg/ml de peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL, Midwest, Biotech). Les cellules non adhérentes ont été collectées à jour 7 et isolées par gradient de densité (Histodenz 14.7%). Le niveau d'activation des BMDC a été confirmé par cytométrie en flux en utilisant les anticorps anti-I-A^b, anti-CD86, anti-K^b, et anti-CD11c. Le niveau de chargement des BMDC avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ a été analysé selon l'expression du marqueur K^bOVA (anticorps maison)⁵³⁷. Les souris ont été entraînées dans un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité (cycle LD) pour un minimum de 2 semaines puis placées dans un environnement constant sans lumière (cycle DD) pendant 3 jours. Lors du deuxième jour en DD, les souris ont été vaccinées par voie intraveineuse avec 1.25 millions

de BMDC chargées avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (DC-OVA) ou 1.25 millions de BMDC non chargées avec le peptide (contrôle négatif, DC-LPS). Les vaccinations ont été réalisées en présence de lumière rouge de faible longueur d'onde aux temps circadiens d'injection indiquée (CT, CT0 correspond au moment où la lumière est censée s'allumer et CT12 correspond au moment où la lumière est censée s'éteindre en fonction du cycle LD où les souris ont été placées précédemment). Selon l'expérience, le premier temps d'injection a varié, dans le but de contrôler un effet de l'ordre de la vaccination. Les résultats obtenus sont identiques indépendamment de l'ordre du temps d'injection. Après le troisième jour en DD, les souris ont été replacées dans leur cycle LD initial jusqu'à la fin de l'expérience.

Les rates ont ensuite été prélevées 7 jours post vaccination DC-OVA ou DC-LPS au temps correspondant au temps de vaccination. Les rates ont été dissociées mécaniquement avec deux lames de verre dépolie puis resuspendues dans du milieu RPMI 1640 complet 10% FBS. Les splénocytes ont été marqués avec un tétramère K^bOVA suivi d'un marquage pour les marqueurs CD8 et CD44 avant d'être analysés par cytométrie en flux. Dans certaines expériences, les anticorps anti-Vβ5 ou anti-Vβ17 (contrôle négatif) ont été ajoutés aux marquages de surface. En parallèle, les splénocytes ont été restimulés *ex vivo* pendant 6 heures avec 2 µg/ml de peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ et 10 µg/ml de brefeldin A, puis fixées avec de la paraformaldéhyde (PFA) 2% et conservées à 4°C. Les cellules ont été ensuite perméabilisées puis marquées avec l'anticorps anti-IFNγ suivi d'un marquage de surface avec des anticorps anti-CD8, et anti-CD44 avant d'être analysées par cytométrie en flux.

4. Bioluminescence des BMDC

Des BMDC ont été préparées à partir de moelle osseuse (protocole identique à celui décrit dans la section 3. Vaccination DC-OVA/DC-LPS) de souris PER2::Luciférase³⁷³. Les horloges circadiennes des BMDC ont été synchronisées avec un choc de sérum (50% RPMI 1640 et 50% sérum de cheval) pendant 1 heure à 37°C, puis ont été lavées avec du milieu RPMI 1640 complet, 10% FBS. Ensuite le milieu a été remplacé par un milieu RPMI 1640 (sans rouge phénol), 10% FBS supplémenté avec 100 U/ml de pénicilline/streptomycine et 0.1 mM de luciférine. La bioluminescence a ensuite été enregistrée avec un *Lumicycle 32* (Actimetrics).

5. Bioluminescence des lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T CD8 de rate de souris PER2:: luciférase ont été isolés avec la trousse de tri positif CD8 EasySep™ (STEMCELL technologies, catalogue #18953). La pureté de l'isolation des lymphocytes T CD8 (95%) a été confirmée par cytométrie en flux. Les cellules ont été remises en culture avec du milieu RPMI 1640 complet 10% FBS supplémenté avec 1 ng/ml d'interleukine 7 (IL-7) pendant 24 heures à 37°C. Les horloges circadiennes des lymphocytes T CD8 ont été synchronisées avec un choc de sérum (50% RPMI 1640 et 50% sérum de cheval) pendant 1 heure à 37°C, puis ont été lavées avec du milieu RPMI 1640 complet 10% FBS. Ensuite le milieu a été remplacé par un milieu RPMI 1640 complet (sans rouge phénol) 10% FBS supplémenté avec 1ng/ml d'IL-7 et 0.1 mM de luciférine. La bioluminescence a ensuite été enregistrée avec un *Lumicycle 32* (Actimetrics).

6. Transcription inverse, PCR quantitative et transfert de protéines

La rate, le foie et le thymus des souris *E8I-Cre Bmall*flox (souris f/f et souris Δ/Δ) ont été collectés. Les lymphocytes T CD8 suivis des lymphocytes T CD4 ont été isolés avec le kit de tri positif CD8 EasySep™ et le kit de tri positif CD4 EasySep™ (STEMCELL technologies, #18953 et #18952 respectivement). Les splénocytes restants ont été considérés comme des cellules CD4⁺CD8⁻. L'extraction des ARN totaux des lymphocytes T CD8 a été réalisée avec un protocole standard utilisant 1 ml de TRIzol (Thermofisher, numéro de catalogue 15596018). Les ARN totaux ont ensuite été transcrits en ADNc en utilisant le kit *High Capacity cDNA Reverse transcription kit* (Applied Biosystems), suivi d'une quantification par PCR quantitative de l'expression des gènes *Bmall* (gène cible) et *Efla* (gène contrôle) (QuantStudio 6 PCR System, Applied Biosystems) utilisant la solution GoTaq qPCR (Promega) ainsi que les oligos suivants : *Bmall* (gène cible) oligo sens : CCTAATTCTCAGGGCAGCAGAT, *Bmall* (gène cible) oligo anti sens : TCCAGTCTTGGCATCAATGAGT, *Efla* (gène contrôle) oligo sens : TGCCCCAGGACACAGAGACTTCA, *Efla* (gène contrôle) oligo anti sens : AATTCACCAACACCAGCAGCAA. L'analyse du changement d'expression de *Bmall* dans les

cellules issues de souris Δ/Δ par rapport aux cellules issues de souris f/f a été déterminé via la méthode : $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Les protéines ont été extraites des lymphocytes T CD8, lymphocytes T CD4, cellules CD4⁺CD8⁻, rate, foie et thymus avec une solution de RIPA (composition: 0,3% NaCl 5M, 0,1% NP-40, 0,5% sodium deoxycholate 10%, 0,1% SDS 10%, 50% TRIS 100mM pH 8.0, 0,1% PMSF 100mM (doit l'ajouter au dernier moment, car réactif instable), 0,02% EDTA 500mM, 1 tablette d'inhibiteurs de protéases (Roche, numéro de catalogue 11836153001), qsp 100% eau déionisée et quantifiées avec un test de Bradford (BioRad, numéro de catalogue 5000201). Les anticorps utilisés pour le transfert de protéine sont les suivants : anti-BMAL1 (Novus Biologicals, NB100-2288), HRP anti-lapin IgG (secondaire pour BMAL1; Millipore Sigma, A9044), anti-Actine (Millipore Sigma, A5441), HRP anti-souris IgG (secondaire pour Actine; Cedarlane, 111-035-144).

7. Test de migration des BMDC *in vivo*

Dix millions de BMDC de souris *Bmal1*^{+/+} ou de souris *Bmal1*^{-/-} ont été marquées avec 5 μ M de CFSE puis injectées par voie intraveineuse dans des souris congéniques receveuses pour le locus CD45, B6.SJL-*Ptprc*^a *Pepc*^b/BoyJ à CT6. Quatre heures post vaccination, la rate des souris a été prélevée dans le but de déterminer la quantité de BMDC qui a migré dans le tissu. Les rates ont été digérées avec 440 U/ml de collagénase D dans du milieu RPMI 1640 complet 10% FBS pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules ont été collectées puis lavées dans du milieu RPMI 1640 complet 10% FBS et marquées avec un anticorps anti-CD11c et un anticorps anti-CD45.2 puis analysées par cytométrie en flux.

Lors des expériences déterminant la migration des BMDC dans les souris *E8I-Cre Bmal1*-flox (souris f/f et Δ/Δ), des BMDC des souris congéniques pour le locus CD45 (B6.SJL-*Ptprc*^a *Pepc*^b/BoyJ) ont été utilisés. Les marquages réalisés ont donc nécessité des anticorps anti-CD11c et CD45.1.

8. Séquençage des ARN

Des souris C57BL/6J ont été entraînées pendant trois semaines dans un cycle LD puis placées dans un cycle DD pendant trois jours. Les ganglions lymphatiques drainants (brachiaux, axillaires, et inguinaux) de six souris par temps circadien (CT) ont été prélevés toutes les 4 heures (premier temps circadien CT2) à partir du deuxième jour en DD pendant 48 heures. Pour chaque temps circadien, les ganglions lymphatiques des 6 souris ont été regroupés pour isoler les lymphocytes T CD8 à l'aide du kit de tri positif CD8 EasySep™ (STEMCELL technologies, #18953). La pureté de l'isolation des lymphocytes T CD8 a été vérifiée par cytométrie en flux (>97%) avant extraction des ARN totaux en TRIzol. Une étape de nettoyage des ARN a été ajoutée à l'aide de colonnes (RNeasy MinElute Cleanup kit, Qiagen). Le séquençage d'ARN a été réalisé par la plateforme d'analyse génomique de l'Institut de recherche en immunologie et en cancer (IRIC Montréal, Université de Montréal). L'intégrité des ARN (RIN >8) a été testée avec un *Bioanalyzer Nano*. Des lames NextSeq High Output 2x75 pb ont été utilisées pour le séquençage des ARN avec un couvrage de 67 millions de lecture *paired end*. Dans le but de réduire le bruit de fond dû au faible niveau d'expression de certains gènes, seulement les transcrits codants des protéines avec un niveau FPKM > 0 ont été retenus pour l'analyse (n = 13 251 transcrits). Les résultats ont été déposés dans la base de données Gene Expression Omnibus (numéro d'accèsion : GSE128995)

Les résultats ont été analysés avec la version v3.5.1 du logiciel R. Le logiciel RAIN (Rhythmicity Analysis Incorporating Nonparametric methods)⁵³⁸ (Thaben and Westermarck 2014) a été utilisé pour déterminer la rythmicité des transcrits codants des protéines. Les p-value ont été corrigés pour éliminer les faux positifs avec le test statistique Benjamini-Hochberg (FDR < 0.1 considère les transcrits codants pour des protéines rythmiques). Les analyses cosinor⁵³⁹ ont été utilisées pour déterminer la phase des gènes rythmiques avec la formule suivante :

$$y_{jk} = a_k + b_k * \cos\left(\frac{2\pi * t_j}{24}\right) + c_k * \sin\left(\frac{2\pi * t_j}{24}\right) + \varepsilon_{jk}$$

Dans ce modèle, y_{jk} correspond au niveau d'expression du gène k à un temps donné j , a_k correspond à l'expression moyenne (mesor), b_k et c_k correspondent aux coefficients cosinor, t_j correspond au temps après que la lumière soit éteinte à un temps donné j (en heure), et ε_{ijk} correspond à la variabilité résiduelle. Le coefficient cosinor b_k et c_k ont été utilisés pour déterminer la phase et l'amplitude de chaque transcrit, décrit par Refinetti *et al.* ⁵⁴⁰.

L'enrichissement des processus biologiques dans la liste des gènes rythmés a été déterminé via la plateforme WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt) en utilisant les réglages par défaut et en comparant avec une liste de gène codant des protéines⁵⁴¹. Les analyses de voies de signalisations en amont et en aval des gènes rythmés ont été déterminées via la plateforme GenExplain. Pour ce faire, la liste des transcrits rythmiques pour chaque phase (CT2, 6, 10, 14, 18, et 22) ont été analysée via la plateforme GenExplain en utilisant les paramètres reliés à la réponse immunitaire chez la souris, ainsi qu'en utilisant la librairie TRANSFAC[®] (position du promoteur -1000 à +100) et les bases de données TRANSPATH[®] (<http://genexplain.com>). Pour les analyses de régulateurs en amont, nous avons utilisé la section Common Effector de TRANSPATH, et pour l'analyse des régulateurs en aval nous avons utilisé la section Enriched Upstream Analysis de TRANSFAC et TRANSPATH.

9. Chimères hématopoïétiques

Des souris receveuses B6.SJL-*Ptprc^a Pepc^b*/BoyJ ont reçu une dose létale d'irradiation (900 rad, RAD SOURCE Technologies 2000) dans le but de détruire les cellules hématopoïétiques. Ces souris ont été traitées avec un antibiotique délivré dans l'eau (Baytril, Bayer Healthcare) 3 jours avant puis pendant 3 semaines après l'irradiation. Immédiatement après l'irradiation, les souris ont été injectées avec 5 millions de cellules de moelle osseuse (1% OT-I Rag2^{-/-} (CD45.2) et 99% (C57BL/6J X B6.SJL)_{F1} (CD45.1/CD45.2)). La reconstitution de la moelle osseuse a été analysée 6 semaines post irradiation via un marquage nécessitant les anticorps anti-CD45.1, anti-CD45.2, anti-CD8 et anti-CD44 à partir de cellules périphériques mononucléaires (PBMC) isolées par Ficoll sur une goutte de sang collectée au niveau de la veine mandibulaire. Les souris ont ensuite été vaccinées à CT6 ou CT18 (Protocole décrit dans la section *Vaccination DC-OVA/DC-LPS*). Trois jours post vaccination, dans le but d'analyser la réponse précoce des lymphocytes T CD8 à la

vaccination, les souris ont été sacrifiées, et les rates ont été collectées. Les splénocytes ont été marqués pour divers marqueurs puis analysés par cytométrie en flux. Les lymphocytes T CD8 dont le TCR est spécifique au complexe K^bOVA ont été marqués en utilisant les anticorps anti-CD8, anti-CD45.1 et anti-CD45.2 (lymphocytes T CD8⁺ CD45.1⁻ CD45.2⁺).

10. Méthode d'analyse de l'intensité relative de fluorescence (RFI)

Dans le but d'étudier les différents paramètres des expériences de vaccinations des souris chimères hématopoïétiques (figures 18), nous avons déterminé l'intensité relative de fluorescence des différents marqueurs. Pour cela, nous avons fait le ratio des cellules OT-I [CD8⁺CD45.1⁻CD45.2⁺] sur les lymphocytes T CD8 qui ne sont pas spécifiques à l'antigène OVA [CD8⁺CD45.1⁺CD45.2⁺].

11. Stimulation *ex vivo* de cellules OT-I : analyse de la phosphorylation de cibles de la voie PI3K/AKT/mTOR

Des rates de souris OT-I *Rag2*^{-/-} et des souris B6.SJL-*Ptprc*^a *Pepc*^b/BoyJ ont été collectées à CT6 ou CT18 et ont été préparées comme décrit dans la section *Vaccination DC-OVA/DC-LPS*. Les splénocytes des deux types de rates ont été mélangés dans un ratio 1:1 et ont été incubés 30 minutes à 37°C dans un milieu appauvri en facteurs de croissance (RPMI 1640 1% FBS). Les cellules ont ensuite été lavées en milieu RPMI complets 10% FBS puis ont été incubées 30 pour l'analyse de la phosphorylation de S6 ou 60 minutes pour l'analyse de la phosphorylation d'AKT à 37°C avec 0 ou 2 µg/ml de peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. Les cellules ont ensuite été marquées pour les marqueurs de surface CD8, CD45.1, et CD45.2 puis ont été fixées avec le kit de fixation/perméabilisation de la compagnie BD Biosciences (#554714), suivi du marquage des protéines phosphorylées S6 (sérine 235 et 236) et AKT (sérine 473).

12. Infection bactérienne avec *Listeria monocytogenes*-OVA (Lm-OVA)

Sept jours post vaccination DC-OVA ou DC-LPS, les souris ont été infectées par voie intraveineuse avec une dose létale de Lm-OVA (2×10^5) à ZT (zeitgeber time) 8. La rate et le foie des souris ont été prélevés 3 jours post infection dans le but de déterminer la charge bactérienne dans ces organes⁵⁴². Les tissus ont été pesés puis broyés mécaniquement dans un tampon de lyse (0.2% NP-40 dilué dans de l'eau milliQ) à l'aide d'un polytron désinfecté avec une solution de javel diluée dans de l'eau milliQ (10%) entre chaque tissu. Les tissus ont ensuite été dilués dans du PBS 1 X stérile puis étalés dans des gélose BHI agar (Brain heart infusion, BD211059) et incubé toute la nuit. Pour chaque tissu, plusieurs dilutions de bactéries diluées dans du PBS 1X ont été étalées dans deux pétris et la moyenne a ensuite été calculée (Dilution pour la rate : 10^3 , 10^4 , 10^5 – Dilution pour le foie : 10^2 , 10^3 , 10^4). Le compte des CFU (colonie forming units) a été vérifié et calculé par deux expérimentateurs différents.

13. Schémas expérimentaux des figures 11, 15, 17, 18 et 20

Annexe 2.

14. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad (version 6).

Les variations circadiennes ont été testées via une analyse cosinor avec l'équation suivante :

$$y = B + (A * \cos (2 * \pi * (x - Ps)/24))$$

Dans cette équation B correspond au niveau de base, A correspond à l'amplitude, et Ps correspond au décalage de phase avec une période fixe de 24 heures. La significativité a été déterminée via un test F.

Les expériences ayant deux facteurs à analyser (temps de vaccination et génotype, ou temps de vaccination et traitement) ont été analysées avec des ANOVA à deux facteurs suivis de test post

hoc Bonferroni lorsque les effets des facteurs étaient significatifs. Les expériences ne comparant qu'un seul facteur ont été analysées avec des tests t de Student.

Chapitre 4 – Résultats

1. L'horloge des lymphocytes T CD8 module la réponse précoce des lymphocytes T CD8 ainsi que l'expression des gènes reliés à la signalisation du TCR en réponse à la présentation antigénique

Les horloges circadiennes contrôlent de nombreux processus physiologiques chez les mammifères, dont la réponse immunitaire. En effet, de nombreuses études ont démontré l'importance des horloges circadiennes dans le contrôle de l'homéostasie, de l'inflammation, ainsi que dans le contrôle de la réponse immunitaire adaptative^{490, 491, 492}. Cependant ce dernier pan de la recherche circadienne sur la réponse immunitaire adaptative est relativement peu caractérisé par rapport à la réponse immunitaire innée. Les travaux publiés précédemment aux laboratoires ont montré un rythme journalier de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique par des cellules dendritiques¹. En effet, des souris C57BL/6J vaccinées en milieu de jour (ZT6) par rapport à des souris vaccinées en milieu de nuit (ZT18) ont une expansion clonale des lymphocytes T CD8 dont le TCR est spécifique au complexe K^bOVA plus importante. Ainsi, dans le cadre de mes travaux de recherches de doctorat, nous avons émis plusieurs hypothèses pouvant expliquer le rythme diurnal de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation d'un antigène par des cellules dendritiques observées par Fortier *et al.* JI. 2011¹. Nous avons tout d'abord émis l'hypothèse que le rythme observé était d'origine circadienne puis nous avons ensuite déterminé l'horloge circadienne responsable de ce rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation d'un antigène par les cellules dendritiques. Contrairement à certaines études qui ont mis en avant une corrélation positive entre le rythme de la circulation des lymphocytes T et des lymphocytes B dans le sang et la lymphe et le rythme de la réponse immunitaire associée, nous avons émis l'hypothèse que le programme génétique des lymphocytes T CD8 à un certain moment de la journée permettait à ces cellules d'être plus facilement activées ou à l'opposé inhibées. Pour la réalisation de ce projet de recherche, toutes les expériences ont été réalisées dans des conditions où l'environnement a été contrôlé de manière à être constant pour permettre d'analyser des rythmes circadiens, donc des rythmes endogènes. Différentes lignées de souris, outils, et techniques expérimentales ont été utilisés pour répondre à ces différentes questions.

1.1 Le niveau d'activation et de chargement des cellules dendritiques ne varie pas sur 24 heures

Il a été démontré par nos laboratoires que la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation d'un antigène par les cellules dendritiques variait en fonction du moment de la journée où les souris étaient vaccinées¹. Dans le but de contrôler notre protocole expérimental et de permettre de comparer la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique par des cellules dendritiques, la même préparation de cellules dendritiques a été utilisée pour les deux temps de vaccination. Pour chaque expérience de vaccination, le niveau de chargement avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (K^bOVA) et le niveau d'activation (I-A^b, CD86, K^b) des cellules dendritiques ont été vérifiés par cytométrie en flux (**Figures 7 A-B**).

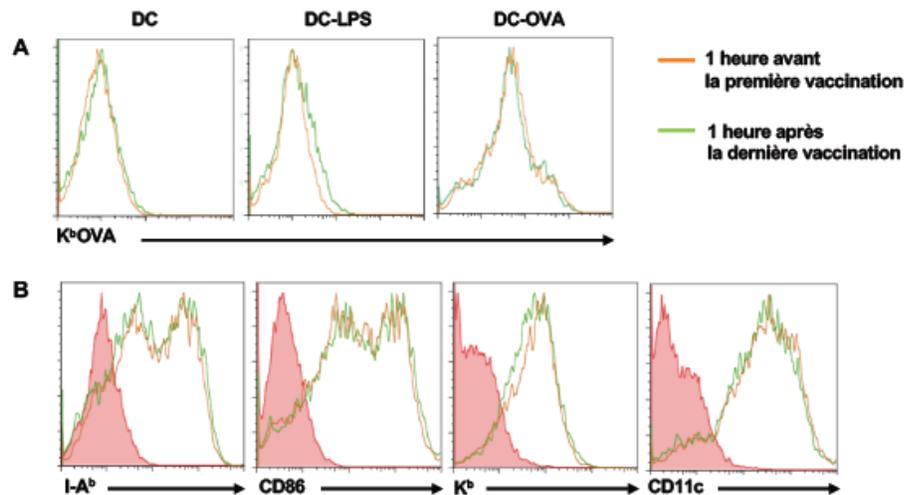


Figure 7. – Le niveau de chargement avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ et le niveau d'activation avec le LPS des BMDC ne varient pas entre les deux temps de vaccination.

(A) Analyse du chargement des BMDC par cytométrie en flux (gauche : BMDC non activées et non chargées avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄, au milieu : BMDC activées avec le LPS, à droite : BMDC activées avec le LPS et chargées avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄). (B) Analyse du niveau d'activation des cellules dendritiques activées avec le LPS et chargées avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. Le tracé orange correspond à l'analyse des cellules pour les différents marqueurs considérés 1 heure avant la première vaccination et le tracé vert à l'analyse 1 heure après la dernière vaccination.

1.2 La différence jour/nuit de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique est d'origine circadienne

Dans le but de déterminer l'origine circadienne de la variation jour/nuit observée de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation d'un antigène par les cellules dendritiques¹, nous avons vacciné des souris C57BL/6J placées dans un environnement constant d'obscurité après les avoir entraînés dans un cycle de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. En effet, il est essentiel de s'affranchir de tous signaux environnementaux tel que la lumière pour analyser l'origine endogène des rythmes circadiens. Les souris ont été vaccinées avec des BMDC chargées avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (DC-OVA) ou non chargées (DC-LPS) comme contrôle négatif en milieu de jour subjectif (CT6) ou en milieu de nuit subjective (CT18). Les DC-LPS n'induiront pas d'activation des lymphocytes T CD8 puisque celles-ci ne présenteront pas d'antigènes. Nous avons ensuite analysé l'expansion clonale des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique 7 jours post vaccination, au pic de la réponse, à l'aide d'un marquage avec le tétramère K^bOVA (**Figure 8A**). Les souris vaccinées à CT6 présentaient une expansion clonale deux fois plus importante que les souris vaccinées à CT18. En parallèle, les splénocytes ont été restimulés *ex vivo* avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ dans le but d'analyser les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 spécifiques pour cet antigène suite à une vaccination. Le pourcentage de lymphocytes T CD8 CD44⁺ IFN γ ⁺ était supérieur dans les rates des souris vaccinées à CT6 par rapport aux souris vaccinées à CT18 (**Figure 8B**). Bien que l'analyse des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 n'ait pas été faite sur des cellules marquées et positives pour le tétramère OVA, nous pouvons tout de même confirmer que les lymphocytes T CD8 CD44⁺ IFN γ ⁺ sont spécifiques pour le peptide OVA puisque ces cellules ont répondu à une restimulation avec cet antigène. De plus, les cellules issues de souris vaccinées avec des DC-LPS, ne répondaient pas à la stimulation antigénique *ex vivo*. L'ensemble de ces résultats démontre clairement que la différence jour/nuit de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique observée précédemment aux laboratoires est d'origine circadienne.

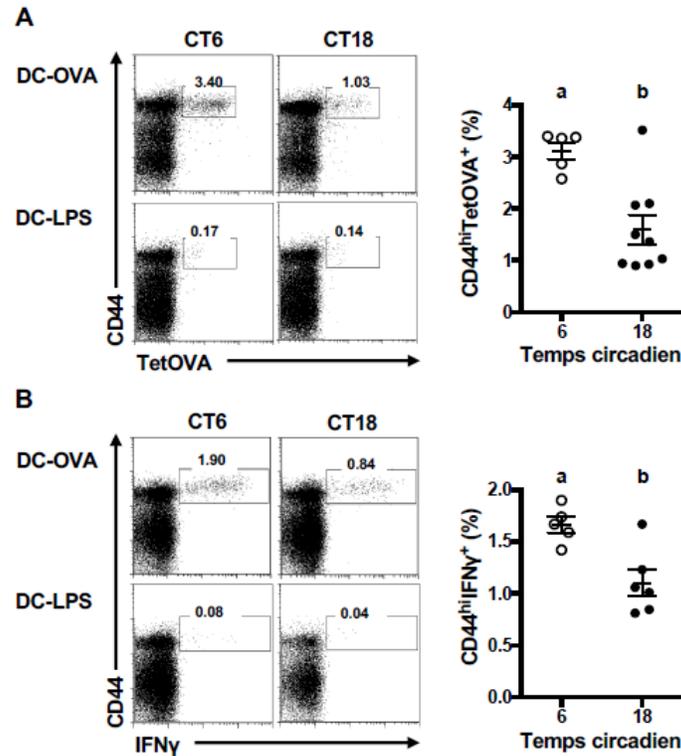


Figure 8. – Le rythme de la réponse des lymphocytes T CD8 est contrôlé par une horloge circadienne.

Des souris C7BL/6J ont été vaccinées par voie intraveineuse avec des DC-OVA ou des DC-LPS à CT6 ou CT18. Sept jours post vaccination (A) l'analyse de l'expansion des lymphocytes T CD8 a été déterminée à l'aide d'un tétramère K^bOVA. (B) En parallèle les splénocytes ont été restimulés *ex vivo* avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ dans le but d'analyser le pourcentage de lymphocytes T CD8 CD44⁺ IFN γ ⁺. Les résultats (moyenne \pm SEM) regroupent deux expériences indépendantes ayant données des résultats similaires, n = 5-9 souris/CT. Chaque point correspond à une souris. Test t de Student apparié ; les conditions ayant des lettres différentes sont significativement différentes (p < 0.05).

1.3 L'horloge des cellules dendritiques contribue à la différence jour/nuit de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique

Une étude récente a démontré la présence d'une horloge circadienne fonctionnelle dans les cellules dendritiques⁵¹⁹. Ainsi, dans un premier temps nous avons confirmé la présence d'une

horloge circadienne dans nos préparations de cellules dendritiques dérivées de cellules de la moelle osseuse. Pour cela, nous avons préparé des cellules dendritiques à partir de cellules de moelle osseuse de souris PER2::Luciférase³⁷³. Nous avons ensuite synchronisé les horloges circadiennes de ces cellules en faisant un choc de sérum. Le système utilisé permet de suivre l'expression de la protéine des horloges circadiennes PER2 dans les BMDC, via l'expression du gène rapporteur de la luciférase. Ainsi la bioluminescence observée est donc directement reliée à l'expression de la protéine des horloges circadiennes PER2. Dans le cadre de nos expériences, nous avons pu observer le maintien synchronisé des horloges circadiennes des BMDC pendant 3-4 jours après la maturation des cellules suivie du choc de sérum (**Figure 9A**). Chaque pic correspondant à un cycle d'environ 24,4 heures. Ces résultats confirment la présence fonctionnelle d'une horloge circadienne dans les BMDC. Nous avons ensuite testé le rôle de l'horloge circadienne des BMDC dans la variation jour/nuit de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. Pour répondre à cette question nous avons généré des BMDC de souris *Bmal1*^{+/+} et de souris *Bmal1*^{-/-}, gène essentiel des horloges circadiennes. Nous nous sommes assuré que le phénotype des BMDC *Bmal1*^{+/+} ou *Bmal1*^{-/-} était similaire en termes de niveau de chargement avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (K^bOVA) et en termes du niveau d'activation (expression des marqueurs : I-A^b, CD86 et K^b) (**Figures 9B-C**). Les résultats étaient similaires entre les deux génotypes.

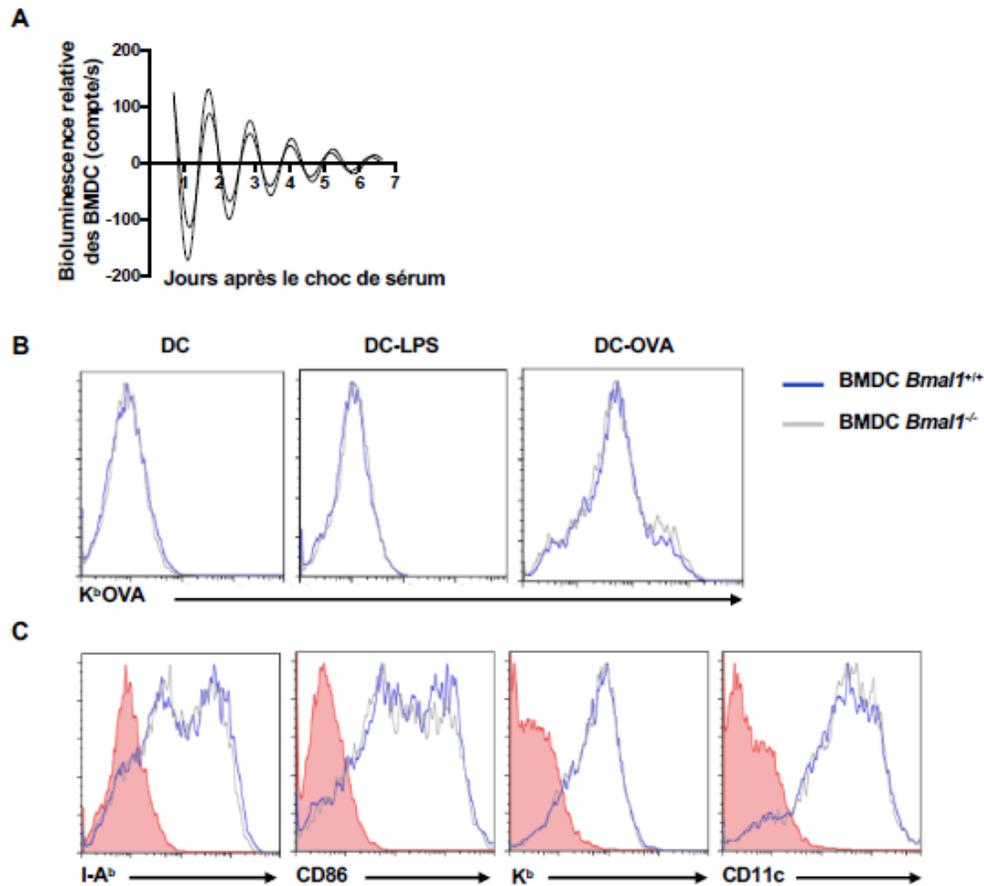


Figure 9. – L'absence d'horloge circadienne dans les cellules dendritiques n'influence pas le niveau de chargement avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ ainsi que le niveau d'activation des BMDC.

(A) Des BMDC de souris PER2::Luciférase ont été préparées dans le but d'analyser la présence d'une horloge circadienne dans ces cellules. (B) Analyse du chargement des BMDC par cytométrie en flux (gauche : BMDC non activées et non chargées, au milieu : BMDC activées avec le LPS, à droite : BMDC activées avec le LPS et chargées avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄). (C) Analyse du niveau d'activation des cellules dendritiques activées avec le LPS et chargées avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. Le tracé bleu correspond à l'analyse des BMDC *Bmal1*^{+/+} et le tracé gris à l'analyse des BMDC *Bmal1*^{-/-}.

Des souris C57BL/6J ont ensuite été vaccinées à CT6 ou CT18 avec des DC-OVA ou des DC-LPS (contrôle négatif) *Bmal1*^{+/+} ou *Bmal1*^{-/-}. L'analyse de l'expansion clonale des lymphocytes T CD8, sept jours post vaccination, a révélé que la variation jour/nuit de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique persistait (**Figure 10A**). Cependant, nous avons noté que l'expansion clonale des lymphocytes T CD8 des souris vaccinées avec des DC-OVA déficientes pour le gène *Bmal1*^{-/-} à CT6 par rapport à des DC-OVA *Bmal1*^{+/+} au même temps circadien était moins importante (**Figure 10A**). Nous avons également observé une tendance (# p = 0.1) dans la variation jour/nuit du pourcentage de lymphocytes T CD8 CD44^{hi} IFN γ ⁺ après vaccination avec des DC-OVA *Bmal1*^{-/-} (**Figure 10B**). Ainsi l'ensemble de ces résultats permettent de conclure que l'horloge des BMDC contribue, mais n'est pas essentielle aux variations de la réponse des lymphocytes T CD8 à la vaccination.

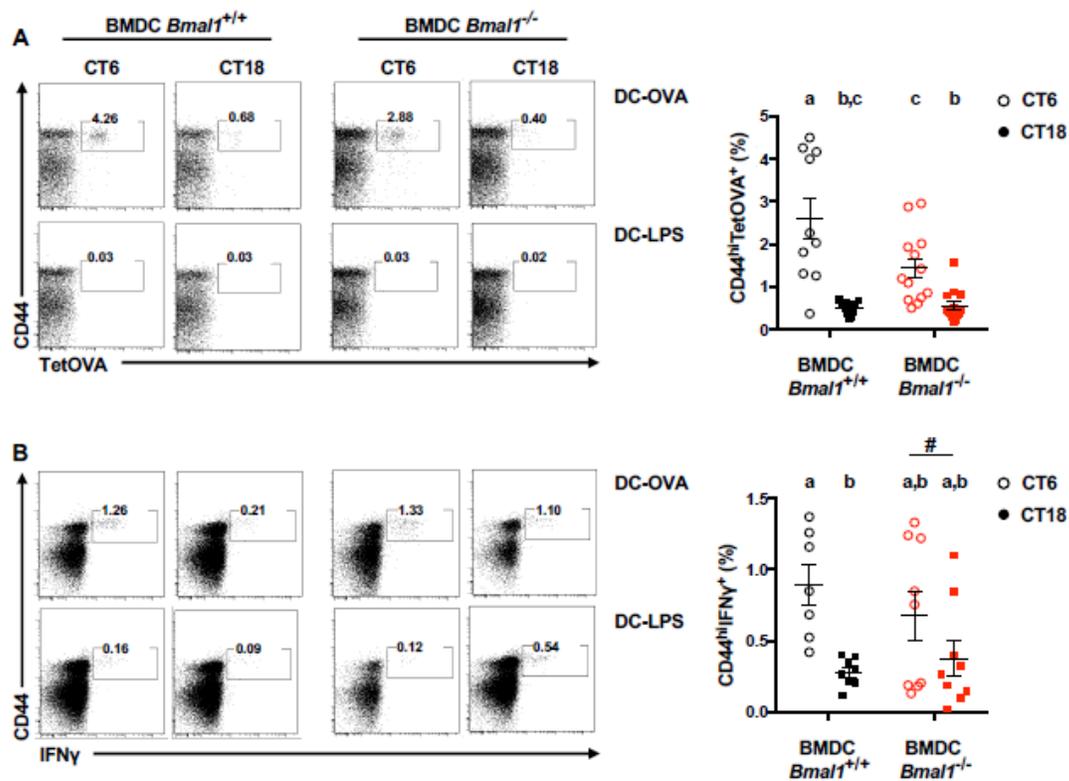


Figure 10. – L'horloge des cellules dendritiques contribue aux variations circadiennes de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.

Des souris C57BL/6J ont été vaccinées avec des DC-OVA ou des DC-LPS *Bmal1*^{+/+} ou *Bmal1*^{-/-} à CT6 ou CT18. Sept jours post vaccination (A) l'analyse de l'expansion des lymphocytes T CD8 a

été déterminé à l'aide d'un tétramère K^bOVA. **(B)** En parallèle les splénocytes ont été restimulés *ex vivo* avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ dans le but d'analyser le pourcentage de lymphocytes T CD8 CD44⁺ IFN γ ⁺. Les résultats (moyenne \pm SEM) regroupent trois expériences indépendantes ayant données des résultats similaires, n = 9-14 souris/CT. Chaque point correspond à une souris. ANOVA à deux facteurs (nature des BMDC *Bmal1*^{+/+} ou *Bmal1*^{-/-} et temps de vaccination CT6 ou CT18) suivis de test post hoc Bonferroni lorsque les effets des facteurs étaient significatifs. Les conditions ayant des lettres différentes sont significativement différentes (p < 0.05) ; tendance : #p = 0.1.

1.4 La migration des DC-OVA déficientes pour le gène *Bmal1* est altérée à CT6

Nos travaux de recherche ont démontré que le niveau d'activation et de chargement avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ des BMDC *Bmal1*^{+/+} ou *Bmal1*^{-/-} ne variait pas (**Figures 11A-B**). Ainsi, dans le but de comprendre les mécanismes sous-jacents à l'atténuation de l'expansion clonale des lymphocytes T CD8 en réponse à la vaccination à CT6 avec des DC-OVA *Bmal1*^{-/-} par rapport aux DC-OVA *Bmal1*^{+/+}, nous avons émis l'hypothèse qu'en absence d'horloge circadienne, les BMDC migraient moins vers la rate. Pour répondre à cette question, nous avons injecté à CT6 des souris congéniques pour le locus CD45, B6.SJL-*Ptprc*^a *Pepc*^b/BoyJ, avec des DC-OVA *Bmal1*^{+/+} ou *Bmal1*^{-/-}. Nous avons analysé la migration *in vivo* de ces cellules dans la rate des animaux 4 heures post injection et avons observé une diminution de la migration des DC-OVA *Bmal1*^{-/-} par rapport aux DC-OVA *Bmal1*^{+/+} (**Figure 11A**).

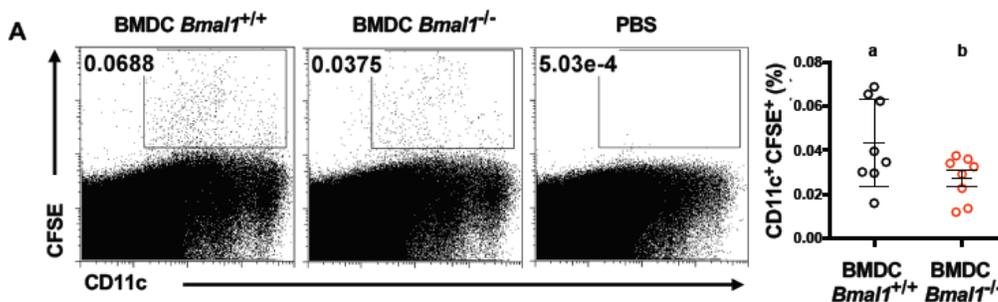


Figure 11. – L'absence du gène *Bmal1* dans les BMDC entraîne une diminution de la migration de ces cellules vers la rate.

(A) Des souris B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ (congénique pour le locus CD45) ont été injectées à CT6 avec des DC-OVA *Bmal1*^{+/+} ou *Bmal1*^{-/-} marqués au CFSE puis sacrifiées quatre heures post vaccination dans le but de déterminer la proportion de cellules dendritiques qui ont migré dans la rate des souris. Les résultats de la figure (A) (moyenne \pm SEM) regroupent trois expériences indépendantes ayant données des résultats similaires, n = 8 souris/condition. Chaque point correspond à une souris. Test t de Student apparié, les conditions ayant des lettres différentes sont significativement différentes (p < 0.05).

1.5 Caractérisation des souris déficientes pour le gène *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 matures

Aucune étude à ce jour n'a analysé le rôle de l'horloge circadienne des lymphocytes T CD8 dans un contexte de réponse à la présentation antigénique. Dans un premier temps, nous avons confirmé que les lymphocytes T CD8 naïfs avaient une horloge circadienne fonctionnelle (**Figure 12A**). Nous avons isolé des lymphocytes T CD8 de la rate de souris PER2::Luciférase, que nous avons maintenue en culture avec de l'interleukine 7. Nous avons pu observer un maintien de la synchronisation des horloges circadiennes de ces cellules pendant 4-5 jours. Ensuite, dans le cadre de la poursuite de la compréhension du rôle des rythmes circadiens dans la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation d'un antigène par les cellules dendritiques, nous avons émis l'hypothèse que l'horloge circadienne de ces cellules était responsable de cette variation circadienne. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le système Cre Lox pour induire la délétion de l'expression du gène des horloges circadiennes *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 matures uniquement. Nous avons dans un premier temps confirmé la délétion de ce gène par PCR quantitative et ensuite par immuno-buvardage (**Figures 12B-C**). Nous nous sommes également assuré que le comportement des souris déficientes pour le gène *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 matures (souris Δ/Δ) était similaire aux souris de type sauvage (souris f/f) issues de mêmes portées (**Figure 12D**).

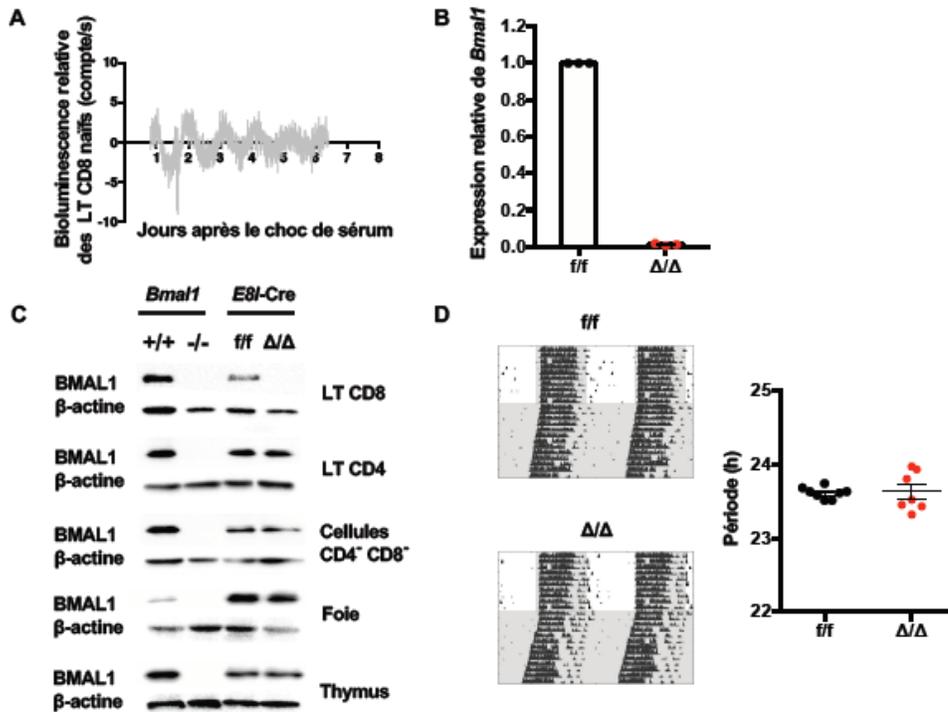


Figure 12. – L’absence de l’horloge circadienne dans les lymphocytes T CD8 matures n’affecte pas le comportement des souris.

(A) Des lymphocytes T CD8 de rate de souris PER2::Luciférase ont été isolés dans le but de déterminer la présence fonctionnelle d’une horloge circadienne dans ces cellules. (B) Confirmation par PCR quantitative de la délétion du gène *Bmal1* dans les souris déficientes pour le gène *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 (Δ/Δ) par rapport aux souris de type sauvage (*f/f*). (C) Confirmation par transfert de protéine de la délétion de la protéine BMAL1 dans les lymphocytes T CD8 des souris Δ/Δ par rapport aux souris *f/f*. La colonne de gauche représente les protéines issues de souris de type sauvage (+/+ , contrôle positif) et issues des souris déficientes pour le gène *Bmal1* dans toutes les cellules (-/-, contrôle négatif). La colonne de droite représente les protéines issues des souris suffisantes pour l’expression du gène *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 matures (*f/f*) et les protéines issues des souris déficientes pour le gène *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 matures (Δ/Δ). (D) Actogrammes représentatifs du comportement des souris *f/f* et Δ/Δ (représentation double) (partie supérieure : cycle LD, partie inférieure grisée : cycle DD). L’enregistrement de chaque tour de roue fait par la souris est réalisé via le logiciel ClockLab de la compagnie

Actimetrics et est représenté en noir dans les actogrammes. L'analyse comprend $n = 7-8$ souris/génotype. Chaque point correspond à une souris. Test t de Student apparié ($p < 0.05$).

1.6 Le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique n'est ni dû à un rythme de la migration des cellules dendritiques, ni dû à un rythme du nombre de lymphocytes T CD8 dans la rate des souris f/f et Δ/Δ

Nos laboratoires ont découvert que l'horloge des lymphocytes T CD8 matures était responsable de la rythmicité de leur réponse à la présentation antigénique. Ainsi l'étape suivante de mes travaux de doctorat a été de mettre en évidence les mécanismes sous-jacents à ce rythme. Nous avons tout d'abord écarté le rôle de la migration des BMDC dans les souris f/f versus les souris Δ/Δ à CT6 et CT18 (**Figure 13A**).

Plusieurs études publiées récemment ont montré corrélation positive entre le rythme du nombre de lymphocytes T et le rythme du nombre de lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques drainants et la magnitude de la réponse immunitaire à un challenge avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ ou avec du NP31 -CGG respectivement^{496, 501}. Ainsi, nous avons en premier lieu analysé la proportion ainsi que le nombre des lymphocytes T CD8 dans la rate des souris f/f et Δ/Δ vaccinées avec des DC-OVA ou des DC-LPS à CT0, CT6, CT12, et CT18. Nous n'avons pas observé de rythme que ce soit dans les animaux f/f et Δ/Δ (**Figures 13B-C**). Ainsi, ces résultats suggèrent que le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique n'est pas dû à un rythme de la proportion des lymphocytes T CD8 dans la rate de souris.

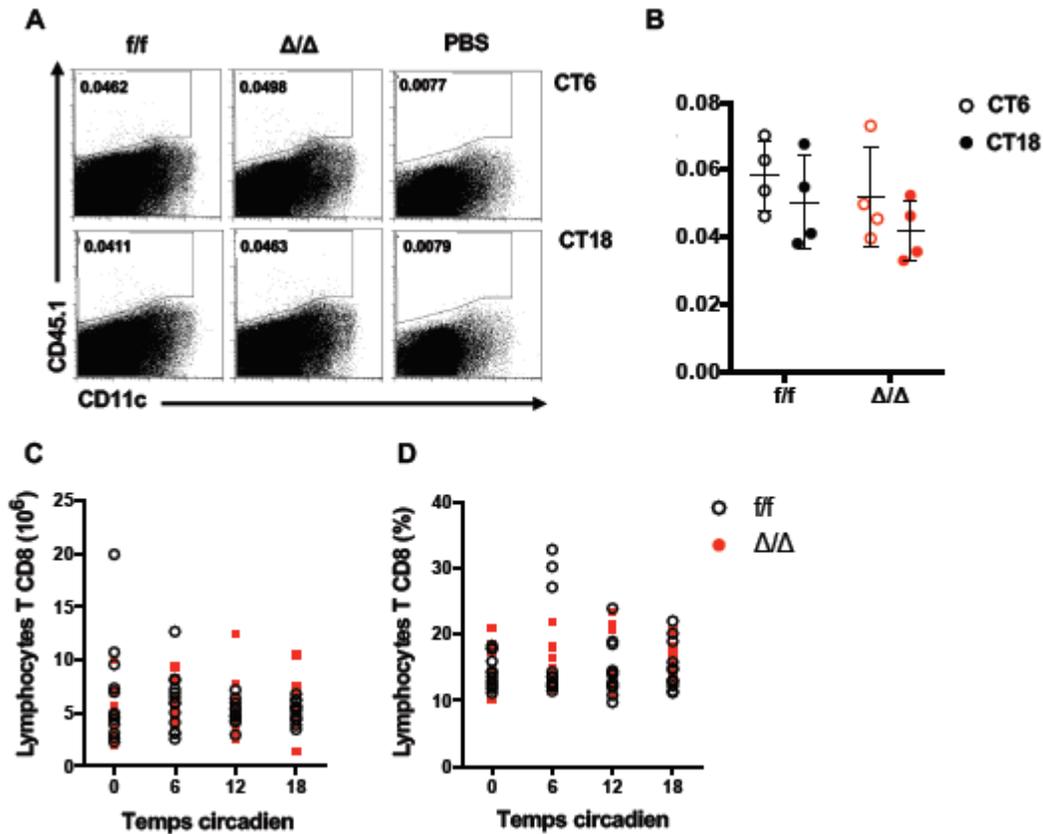


Figure 13. – Le rythme de la réponse des lymphocytes T CD8 n'est pas dû à un rythme de la migration des BMDC ou du nombre de lymphocytes T CD8 de la rate.

(A-B) Des souris f/f ou Δ/Δ (congéniques pour le locus CD45) ont été vaccinées à CT6 avec des DC-OVA de souris B6.SJL-Ptpra Pepcb/BoyJ marqués au CFSE puis sacrifiées quatre heures post vaccination dans le but de déterminer la proportion de cellules dendritiques qui ont migré vers la rate des souris. (C-D) Analyse du pourcentage et du nombre de lymphocytes T CD8 à CT0, 6, 12 et 18 dans les rates de souris vaccinées avec des DC-OVA au CT correspondant à l'analyse. Les résultats (moyenne ± SEM) regroupent 1 (A-B) ou 2 (C-D) expériences indépendantes ayant données des résultats similaires, n = 4-10 souris/CT. Chaque point correspond à une souris. ANOVA à deux facteurs (génotype des souris f/f ou Δ/Δ et temps de vaccination CT6 ou CT18) suivi de test post hoc Bonferroni lorsque les effets des facteurs étaient significatifs (p < 0.05).

1.7 L'horloge des lymphocytes T CD8 est essentielle à la différence jour/nuit de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique

L'abolition de la différence jour/nuit observée dans les souris Δ/Δ par rapport aux souris f/f ne permet pas de conclure qu'un rythme circadien est aboli. En effet, il est possible que la phase (ici dans nos expériences CT6) soit avancée ou retardée entraînant ainsi un biais dans nos résultats. Pour pallier cette éventualité, nous avons vacciné avec des DC-OVA ou des DC-LPS les souris f/f et les souris Δ/Δ soit à CT0 (Temps circadien où la lumière est censée s'allumer), CT6, CT12 (Temps circadien où la lumière est censée s'éteindre) ou CT18. Le rythme de l'expansion clonale des lymphocytes T CD8 suite à la présentation antigénique par des cellules dendritiques observé dans les souris f/f était aboli dans les souris Δ/Δ (**Figures 14A-C**). De plus, le rythme du pourcentage de lymphocytes T CD8 $CD44^+ IFN\gamma^+$ observé dans les souris f/f était également aboli dans les souris Δ/Δ (**Figures 14B-D**). Ainsi ces résultats suggèrent que l'horloge des lymphocytes T CD8 matures est essentielle à la rythmicité de leur réponse à la présentation d'un antigène par les cellules dendritiques.

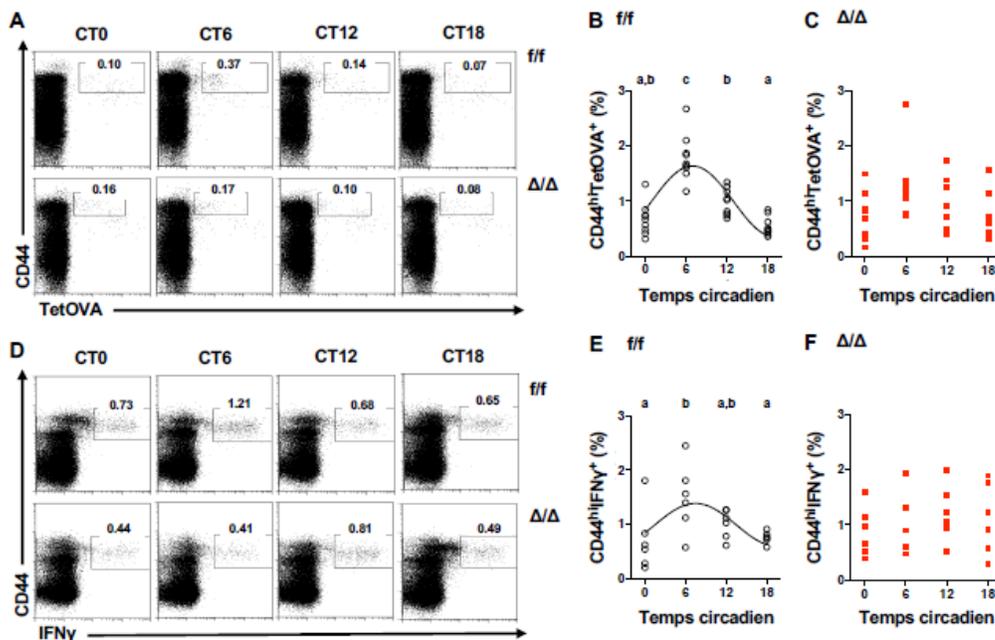


Figure 14. – L'horloge circadienne des lymphocytes T CD8 matures est essentielle à la rythmicité de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.

Des souris f/f ou Δ/Δ ont été vaccinées avec des DC-OVA à CT0, CT6, CT12 ou CT18. Sept jours post vaccination (**A-C**) l'analyse de l'expansion des lymphocytes T CD8 a été déterminé à l'aide d'un tétramère K^bOVA. (**D-F**) En parallèle, les splénocytes ont été restimulés *ex vivo* avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ dans le but d'analyser le pourcentage de lymphocytes T CD8 CD44⁺ IFN γ ⁺. Les résultats (moyenne \pm SEM) regroupent deux (**A-C**) ou trois (**D-F**) expériences indépendantes ayant données des résultats similaires, n = 6-10 souris/CT. Chaque point correspond à une souris. La rythmicité a été déterminée via une analyse cosinor suivie d'un test F. La présence d'une courbe indique que c'est significatif ou qu'il y a une tendance (p = 0.07) et l'absence de courbe indique que ce n'est pas significatif. ANOVA à 1 facteur (**B-C**) ou deux facteurs (**E-F**) (génotype des souris f/f ou Δ/Δ et temps de vaccination CT6 ou CT18) suivi de test post hoc Bonferroni lorsque les effets des facteurs étaient significatifs. Les conditions ayant des lettres différentes sont significativement différentes (p < 0.05).

1.8 La variation circadienne de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique n'implique pas la nature de la chaîne V beta du TCR des lymphocytes T CD8

L'analyse de l'intensité de fluorescence moyenne du tétramère K^bOVA à la surface des lymphocytes T CD8 des souris f/f était supérieure lorsque les souris ont été vaccinées à CT6 par rapport aux souris vaccinées à CT18 (**Figures 15A-B**). Cette variation circadienne était abolie dans les souris Δ/Δ (**Figures 15A-B**). Cette observation ne peut être expliquée par une différence d'expression du TCR au cours d'un cycle circadien puisque des travaux publiés par nos laboratoires ont mis en évidence que l'expression du TCR à la surface des lymphocytes T ne variait pas sur 24 heures¹. Ainsi, une autre explication serait que l'affinité du TCR pour l'antigène varierait en fonction du moment de la journée où les souris ont été vaccinées. Nous avons par la suite analysé la proportion de TCR exprimant la chaîne V β 5 parmi les lymphocytes T CD8 spécifiques pour le complexe K^bOVA à jour 7 post vaccination avec des DC-OVA ou des DC-LPS dans les souris f/f et les souris Δ/Δ . En effet, cette chaîne du TCR, V β 5, est exprimée par les lymphocytes T CD8 dont le TCR présente une forte affinité pour le complexe K^bOVA (peptide antigénique SIINFEKL)⁵⁴³. Nous avons également marqué les cellules pour la chaîne de TCR V β 17, comme

contrôle négatif puisque cette chaîne n'est pas exprimée par les lymphocytes T de souris ayant un fond génétique C57BL/6J. Nous n'avons pas observé de variation entre les deux génotypes de souris que ce soit après une vaccination faite à CT6 ou à CT18 (**Figures 15C-D**). Ces résultats suggèrent que la nature de la chaîne V bêta du TCR des lymphocytes T CD8 n'explique pas la différence d'affinité du TCR pour l'antigène à CT6 par rapport à CT18. Ainsi il doit y avoir un autre mécanisme impliqué dans le contrôle circadien de l'activation des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.

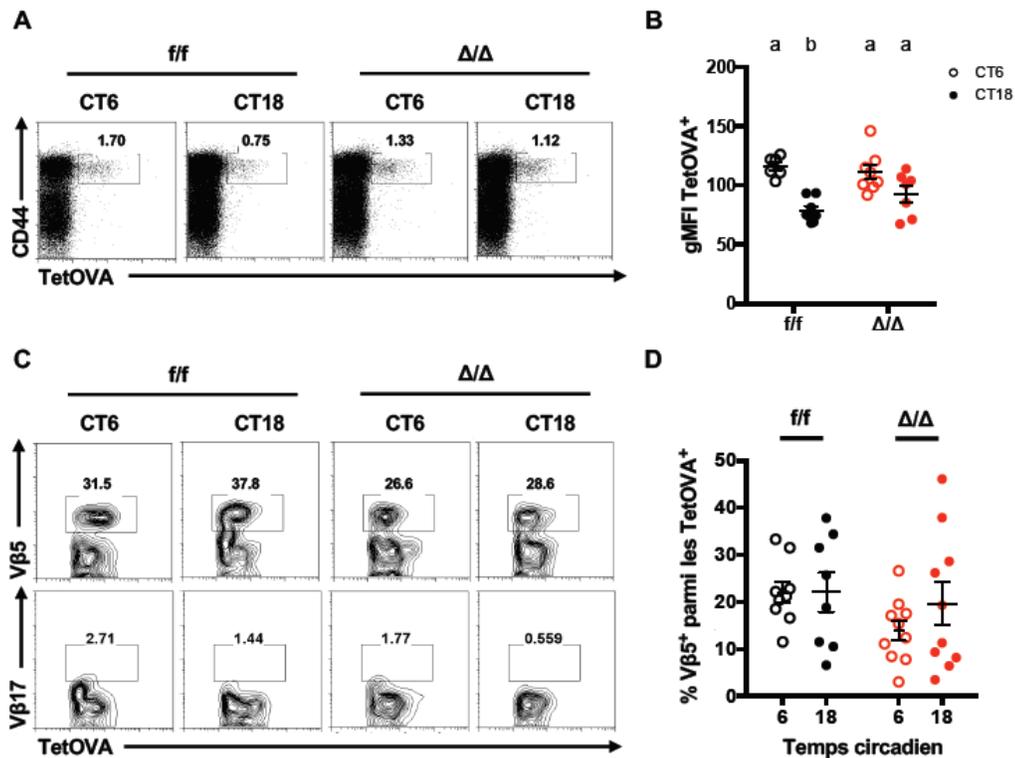


Figure 15. – La nature de la chaîne V beta du TCR des lymphocytes T CD8 n'est pas responsable de la rythmicité de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.

Des souris f/f ou Δ/Δ ont été vaccinées avec des DC-OVA à CT6 ou CT18. Sept jours post vaccination (A) l'analyse de l'expansion des lymphocytes T CD8 a été déterminée à l'aide d'un tétramère K^bOVA. (B) Analyse du niveau de fluorescence moyen de l'expression K^bOVA sur les lymphocytes T CD8 CD44⁺ K^bOVA⁺. (C-D) Analyse de la proportion de lymphocytes T CD8 CD44⁺ K^bOVA⁺ exprimant la chaîne du TCR Vβ5 ou la chaîne du TCR Vβ17. Les résultats (moyenne ± SEM) regroupent 2 expériences indépendantes ayant données des résultats similaires,

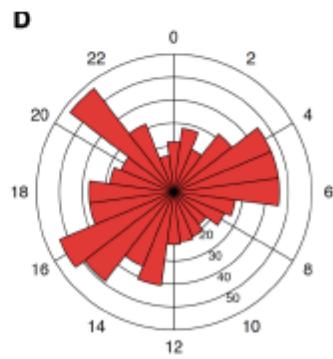
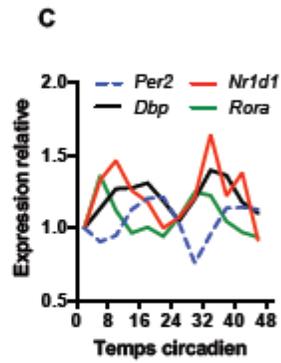
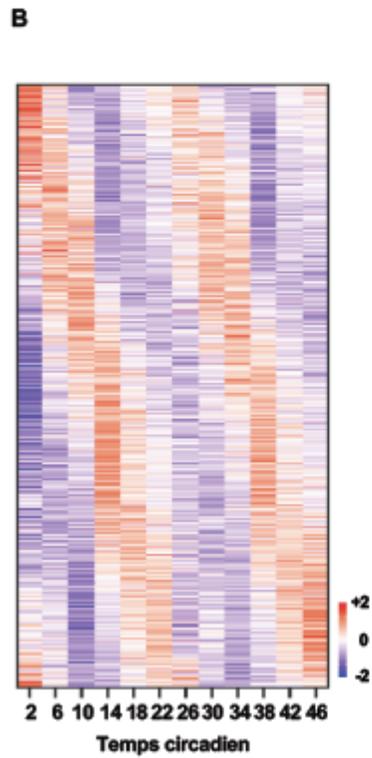
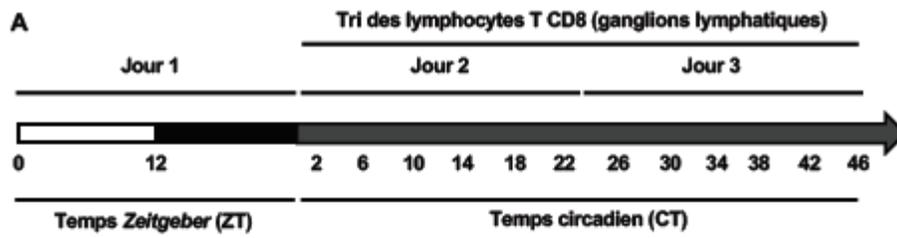
n = 6-10 souris/CT. Chaque point correspond à une souris. ANOVA à deux facteurs (génotype des souris f/f ou Δ/Δ et temps de vaccination CT6 ou CT18) suivi de test post hoc Bonferroni lorsque les effets des facteurs étaient significatifs. Les conditions ayant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0.05$).

1.9 Contrôle circadien des voies de signalisation impliquées dans l'activation/l'inhibition des lymphocytes T CD8

Dans le cadre de mes travaux de recherches, suite à la découverte du rôle essentiel de l'horloge intrinsèque des lymphocytes T CD8 dans les variations de la réponse de ces cellules à la présentation antigénique, nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes T CD8 étaient potentiellement prédisposés à être activés ou inhibés à un certain moment de la journée. Pour répondre à cette question, nous avons analysé les variations du transcriptome des lymphocytes T CD8 naïfs sur deux cycles circadiens, sur 48 heures. Pour cela, nous avons collecté des ganglions lymphatiques drainants (brachiaux, axillaires et inguinaux) de 6 souris C57BL/6J toutes les 4 heures (**Figure 16A**). Pour chaque temps circadien, nous avons isolé les lymphocytes T CD8 puis conservé les ARN totaux en TRIzol. Nous avons ensuite extrait les ARN totaux puis envoyé les échantillons pour analyse de séquençage à la plateforme d'analyse génomique de l'Institut de recherche en immunologie et en cancer (IRIC Montréal, Université de Montréal). Nous avons ensuite analysé les résultats uniquement sur les gènes codants des protéines, afin de déterminer les transcrits rythmiques. Nous avons utilisé le logiciel RAIN, qui est une méthode d'analyse non paramétrique permettant de détecter les rythmes circadiens en série. Cette analyse a permis de détecter 5.9 % de transcrits rythmiques codants pour des protéines ($n = 786$, FDR < 0.1) (**Figure 16B – Tableau en Annexe 3**). Parmi ces gènes, nous avons retrouvé 4 gènes des horloges circadiennes, *Period2*, *Nr1d1*, *Rora* et *Dbp* (**Figure 16C**). Nous avons comparé la phase de ces gènes dans les lymphocytes T CD8 par rapport à d'autres cellules et tissus et avons observé des résultats similaires pour les tissus périphériques (**Annexe 1**). À l'aide d'une analyse cosinor nous avons également déterminé la distribution de phase des gènes rythmés, et avons mis en évidence que cette distribution est non uniformisée avec plus de transcrits rythmiques exprimés en milieu de jour et en milieu de nuit, ce qui correspond au moment de la journée où l'expansion clonale des

lymphocytes T CD8 en réponse à une vaccination est augmentée ou diminuée respectivement (**Figure 16D**).

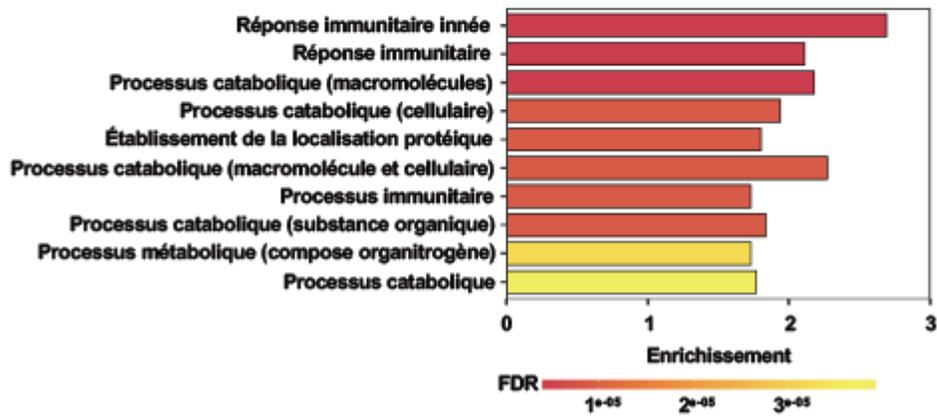
Dans le but de déterminer les voies de signalisations enrichies dans la liste des transcrits rythmiques codants pour des protéines, nous avons utilisé la plateforme d'analyse *GenExplain*⁵⁴⁴. Cette plateforme d'analyse, utilise la librairie TRANSFAC (BIOBASE 2014.4, Wolfenbüttel, Allemagne) permettant de déterminer l'enrichissement de facteurs de transcription pouvant réguler les gènes d'intérêts et dans le cadre de nos travaux de recherche les transcrits rythmiques pour chaque phase. Ainsi, uniquement les gènes ayant une phase d'expression à CT2 et CT10 ont révélé un enrichissement en facteurs de transcription, OCT à CT2 et IRF4 et BLIMP1 à CT10 (**Tableau Figure 16E**). Nous avons également conduit via cette plateforme, des analyses d'enrichissement de régulateurs en amonts et en aval des transcrits rythmiques pour chaque phase. De manière très intéressante, nous avons retrouvé plusieurs régulateurs impliqués dans l'activation de la voie du TCR en milieu de jour (ex : PI3K/AKT/mTOR) et certains régulateurs au contraire impliqués dans l'inhibition de cette voie la nuit (ex. : PTEN) (**Figure 16G**). L'ensemble de ces analyses suggère que les lymphocytes T CD8 vont potentiellement s'activer plus facilement le jour par rapport à la nuit.



E

Phase	Facteur de transcription	P-value
CT2	OCT	0.047
CT6	-	
CT10	IRF4 BLIMP	0.028 0.03
CT14	-	
CT18	-	
CT22	-	

F



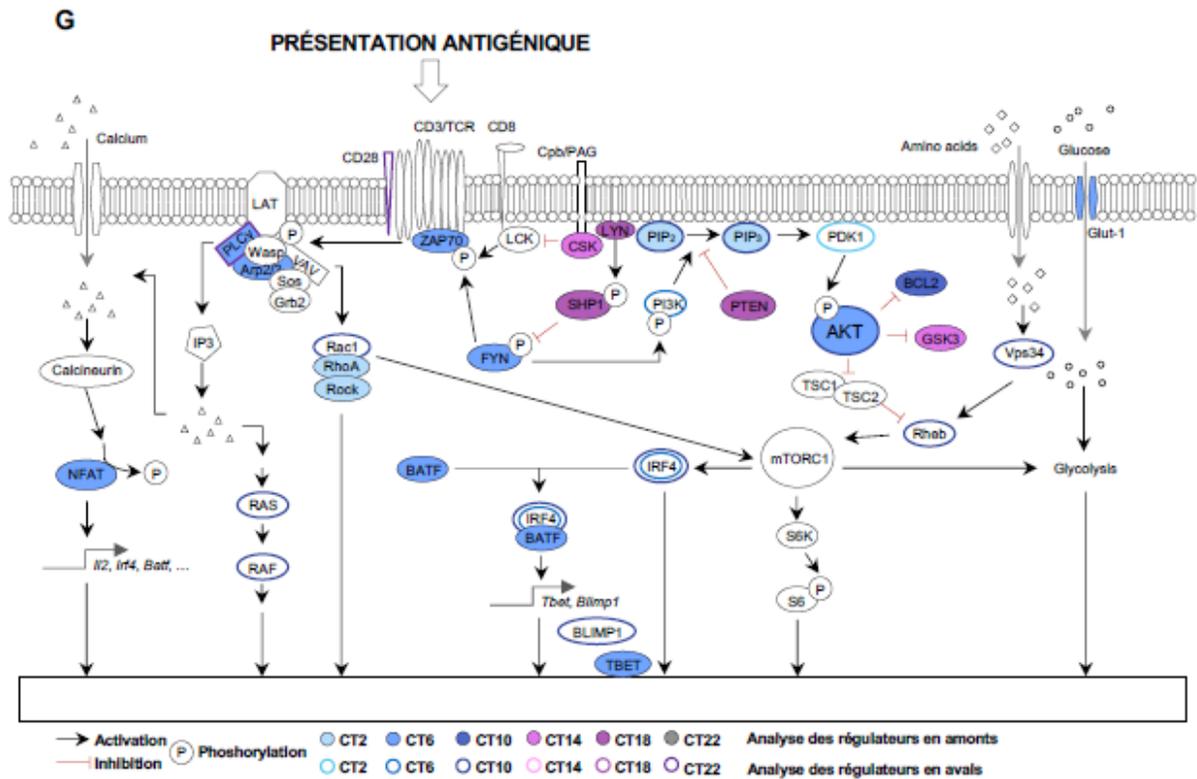


Figure 16. – Contrôle circadien des lymphocytes T CD8.

(A) Protocole expérimental de l'analyse du rôle de l'horloge circadienne des lymphocytes T CD8 matures naïfs. (B) Représentation graphique des gènes rythmés codant pour des protéines dans les lymphocytes T CD8 matures naïfs (bleu : diminution de l'expression génique, rouge : augmentation de l'expression génique). (C) Gènes des horloges circadiennes exprimés de manière rythmique dans les lymphocytes T CD8 matures naïfs. (D) Distribution des gènes rythmés codant pour des protéines en fonction de leur phase d'expression. (E) Tableau des facteurs de transcription prédits par la plateforme *GenExplain* contrôlant les gènes rythmés ayant une certaine phase d'expression dans les lymphocytes T CD8 matures naïfs. (F) Représentation des fonctions (moléculaires et cellulaires) des lymphocytes T CD8 matures naïfs rythmiques. (G) Représentation schématique de la voie de signalisation du TCR des lymphocytes T CD8 (formes remplies bleues: régulateurs en aval des gènes rythmés ayant une phase d'expression le jour dans les lymphocytes T CD8 matures naïfs, formes remplies roses: régulateurs en aval des gènes rythmés ayant une phase d'expression la nuit dans les lymphocytes T CD8 matures naïfs, formes vides bleues : régulateurs en amont des gènes rythmés ayant une phase d'expression le jour dans les lymphocytes T CD8 matures naïfs,

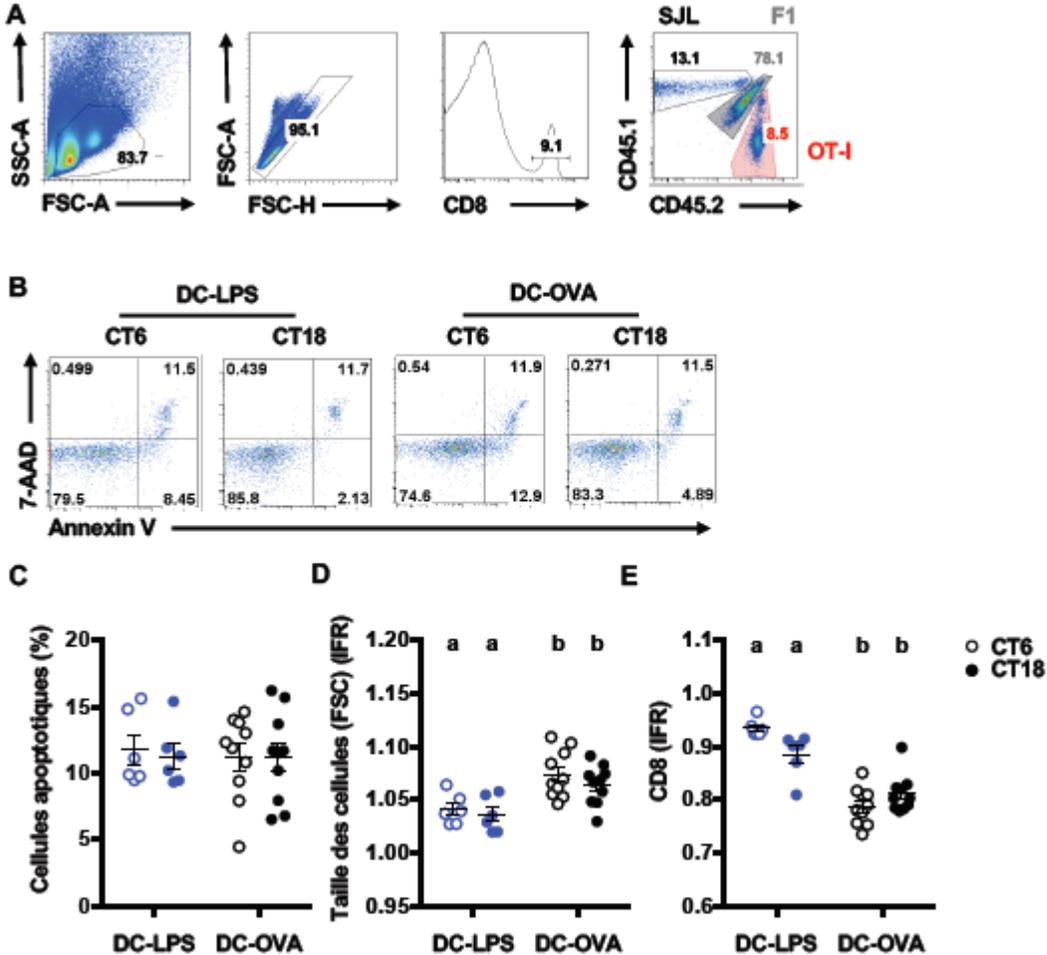
formes vides roses : régulateurs en amont des gènes rythmés ayant une phase d'expression la nuit dans les lymphocytes T CD8 matures naïfs. Les résultats regroupent une expérience où les ganglions lymphatiques drainants (brachiaux, axillaires, et inguinaux) de 6 souris ont été regroupés par CT, n = 6 souris/CT.

1.10 La régulation circadienne de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique agit à des temps précoces de la réponse des lymphocytes T CD8

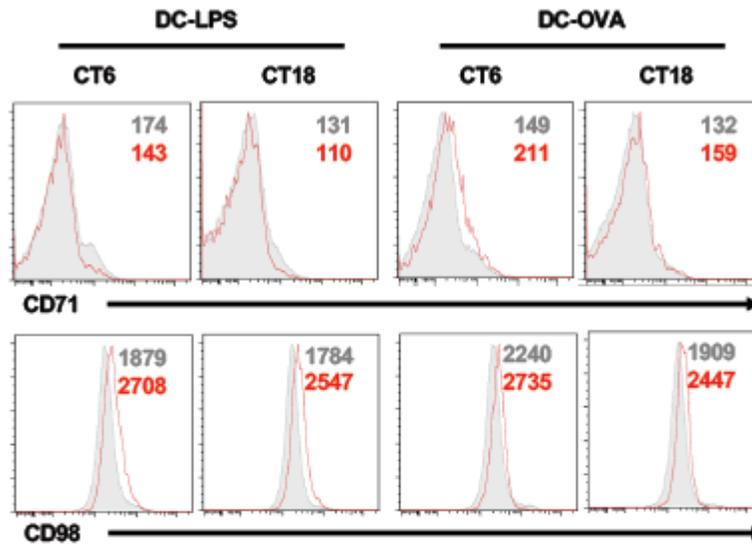
Les résultats précédents suggèrent que les variations circadiennes de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique agissent dans les temps précoces de la réponse de ces cellules. Cependant l'étude de cette réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique dans un contexte de vaccination avec des DC-OVA est difficile dû au nombre relativement faible de précurseurs de cellules T pour un antigène donné^{159, 160, 161, 545}. En effet, il est reconnu dans la littérature que le nombre de précurseurs de lymphocytes T pour un complexe CMH-peptide est limité de 10-1000 cellules. Pour cela, nous avons utilisé un système de chimères mixtes hématopoïétiques permettant d'augmenter le nombre de précurseurs de lymphocytes T CD8 spécifiques pour le complexe K^bOVA permettant de passer d'environ 100 cellules à 1 million de cellules. Nous nous sommes dirigés vers ce système expérimental plutôt que vers un système de transfert adoptif décrit dans l'étude de Druzd *et al.* qui montre un rôle des horloges des lymphocytes T dans la réponse immunitaire pour nous assurer que les horloges circadiennes de nos cellules précurseurs soient en phase avec celles de l'organisme de la souris⁴⁹⁶. En effet, la manipulation de cellules *ex vivo* lors de la collecte et la préparation en vue d'être injectées (changement de température, milieux de culture supplémentés en facteurs de croissance, FBS, etc) peut entraîner la resynchronisation des horloges de ces cellules et donc entraîner un décalage de phase par rapport à l'organisme de la souris et induire un biais par rapport à nos premières expériences de vaccination avec des DC-OVA^{353, 374, 395}. Ainsi, dans le but d'analyser cette réponse précoce, nous avons utilisé l'approche expérimentale des chimères hématopoïétiques. Pour cela, nous avons irradié avec une dose létale des souris hôtes B6.SJL-*Ptprc^a Pepc^b*/BoyJ (exprimant le marqueur CD45.1 à la surface des cellules hématopoïétiques) puis remplacer la moelle de ces souris avec un mix de cellules de

moelle osseuse 99% (C57BL/6J X B6.SJL)_{F1} (exprimant les marqueurs CD45.1 et CD45.2 à la surface des cellules hématopoïétiques) et 1% OT-I *Rag2*^{-/-} (exprimant le marqueur CD45.2 à la surface des cellules hématopoïétiques). Cette stratégie de chimères hématopoïétiques permet d'augmenter le nombre de lymphocytes T CD8 spécifiques pour le complexe K^bOVA, et nous permet ainsi de suivre la réponse précoce des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. Après reconstitution de leur système hématopoïétique, les souris ont été vaccinées avec des DC-OVA ou des DC-LPS à CT6 ou CT18, puis sacrifiées 3 jours post vaccination dans le but d'analyser plusieurs paramètres. La stratégie d'isolation de nos populations d'intérêts se trouve en **figure 17A**. Nous avons dans un premier temps identifié qu'il n'y avait pas de différence dans la proportion de cellules apoptotiques parmi les lymphocytes T CD8 spécifiques pour l'antigène (**Figure 17B**). De manière attendue, nous avons observé une augmentation de la taille des lymphocytes T CD8 ainsi qu'une diminution de l'expression du co-récepteur CD8 suite à une vaccination avec des DC-OVA par rapport aux vaccinations avec des DC-LPS (**Figures 17C-D**). Nous avons également analysé certains marqueurs métaboliques impliqués dans l'activation des lymphocytes T, tels que CD71 et CD98. Ainsi le récepteur à la transferrine CD71 est connu pour avoir une augmentation de son expression dans les 24 à 48 heures après activation des lymphocytes T et présente également une corrélation positive de son expression avec le marqueur de prolifération KI67⁵⁴⁶ tout comme le transporteur d'acides aminés CD98⁵⁴⁷. L'analyse de ces deux marqueurs n'a pas mis en évidence de différence entre les deux temps de vaccination (**Figures 17E-F**). Cependant, nous avons observé une augmentation de plusieurs marqueurs impliqués dans l'activation des lymphocytes T après une vaccination à CT6 par rapport à CT18, tels que CD69, CD5 et IRF4 (**Figures 17G-I**). En effet, il est connu que l'expression de CD69 est augmentée à la surface des lymphocytes T de manière très précoce dans les premières heures suite à une stimulation antigénique⁵⁴⁸, alors que la molécule de CD5 est quant à elle entre autres impliquée dans la mobilisation du calcium, crucial lors de l'activation de ces cellules^{549, 550}. De plus le rôle de l'expression d'IRF4 dans les lymphocytes T CD8 a été décrit par Man et *al.* dans le maintien de l'expansion ainsi que dans les fonctions effectrices de ces cellules lors d'une infection²⁷⁶. Nous avons également observé une augmentation de la phosphorylation de S6, cible de mTOR ainsi qu'une tendance d'augmentation de la phosphorylation d'AKT après une vaccination à CT6 par rapport à CT18 (Fig. 19J-K). Et de manière inattendue, nous avons observé une variation circadienne jour/nuit du niveau de phosphorylation de S6 et d'AKT dans les rates des souris vaccinées avec des DC-LPS et stimulé

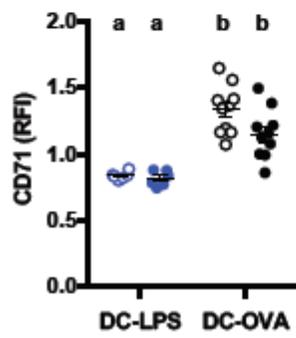
avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ *ex vivo* (Figures 17J-K). L'ensemble de ces résultats suggère que les lymphocytes T CD8 sont potentiellement plus enclins à être activés à un certain moment de la journée.



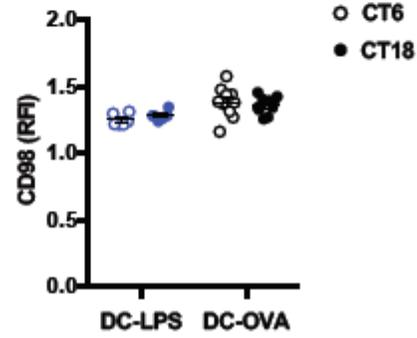
F

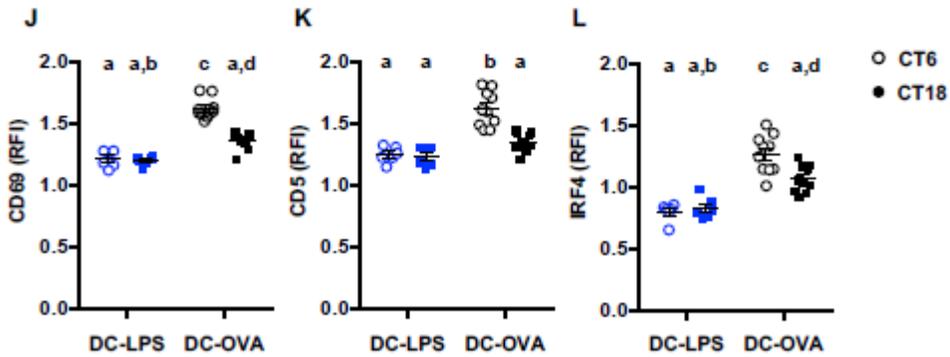
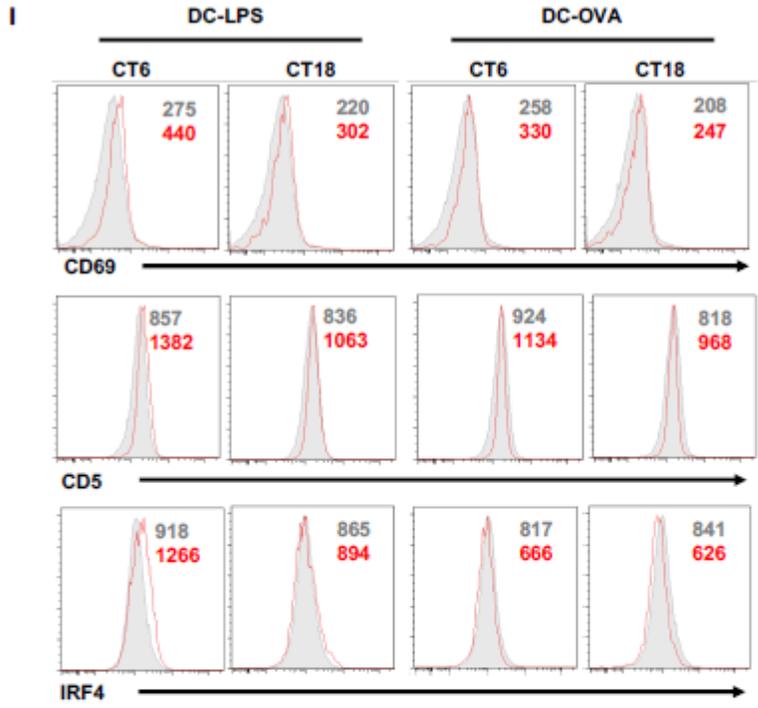


G



H





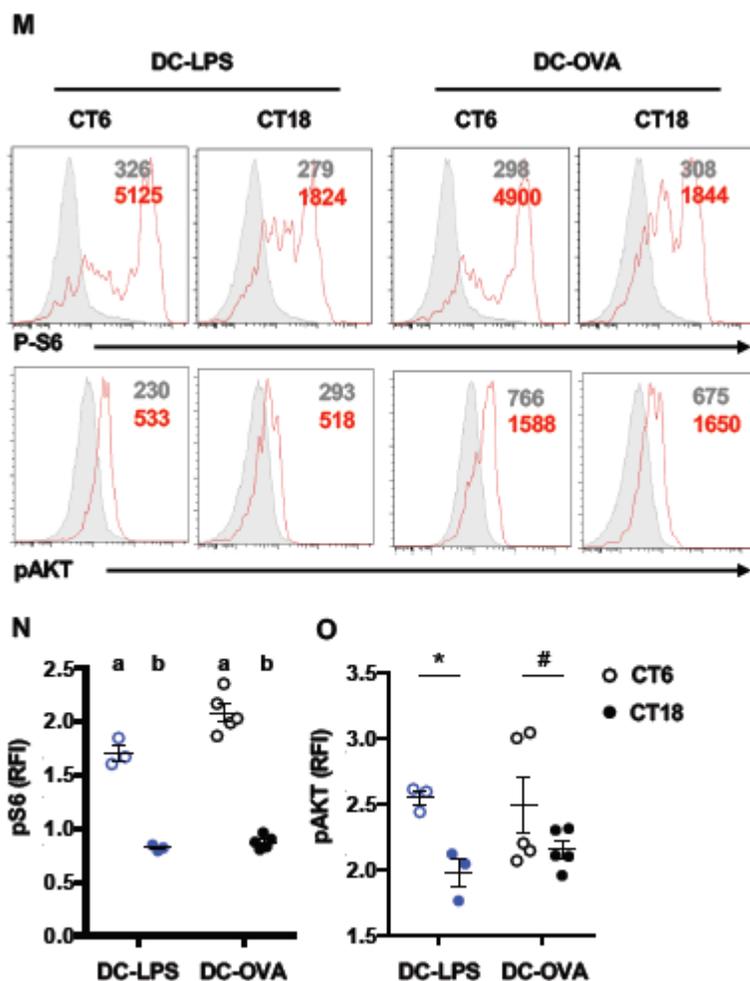


Figure 17. – L’Horloge circadienne des lymphocytes T CD8 contrôle la réponse précoce des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.

Des souris chimères mixtes 1% OT-I *Rag2*^{-/-} 99% (C57BL/6J X B6.SJL)F1 ont été vaccinées avec des DC-OVA ou des DC-LPS à CT6 ou CT18. Trois jours post vaccination l’analyse a été faite selon la stratégie d’isolation des cellules d’intérêt suivante (A), pour l’apoptose (B-C), de la taille des lymphocytes T CD8 spécifiques pour le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (D), l’expression relative du marqueur CD8 (E), pour l’expression relative des marqueurs CD71 (F-G), CD98 (F-H), CD69 (I-J), CD5 (I-K), IRF4 (I-L) et pour l’expression relative de la phosphorylation de la protéine S6 (M-N) et de la phosphorylation de AKT (M-O). Les résultats (moyenne ± SEM) regroupent 1 (M-O) ou 2 (A-L) expériences indépendantes ayant données des résultats similaires, n = 3-10 souris/CT. Chaque point correspond à une souris. ANOVA à deux facteurs (type de vaccination DC-OVA ou DC-LPS et temps de vaccination CT6 ou CT18) suivis de test post hoc Bonferroni lorsque les effets

des facteurs étaient significatifs. Les conditions ayant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0.05$).

1.11 La phosphorylation de S6 et d'AKT, facteurs clés des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, dans les lymphocytes T CD8 naïfs est fortement augmentée après une stimulation du TCR à CT6 par rapport à CT18

Les résultats précédents suggèrent que les lymphocytes T CD8 naïfs sont potentiellement prédisposés à être plus activés le jour par rapport à la nuit. Pour répondre à cette question, nous avons collecté des rates de souris OT-I *Rag2*^{-/-} (OT-1) et de souris B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ (SJL) non vaccinées à CT6 et CT18. Nous avons mélangé les cellules à un ratio 1:1 et les avons stimulées ou non *ex vivo* avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL). Nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de S6 dans un premier temps, mais également de AKT, un facteur clé dans l'activation des lymphocytes T (**Figures 18A-B**). Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que les variations circadiennes de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique par des cellules dendritiques implique des facteurs associés à l'activation des lymphocytes T directement liés via la voie du TCR tels que mTOR puisque les protéines S6 et AKT découlent directement de cette voie de signalisation.

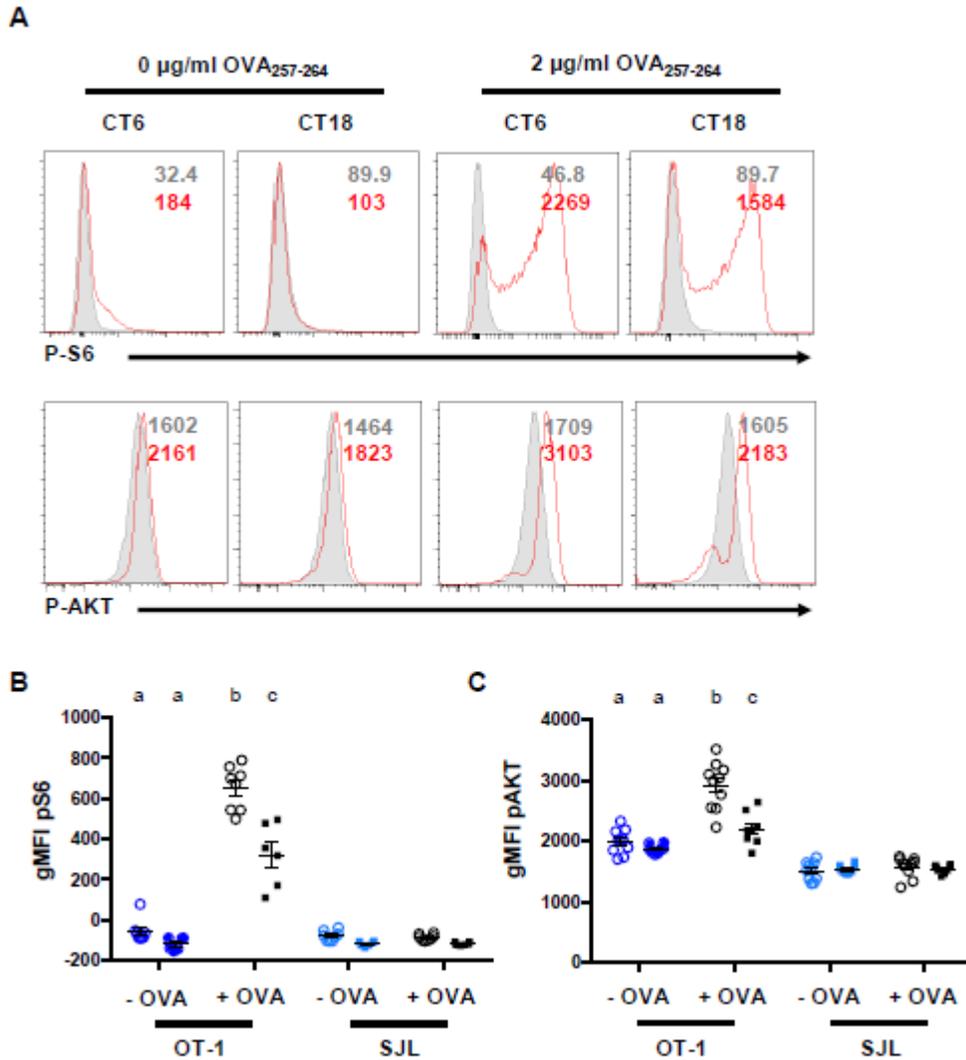


Figure 18. – La stimulation antigénique à CT6 de lymphocytes T CD8 naïfs entraîne une plus forte phosphorylation des protéines S6 et AKT.

Un mélange de splénocytes de souris OT-I *Rag2*^{-/-} (OT-1) et de souris B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ (SJL) a été stimulé *ex vivo* avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. L'analyse de la phosphorylation de S6 (**A**) et de AKT (**B**) a été déterminée en utilisant un anticorps anti-phospho-S6 (sérines 235 et 236) et anti-phospho-AKT (sérine 473). Les résultats (moyenne ± SEM) regroupent 2 expériences indépendantes ayant données des résultats similaires, n = 2 souris/CT. Chaque point correspond à un répliquât expérimental. ANOVA à deux facteurs (traitement +OVA ou -OVA et temps de collection des tissus CT6 ou CT18) suivi de test post hoc Bonferroni lorsque les effets des facteurs

étaient significatifs. Les conditions ayant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0.05$).

1.12 L'horloge des lymphocytes T CD8 contrôle les variations circadiennes dans le contrôle d'une infection avec *Listeria monocytogenes*-OVA suite à une vaccination avec des DC-OVA

Dans le but de confirmer l'impact fonctionnel de l'horloge des lymphocytes T CD8 dans la capacité de ces cellules à contrôler une infection bactérienne suite à une vaccination avec des DC-OVA à CT6 ou CT18, des souris *f/f* et Δ/Δ ont été infectées avec une dose létale de *Listeria monocytogenes*-OVA (bactérie exprimant le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄). Trois jours post infection, la charge bactérienne (CFU, colony forming units) dans les rates et foies des souris infectées a été analysée. Les souris *f/f* avaient moins de CFU dans les deux tissus après une vaccination faite à CT6 par rapport à CT18 (**Figures 19A-B**). Les souris Δ/Δ ne présentaient pas de variations circadiennes du nombre de CFU dans les deux tissus (**Figures 19A-B**). Ces résultats corrélaient positivement avec nos résultats d'expansion clonale des lymphocytes T CD8 suite une vaccination à CT6 ou CT18 (**Figures 14A-D**). En effet, puisque à jour 7 post vaccination avec des DC-OVA nous avons observé un pourcentage plus important de lymphocytes T CD8 spécifiques pour le complexe K^bOVA après une vaccination à CT6 par rapport à CT18. Ainsi, l'horloge des lymphocytes T CD8 contrôle les variations circadiennes de la capacité des lymphocytes T CD8 à répondre à une infection bactérienne.

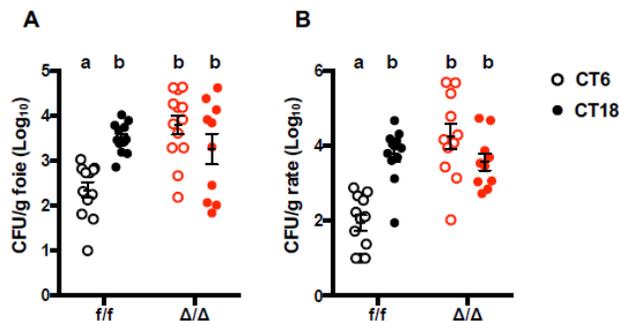


Figure 19. – L'horloge des lymphocytes T CD8 module les variations circadiennes dans le contrôle d'une infection avec *Listeria monocytogenes*-OVA suite à une vaccination avec des DC-OVA.

Des souris *f/f* et Δ/Δ ont été vaccinées avec des DC-OVA à CT6 ou CT18, puis infectées 7 jours après avec une dose létale de *Listeria monocytogenes*-OVA à ZT8. Trois jours post infection, la quantification de la charge bactérienne (CFU/g de tissu) a été déterminée dans le foie (**A**) et la rate (**B**) des souris *f/f* et Δ/Δ . Les résultats (moyenne \pm SEM) regroupent 3 expériences indépendantes ayant données des résultats similaires, $n = 10-13$ souris/CT. Chaque point correspond à un répliquât expérimental. ANOVA à deux facteurs (génotype des souris *f/f* ou Δ/Δ et temps de vaccination CT6 ou CT18) suivi de test post hoc Bonferroni lorsque les effets des facteurs étaient significatifs. Les conditions ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes.

Chapitre 5 – Discussion

1. Les horloges circadiennes des cellules immunitaires contrôlent la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique

Ce projet de recherche de doctorat décrit le contrôle circadien de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique par les cellules dendritiques. Ce projet repose sur des bases établies par le laboratoire et voulant que la réponse des lymphocytes T CD8 à la vaccination par voie intraveineuse avec des cellules dendritiques chargées avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ en milieu de jour versus milieu de nuit est différente¹. Ces travaux de recherche ont permis de conclure qu'il existait un rythme diurne de la réponse des lymphocytes T CD8. Dans le cadre de mon projet de recherche de doctorat, nous avons dans un premier temps déterminé la nature circadienne du rythme de cette réponse en répétant les expériences en plaçant les souris dans un environnement constant après les avoir été entraînées dans un cycle de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité (dans cette étude nous avons choisi de placer les souris en constante obscurité la veille, le jour des vaccinations et le lendemain). En effet la nécessité d'être dans un environnement constant permet de déterminer le caractère endogène d'un rythme circadien. Nous avons ensuite mis en lumière la contribution des horloges circadiennes des cellules dendritiques ainsi que le rôle essentiel de la fonction des horloges circadiennes des lymphocytes T CD8 démontrés par un rythme de l'élimination d'une infection bactérienne suite à une vaccination faite en milieu de jour versus milieu de nuit. L'analyse du transcriptome des lymphocytes T CD8, de souris de type sauvage non vaccinées, collectés toutes les 4 heures sur 48 heures nous a révélé un enrichissement de gènes impliqués dans l'activation des lymphocytes T le jour et à l'opposé un enrichissement de gènes impliqués dans l'inhibition de la réponse lymphocytaire T la nuit. Ces résultats corrélaient avec nos premières observations du rythme de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique où ces cellules répondaient plus fortement après une vaccination faite en milieu de jour par rapport à une vaccination faite en milieu de nuit. Nous avons pour finir montré que le contrôle circadien de cette réponse lymphocytaire à la présentation antigénique par des cellules dendritiques agissait sur la magnitude de la réponse T CD8 à des temps précoces avec

des différences observées dans l'expression et l'activité de facteurs clés dans l'activation des lymphocytes T CD8, tels que le facteur de transcription IRF4 et la molécule mTOR.

L'ensemble de ce projet de recherche de doctorat repose sur un modèle de vaccination basé sur la présentation antigénique du peptide de l'ovalbumine, OVA₂₅₇₋₂₆₄, par des cellules dendritiques à des lymphocytes T CD8. Ce modèle de stimulation de la réponse lymphocytaire T CD8 nous a permis de caractériser la réponse des lymphocytes T CD8 dont le TCR est spécifique aux complexes K^bOVA au cours d'un cycle circadien. Ce modèle présente plusieurs avantages. En effet, de nombreuses études ont utilisé des modèles similaires de présentation antigénique par des cellules dendritiques dans le cas d'immunothérapies du cancer ou d'immunothérapies vaccinales contre des infections d'origines bactériennes ou virales. De plus le modèle choisit nous a permis de suivre la réponse des lymphocytes T CD8 à des temps précoces via l'utilisation de souris transgénique OT-I *Rag2*^{-/-} dont l'ensemble des lymphocytes T CD8 exprime un TCR spécifique au complexe K^bOVA ainsi que de suivre la réponse des lymphocytes T CD8 à des temps tardifs via l'utilisation de tétramères permettant de détecter ces cellules spécifiques pour l'antigène de l'ovalbumine. Il est également important de noter que les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles. Ces cellules vont constamment surveiller l'organisme pour des signaux de dangers incluant l'inflammation, des tissus endommagés ainsi que la présence de pathogènes. Dans le cas de la physiologie du vivant, l'antigène va se retrouver dans la circulation sanguine et être capté par les cellules dendritiques dans les veinules endothéliales présentes dans les organes lymphoïdes secondaires puis apprêtés et présentés aux lymphocytes T dans les zones T de ces organes. Dans notre système expérimental, nous faisons abstraction du processus d'apprêtement de l'antigène par les cellules dendritiques dans le but de contrôler la quantité et la qualité (même peptide antigénique ayant une séquence en acides aminés définie, le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄, SIINFEKL) de l'antigène délivré entre les deux temps de vaccinations permettant de pouvoir comparer les réponses immunitaires induites suite à une vaccination le jour versus la nuit. Ainsi ce modèle de vaccination ne représente pas fidèlement la stimulation de la réponse des lymphocytes T CD8, mais reste fidèle au processus de vaccination de type prophylaxie. En effet, dans le cas de processus de vaccination à grande échelle dans le but de protéger contre une infection particulière, l'antigène atténué ou désactivé délivré est identique pour toute la population. Ainsi notre système expérimental nous permet de nous positionner dans l'étude de traitement basé sur la chronothérapie.

1.1 Une horloge circadienne contrôle la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique

La première question de ce projet de recherche de doctorat était de déterminer la nature du rythme de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. Nous avons dans un premier temps entraîné des souris de type sauvage dans un cycle de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité pendant 2 semaines (cycle LD, ZT0 correspond au moment où la lumière s'allume et ZT12 le moment où la lumière s'éteint). Nous avons ensuite placé ces souris dans un environnement constant, en constante obscurité (cycle DD, CT0 correspond au moment où la lumière est censée s'allumer et CT12 au moment où la lumière est censée s'éteindre) la veille, le jour des vaccinations ainsi que le lendemain. Les vaccinations ont été réalisées en milieu de jour subjectif (CT6) ou en milieu de nuit subjective (CT18) lors du deuxième jour du cycle DD. Il est important de placer les souris dans un environnement constant dans le but de s'affranchir de tous signaux externes permettant ainsi d'analyser le caractère endogène d'un rythme circadien. En effet, sans cela le rythme observé en cycle LD pourrait être dû à un phénomène nommé masquage⁵⁵¹. Le concept de masquage correspond à tous signaux pouvant masquer l'état réel d'un oscillateur de manière directe et immédiate, c'est-à-dire permettant d'observer la présence d'un rythme qui n'est pas d'origine circadienne (masquage positif) ou à l'opposé de ne pas observer un rythme qui serait présent dans des conditions constantes (masquage négatif). Un exemple concret de masquage positif, repose sur le fait que des souris *Clock* ^{$\Delta 19/\Delta 19$} et des souris *Bmal1*^{-/-} placées dans un cycle LD vont avoir un comportement locomoteur similaire à des souris de type sauvage, c'est-à-dire être actives lors de la phase d'obscurité^{427, 440}. Cependant, placées en obscurité constante ces souris vont avoir un comportement altéré et devenir actives à tout moment de la journée⁴²⁷. Ainsi dans cet exemple, la lumière joue un rôle dans le masquage du rythme de comportement de ces animaux. Dans le cadre de l'ensemble de mes travaux de doctorat, nous avons conduit nos expériences de manière à analyser un rythme circadien dit endogène. Nous avons choisi de placer les souris pendant trois jours dans un cycle DD, et de faire les vaccinations lors du deuxième jour pour éviter un effet de l'habituation des souris au cycle LD au jour 1. Nous avons également décidé de replacer les souris dans le cycle LD utilisé au préalable lors de l'entraînement des souris. En effet lorsque les souris sont en conditions constantes d'obscurité, dans un cycle DD, en libre cours, le début de leur activité locomotrice est avancé de quelques minutes chaque jour. Dans le cadre de nos expériences nous avons analysé la réponse immunitaire à jour 7 (**Figures 8, 10, 14, 15 et 19**) ou

jour 3 (**Figure 17**) post vaccination au temps correspondant au temps de vaccination. Ainsi, en remplaçant les souris dans un cycle LD, nous nous assurons que toutes les souris soient exposées à l'antigène pour une même durée. De plus, pour pouvoir analyser et déterminer le milieu de jour subjectif (CT6) ou le milieu de nuit subjectif (CT18) après sept jours dans un cycle DD, il aurait fallu placer les souris dans des cages individuelles et observer leur activité locomotrice. Dans le cadre de nos expériences, nous avons décidé de placer entre 3 et 5 souris par cages et de laisser les portées telles quelles sans séparer les souris *f/f* des Δ/Δ pour les expériences des **figures 12 à 15 et 19**. Cela nous a permis d'éviter un biais expérimental puisque chaque souris a été traitée de manière identique.

1.2 Les horloges circadiennes des cellules dendritiques

Contribution des horloges circadiennes des cellules dendritiques dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique

Dans notre étude, les cellules dendritiques ont été utilisées comme outils de vaccination pour l'analyse de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. Nous avons dans un premier temps déterminé la présence d'une horloge circadienne fonctionnelle dans ces cellules. Pour cela, nous avons différencié *in vitro* des cellules de moelle osseuse en cellules dendritiques issues de souris PER2::Luciférase, permettant de suivre la dynamique circadienne dans les tissus et cellules via son gène rapporteur fusionné à la protéine des horloges circadiennes PER2³⁷³. Nous avons observé la présence d'un rythme circadien ainsi que la synchronisation de ce rythme circadien dans ces cellules persistant pendant environ 5 jours post maturation de ces cellules avec du LPS. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par le groupe de recherche du Dr Loudon⁵¹⁹ ainsi que l'observation faite par Silver et *al.* de la rythmicité de l'expression des gènes des horloges circadiennes dans les cellules dendritiques de rate de souris collectées toutes les 4 heures⁵⁵². Nos résultats démontrent une contribution des horloges circadiennes des cellules dendritiques dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. En effet, dans un premier temps, nous avons pu observer un maintien de ce rythme de réponse entre une vaccination faite à CT6 et une vaccination faite à CT18 avec des DC-OVA déficients pour le

gène *Bmall*. Cependant, bien qu'il soit persistant, ce rythme était atténué après les vaccinations faites à CT6, où la réponse lymphocytaire T CD8 avec des DC-OVA de type sauvage est la plus forte. Ces résultats permettent de conclure dans un premier temps que les horloges circadiennes des cellules dendritiques ne sont pas les uniques responsables du rythme de réponse des lymphocytes T CD8, mais que cependant elles y contribuent. Dans un second temps, ces résultats permettent de mettre en lumière le côté fonctionnel des horloges circadiennes des cellules dendritiques dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. Ainsi notre étude s'ajoute aux deux études publiées par Hopwood *et al.* et Nguyen *et al.* dans l'importance de la fonctionnalité des horloges circadiennes des cellules dendritiques^{514, 519}. La première étude a mis en évidence la contribution des horloges circadiennes des cellules dendritiques dans l'expulsion du parasite *Trichuris muris* après une infection à ZT0 ou ZT12⁵¹⁹. Cette étude a également mis de l'avant un rôle des horloges circadiennes des cellules dendritiques dans le contrôle de la balance dans la différenciation des lymphocytes T CD4 en lymphocytes T helper 1 versus T helper 2 en réponse à cette infection⁵¹⁹. La deuxième étude de Nguyen *et al.* montre un rythme de réponse immunitaire du contrôle de l'infection bactérienne avec *Listeria monocytogenes*⁵¹⁴. En effet, des souris infectées à ZT8 (deuxième partie de la phase de lumière) ont moins de CFU dans le péritoine, la rate et le foie en comparaison aux souris infectées à ZT0. De plus cette observation est corrélée avec une augmentation du recrutement de cellules dendritiques inflammatoires (TipDC) différenciées à partir de cellules monocytes Ly6C^{hi} à ZT8 par rapport à ZT0 dans ces mêmes tissus connus pour être la première ligne de défense en réponse à une infection avec *Listeria monocytogenes*⁵⁵³. Dans cette étude, les cellules étudiées, les TipDC ne sont pas des cellules dendritiques conventionnelles impliquées dans la présentation antigénique, mais ont tout de même un rôle dans le contrôle de l'infection avec la bactérie *Listeria monocytogenes*. De plus, cette étude a mis en évidence une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4 et des T CD8 produisant de l'IFN γ après une infection à ZT8 par rapport à ZT0. En effet, il a été démontré par Ladel *et al.* que les lymphocytes T sont responsables de l'élimination de la bactérie⁵⁵⁴. Cependant, bien que le rythme de recrutement des TipDC soit aboli dans les souris déficientes pour le gène *Bmall* dans les cellules myéloïdes, le rythme du nombre de lymphocytes T CD4 et T CD8 produisant de l'IFN γ persiste suggérant un rôle intrinsèque de l'horloge des cellules myéloïdes ainsi que la contribution d'autres horloges circadiennes dans la réponse à une infection par *Listeria monocytogenes*. Cette étude met en lumière, tout comme notre

étude, la complexité du système circadien dans le contrôle de la réponse immunitaire et la contribution d'horloges circadiennes de différentes origines cellulaires.

Dans le but de déterminer le mécanisme par lequel les horloges circadiennes des cellules dendritiques contribuent au rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique, nous avons dans un premier temps écarté l'hypothèse d'un défaut d'activation des lymphocytes T CD8 puisque le niveau d'activation ainsi que le niveau de chargement des complexes CMH-I avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ étaient similaires entre les cellules dendritiques suffisantes versus déficientes pour le gène *Bmall*. Nous avons ensuite émis l'hypothèse que ces cellules pouvaient avoir un défaut de migration vers la rate. Pour répondre à notre hypothèse, nous avons injecté des cellules dendritiques suffisantes ou déficientes pour le gène *Bmall* par voie intraveineuse et avons analysé le pourcentage de cellules dendritiques injectées retrouvées dans la rate quatre heures post injection. Nous avons dans un premier temps observé une diminution notable du pourcentage de cellules dendritiques déficientes pour le gène *Bmall* dans la rate par rapport au pourcentage de cellules dendritiques de type sauvage. De plus, nous n'avons pas observé de différence dans la proportion de cellules dendritiques de type sauvage qui migre à la rate après une vaccination faite à CT6 par rapport à une vaccination faite à CT18 suggérant une absence de contribution de l'environnement de la souris dans la migration de ces cellules. Ainsi ces résultats suggèrent un rôle intrinsèque des horloges circadiennes des cellules dendritiques dans la migration de ces cellules à la rate. Cependant, de manière intéressante, plusieurs études publiées par différents groupes de recherche décrivent soit un rôle intrinsèque ou soit un rôle extrinsèque aux cellules dans la circulation de ces cellules dans le sang^{496, 498, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 530, 555, 556, 557}. Ainsi, l'étude publiée par Suzuki et *al.* vers un contrôle circadien de la migration des lymphocytes T dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes via les voies adrénérgiques alors que Druzd et *al.* démontrent un rôle des horloges circadiennes des lymphocytes T dans ce même rythme^{496, 501}. Ces deux études portent sur la recirculation des lymphocytes T, cependant d'autres études ont pu mettre en évidence un rôle des horloges circadiennes dans la recirculation ou le recrutement dans certains tissus de cellules du système immunitaire de manière intrinsèque ou extrinsèque aux cellules étudiées. Ainsi de manière intrinsèque aux cellules étudiées, Nguyen et *al.* ont mis en évidence un rôle de l'horloge des cellules myéloïdes dans la recirculation des TipDC dans la rate⁵¹⁴, et Sato et *al.* ont mis en évidence le rôle du gène *Rev-Erbα* exprimé par les macrophages dans la régulation circadienne de l'expression de la chimiokine CCL2 impliquée dans la migration de ces cellules⁵⁰⁹. Gibbs et *al.* ont

mis en évidence le rôle des horloges circadiennes des cellules des bronches dans le rythme de recrutement des cellules polynucléaires neutrophiles dans les poumons. En effet, l'expression de la chimiokine permettant le recrutement de ces cellules dans les poumons est régulée de manière circadienne par le gène *Bmall* dans les cellules des bronches⁵¹⁰. Ainsi le rythme de la recirculation des cellules dans le sang ou le rythme de la migration des cellules vers un tissu peuvent être régulé de manière intrinsèque ou extrinsèque aux cellules étudiées et dans certains cas peuvent combiner un rôle intrinsèque⁴⁹⁶ et un rôle extrinsèque⁵⁰¹ comme décrit dans la littérature pour les lymphocytes T.

Perspectives

Malgré une absence de différence dans le niveau d'activation (I-A^b, K^b, et CD86) entre les cellules dendritiques de type sauvage ou déficientes pour le gène *Bmall*, nous ne pouvons pas confirmer avec certitudes que la différence de réponse des lymphocytes T CD8 observée après une vaccination à CT6 n'est pas également due à un défaut de la capacité des cellules dendritiques déficientes pour le gène *Bmall* à activer les lymphocytes T CD8. Ainsi pour répondre à cette question qui subsiste, il serait intéressant d'analyser dans un premier temps la capacité de ces cellules dendritiques à activer des lymphocytes T CD8 *in vitro*. Pour cela, nous pourrions co-cultiver des DC-OVA avec des OT-I collectés à CT6 et préalablement marqués au CFSE afin d'analyser la prolifération de ces cellules d'une part et nous pourrions marquer également ces cellules pour des marqueurs d'activation tels que CD44, CD25 et CD69. Cette première expérience nous permettrait de nous conforter à l'idée que l'atténuation de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique à CT6 est bien due à un défaut de migration de ces cellules si les réponses T CD8 sont similaires. Dans un deuxième temps, nous pourrions analyser la capacité de ces cellules dendritiques à activer des OT-I *ex vivo*. Pour cela, nous injecterions des souris avec des DC-OVA de type sauvage ou déficientes pour le gène *Bmall* à CT6. Nous collecterions ensuite les rates 4 heures post injections telle que réalisé pour l'analyse de la migration des cellules dendritiques *in vivo* et nous co-cultiverions les splénocytes avec des OT-I. Dans cette expérience nous n'analyserions pas le pourcentage de cellules OT-I en prolifération puisque nous nous attendons à avoir moins de DC-OVA déficientes pour le gène *Bmall* dans la rate par rapport aux DC-OVA de type sauvage. Nous analyserions uniquement la capacité de ces cellules à activer les

OT-I via l'analyse de l'expression des marqueurs d'activation CD44, CD25 et CD69. Nous pourrions ainsi analyser d'une part la capacité des cellules dendritiques à activer des lymphocytes T CD8, mais également déterminer s'il y a un impact de l'environnement de la souris par rapport à une co-culture *in vitro* de cellules dendritiques n'ayant jamais été injectées. Ces deux expériences se complémenteraient et permettraient de répondre aux questions concernant la capacité des cellules dendritiques déficientes pour le gène *Bmall* à activer des lymphocytes T CD8, mais également déterminer si c'est uniquement les horloges des cellules dendritiques qui contrôlent cette réponse de manière intrinsèque.

Alors que Druzd et *al.* ont mis en évidence un mécanisme dépendant des horloges circadiennes des lymphocytes T dans leur migration, ils ont également démontré un rythme du récepteur au chimiokine CCR7 impliqué dans le recrutement de ces cellules dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires⁴⁹⁶. Les souris déficientes pour l'expression de ce récepteur ne présentaient plus de rythme de la migration des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires. Ainsi dans notre étude, nous avons mis en lumière un défaut de migration des cellules dendritiques déficientes pour le gène *Bmall* à CT6 dans la rate. Van et *al.* ont mis en évidence que l'expression de la molécule CD47 à la surface des cellules dendritiques était essentielle pour la migration de ces cellules vers la rate⁵⁵⁸. Il serait intéressant d'analyser le niveau d'expression de cette molécule à la surface de nos cellules dendritiques suffisantes ou déficientes pour l'expression du gène des horloges circadiennes *Bmall*. Cela nous permettrait de confirmer que la diminution d'expansion des lymphocytes T CD8 suite à une vaccination faite à CT6 avec des DC-OVA *Bmall*^{-/-} par rapport à des DC-OVA *Bmall*^{+/+} est bien dues à un défaut de migration des cellules dendritiques.

Il serait intéressant pour la suite de ce projet de recherche de déterminer s'il y a un rôle des horloges circadiennes dans le contrôle de l'expression de CD47. Pour cela, nous pourrions dans un premier temps déterminer si l'expression de cette molécule est rythmique. Nous pourrions également dans un second temps regarder la présence d'éléments de liaison à l'ADN pour les facteurs de transcription BMAL1 et ensuite faire des immunoprécipitations de chromatine afin de regarder si BMAL1 se lie au gène *Cd47*. Pour finir, nous pourrions générer des cellules dendritiques hétérozygotes pour l'expression du gène *Cd47* et tester leur rôle dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 *in vivo* en vaccinant des souris avec ces cellules à CT6 versus CT18. En effet, nous jouerons sur le niveau d'expression de cette molécule pour analyser son rôle

dans la migration des cellules dendritiques puisqu'en utilisant des souris déficientes nous risquerions de ne pas ou de peu observer de migration des cellules dendritiques et donc de n'observer qu'une faible réponse des lymphocytes T CD8. L'ensemble de ces expériences nous permettraient de mieux comprendre l'impact des horloges circadiennes intrinsèques des cellules dendritiques dans la migration de ces cellules vers la rate.

Sirp α est le partenaire moléculaire de CD47 impliqué dans la migration des cellules dendritiques vers la rate⁵⁵⁸. Cette molécule permet de différencier entre les sous-populations de cDC CD8⁺ CD11b⁻ et CD8⁻ CD11b⁺⁴⁰. Il est reconnu dans la littérature que les cellules dendritiques générées à partir de cellules de moelle osseuse avec un cocktail cytokinique GM-CSF + IL4 vont donner deux sous populations de cellules dendritiques : les cellules ayant une forte capacité à activer les lymphocytes T, les GM-DC et les cellules ayant une capacité limitée à activer les lymphocytes T, les GM-Macro¹⁰³. Ces deux types de sous populations de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse vont également avoir un profil phénotypique différent¹⁰³. Ainsi dans le cadre de mon projet de recherche nous avons travaillé avec les cellules dendritiques GM-DC, qui d'après l'étude de Helft *et al.*, présentent une signature génique proche des cellules dendritiques classiques CD8⁻ CD11b⁺ Sirp α ⁺ lorsque ces cellules sont différenciées à partir de cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage C57BL/6J¹⁰³. À la suite de mon projet de doctorat, plusieurs questions restent en suspens : est-ce qu'il y a un déséquilibre entre les populations GM-DC et GM-macro dans la culture de BMDC issues de souris déficientes pour le gène *Bmall* ? Est-ce que parmi les GM-DC différenciées à partir de moelle osseuse de souris déficientes pour le gène *Bmall*, il y a un biais vers le développement de cellules dendritiques Sirp α ⁻ plus important par rapport aux autres cellules dendritiques Sirp α ⁺ ? Est-ce que l'un ou l'autre biais vers le développement d'une population en particulier de cellules dendritiques a un rôle dans la capacité des cellules dendritiques à apprêter et présenter un antigène et ainsi à activer les lymphocytes T CD8 ? En effet, dans le cas des cellules dendritiques classiques il est connu que les différentes sous populations n'ont pas les mêmes fonctionnalités en termes d'apprêtement de l'antigène. En effet, den Haan *et al.* ont démontré que les cDC CD8⁻ CD11b⁺ Sirp α ⁺ ont une capacité de présentation croisée très amoindrie par rapport aux cDC CD8⁺ CD11b⁻ Sirp α ⁻¹⁰¹. Ainsi, est-ce que cela pourrait être le cas dans nos cultures de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse ? Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous avons fait abstraction de l'apprêtement de l'antigène puisque nous avons ajouté directement le peptide antigénique dans nos cultures de cellules pour charger les cellules

dendritiques. L'analyse de l'apprêtement de l'antigène par les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris suffisantes versus déficientes pour le gène *Bmal1* permettrait de répondre à cette question et permettrait également d'appuyer notre hypothèse que les cellules dendritiques déficientes pour le gène *Bmal1* dans notre système expérimental n'ont pas un défaut d'activation des lymphocytes T CD8.

Dans le cadre de l'apprêtement d'un antigène par les CMH-I, celui-ci doit être dégradé en peptide antigénique par le protéasome et les systèmes ERAAP/ERAAP1 et ERAAP2 avant d'être présenté par les CMH-I au TCR des lymphocytes T CD8. Il est connu que le facteur de transcription BMAL1 contrôle la dégradation du complexe CLOCK/BMAL1 via la dégradation de la protéine CLOCK par un mécanisme moléculaire indéterminé⁵⁵⁹. Il est également connu qu'une majorité de facteurs de transcription dont leur état est instable possèdent des domaines d'activation de la transcription qui chevauchent fonctionnellement les signaux impliqués dans la dégradation et le contrôle de la transcription de gènes en amont de processus impliquant la dégradation via le protéasome⁵⁶⁰. Ainsi nous pouvons penser qu'il en est de même pour BMAL1. Ces différents arguments pourraient nous amener à penser que non seulement BMAL1 pourrait contrôler le développement des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse vers un biais $\text{Sirp}\alpha^+$, mais qu'également il pourrait avoir un rôle dans la dégradation de protéine et ainsi dans la génération de peptide antigénique. Pour répondre à cette question, nous pourrions incuber la protéine de l'ovalbumine avec les cellules dendritiques suffisantes versus déficientes pour le gène *Bmal1* en vue d'être endocytée, apprêtée puis présenter par les complexes CMH-I. Nous pourrions co-cultiver ensuite ces cellules avec des cellules OT-I et analyser le niveau d'activation de ces cellules. Nous déterminerons au préalable le niveau d'activation et de chargement des complexes CMH-I des cellules dendritiques afin de connaître leur potentiel d'activation des lymphocytes T CD8.

1.3 Les horloges circadiennes des lymphocytes T CD8

Contribution des horloges circadiennes des lymphocytes T CD8 dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique

Notre étude porte sur le contrôle circadien de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. À ce jour, nous sommes le premier groupe de recherche à avoir mis en évidence la présence d'une horloge circadienne dans les lymphocytes T CD8. Pour cela, nous avons isolé des lymphocytes T CD8 de rate de souris PER2::Luciférase et déterminer la persistance d'un rythme circadien pendant environ 4-5 jours. Nous avons également montré un rythme de l'expression de gènes de l'horloge dans les lymphocytes T CD8 (*Period2*, *Nr1d1*, *Rora*, et *Dbp*). Cependant, d'autres groupes de recherche ont mis en avant la présence d'horloges circadiennes dans les lymphocytes T totaux ou les lymphocytes T CD4^{103, 496, 529, 531}. Ainsi notre résultat s'inscrit dans la longue liste des cellules qui expriment des horloges circadiennes. Le rythme de la réponse des lymphocytes T CD8 n'étant pas essentiellement dû aux horloges circadiennes des cellules dendritiques, nous avons donc émis l'hypothèse que ce contrôle circadien provenait d'un signal intrinsèque aux lymphocytes T CD8. En effet, plusieurs études ont mis en avant le rôle intrinsèque des horloges circadiennes des lymphocytes T et des cellules myéloïdes dans le contrôle de maladies auto-immunes impliquant ces cellules^{103, 496, 561}. Cependant d'autres études ont à l'opposé mis en avant le rôle d'horloges circadiennes d'autres cellules indirectement reliées à la réponse immunitaire contre une infection^{103, 519}. Hopwood *et al.* ont montré une contribution de l'horloge des cellules dendritiques dans la balance de différenciation des lymphocytes T CD4 en lymphocytes de type Th1 versus Th2 lors d'une infection avec *Trichuris muris* ainsi que dans la contribution de l'élimination de ce ver par les lymphocytes Th2. Il existe ainsi plusieurs possibilités intrinsèques ou extrinsèques du rôle des rythmes circadiens dans la réponse immunitaire. Dans notre étude de recherche, nous avons trouvé que l'horloge circadienne des lymphocytes T CD8 était essentielle au rythme de réponse de ces cellules à la présentation antigénique. Nous avons également démontré que cette horloge circadienne est fonctionnelle. En effet, des souris déficientes pour les horloges circadiennes dans les lymphocytes T CD8 matures ne présentaient plus de rythmes d'élimination d'une infection bactérienne par *Listeria monocytogenes* suite à une vaccination faite à CT6 ou à CT18. Cependant, ces résultats ne permettent pas de conclure sur le processus par lequel les lymphocytes T CD8 ont éliminé l'infection. Il est possible que le rythme d'élimination de la bactérie soit uniquement dû au nombre de précurseurs présents suite à la vaccination avec des DC-OVA. Ainsi, nos résultats nous permettent de conclure premièrement que

les lymphocytes T CD8 ont une horloge circadienne et que celle-ci est fonctionnelle, mais également suggèrent que ce sont ces horloges qui sont responsables du rythme de réponse des lymphocytes T CD8. En effet, nous avons éliminé la possibilité de l'influence d'un rythme de migration des cellules dendritiques lors des vaccinations faites à CT6 versus CT18 dans les souris suffisantes et déficientes pour le gène *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8.

De nombreuses études ont montré un rythme de recirculation des lymphocytes T et des lymphocytes B dans le sang et trois études récentes ont montré un rythme de recirculation des lymphocytes T dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires^{496, 501, 507}. Ces trois dernières ont montré une corrélation positive entre le rythme du nombre de lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires et le rythme de réponse de ces cellules à une stimulation antigénique *in vivo*. Ainsi Suzuki *et al.* ont mis en évidence une plus forte réponse des lymphocytes B suite à une injection de NP-CGG à ZT17, temps où il y a une accumulation de lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques par rapport à ZT5⁵⁰¹. Druzd *et al.* ont montré un rythme de réponse au développement de l'EAE avec une exacerbation à ZT8 des symptômes et du développement de la maladie au temps où il y a le moins de lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques par rapport à ZT20⁴⁹⁶. Finalement, Shimba *et al.* ont quant à eux montré un rythme de réponse à une infection bactérienne induite avec *Listeria monocytogenes*-OVA, avec une plus forte expansion des lymphocytes T CD8 spécifique au complexe K^bOVA après une infection réalisée à ZT16 où il y a une accumulation du nombre de lymphocytes T à la rate par rapport à ZT4⁵⁰⁷. De manière intéressante, Nguyen *et al.* ont montré une accumulation supérieure de lymphocytes T suite à une infection avec cette même bactérie dans la rate de souris infectées à ZT8 par rapport à ZT12⁵¹⁴. Dans le cas de notre étude du rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique, nous n'avons pas observé de rythme circadien du nombre de lymphocytes T CD8 dans la rate de souris vaccinées avec des DC-OVA ou des DC-LPS. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'un phénomène de masquage positif dans l'étude de Suzuki *et al.* et de Shimba *et al.* puisque ces deux études ont été réalisées dans des souris placées dans un environnement non constant, avec des analyses faites en cycle LD⁵⁰⁷. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que les organes ciblés sont différents entre l'étude de Druzd *et al.* et celle de Suzuki *et al.* et qu'ainsi un rythme observé du nombre de lymphocytes T et de leur réponse dans les ganglions lymphatiques n'est pas automatiquement transférable à d'autres tissus tels que la rate⁴⁹⁶. De plus ces deux études ont

démontré que le nombre de lymphocytes T CD4 et T CD8 dans les ganglions lymphatiques étaient similaires à ZT5 et ZT17 ce qui est proche de nos temps d'analyse : CT6 et CT18.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes moléculaires sous-jacents au rythme de la réponse des lymphocytes T CD8. Guerner *et al.* ont mis en évidence qu'en fonction de la quantité d'antigène délivré lors d'une stimulation antigénique *in vivo* chez la souris, cela entraînait une réponse lymphocytaire T CD8 impliquant un répertoire TCR différent⁵⁶². En effet, l'injection d'une faible concentration de protéine ovalbumine (0,25 µg) par rapport à une forte concentration (25 µg) va stimuler des lymphocytes T CD8 dont le TCR exprime majoritairement la chaîne Vβ5, chaîne de TCRβ exprimé par les lymphocytes T CD8 des souris transgéniques OT-I⁵⁶³. Ainsi bien que dans notre système expérimental nous nous sommes assurés que le niveau d'activation ainsi que le niveau de chargement des cellules dendritiques ne variaient pas entre les temps d'injection, mais également que la proportion de cellules dendritiques qui migre vers la rate des souris vaccinées ne variait pas entre des vaccinations faites à CT6 et CT18, nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait y avoir une différence dans le répertoire des lymphocytes T CD8 spécifiques pour le complexe K^bOVA. En effet, nous avons noté une différence circadienne du niveau d'expression du TCR spécifique pour le complexe K^bOVA via l'analyse de la fluorescence moyenne d'intensité du tétramère OVA à la surface des lymphocytes T CD8 ayant répondu à la vaccination avec des DC-OVA à CT6 versus CT18. Cette différence était abolie dans les souris déficientes pour *Bmal1* dans les lymphocytes T CD8 matures. De plus, nous pouvons exclure une contribution des rythmes circadiens dans le niveau d'expression du TCR à la surface des lymphocytes T puisque des travaux publiés de nos laboratoires ont démontré que l'expression du TCR ne variait pas sur 24 heures¹. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que non seulement il y a un rythme de réponse de lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique, mais également que ce rythme de réponse est corrélé avec une différence au niveau de la nature des chaînes du TCR pour le complexe K^bOVA qui pourrait jouer sur l'affinité du récepteur pour le complexe K^bOVA. L'analyse de la proportion de lymphocytes T CD8 exprimant la chaîne Vβ5 parmi les lymphocytes T CD8 spécifiques pour le complexe K^bOVA ne suggèrent cependant pas de contribution de la nature du TCR dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8. Ainsi, la différence d'affinité observée n'est pas due à la nature des chaînes Vβ du TCR de ces lymphocytes T CD8.

Nous avons observé dans nos analyses un rythme circadien de l'expansion des lymphocytes T CD8 spécifiques au complexe K^bOVA suite à une vaccination avec des DC-OVA, ainsi qu'un rythme de la proportion de ces lymphocytes T CD8 qui sécrètent de l'IFN γ . Cependant le ratio des cellules qui sécrètent de l'IFN γ en réponse à une courte restimulation antigénique à jour 7 post vaccination par rapport aux lymphocytes T CD8 spécifiques au complexe K^bOVA était égal à 1 pour tous les temps circadiens d'analyse. Ces résultats suggèrent que les horloges circadiennes contrôlent la réponse à des temps précoces de l'activation de ces cellules par les cellules dendritiques. Dans le but de comprendre le mécanisme moléculaire par lequel les horloges circadiennes des lymphocytes T CD8 contrôlent leur réponse à la présentation antigénique, et de déterminer si cette action est contrôlée à des temps précoces, nous avons décidé d'analyser le transcriptome des lymphocytes T CD8 collectés toutes les 4 heures sur 48 heures de souris de type sauvage naïves n'ayant jamais été vaccinées. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que les horloges circadiennes contrôlaient l'expression de nombreux gènes de la réponse immunitaire de manière rythmique dans certaines cellules du système immunitaire, telles que les macrophages de souris ou les lymphocytes T CD4 de sujets humains^{452, 529}. Dans notre étude, nous avons déterminé que 5.9% des gènes codants pour des protéines sont rythmés avec une accumulation de ces gènes ayant une phase d'expression à CT4 et CT16, temps circadiens proches de nos temps d'analyse de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique où nous avons observé des différences. Des analyses de prédictions de régulateurs en amont et aval des gènes rythmés ayant une phase d'expression le jour nous a révélé un enrichissement en régulateurs impliqués dans l'activation des voies de signalisation dépendante de la stimulation antigénique du TCR. Et de manière très intéressante, cette analyse nous a également révélé un enrichissement en régulateurs impliqués dans l'inhibition des voies de signalisation dépendante de la stimulation antigénique du TCR lorsque les gènes ont une phase d'expression la nuit. Parmi les régulateurs permettant l'activation de la voie de signalisation du TCR, nous avons retrouvé les kinases FYN et ZAP70. De plus, les travaux publiés par nos laboratoires avaient mis en évidence un rythme de l'ARNm et de la protéine ZAP70 dans les lymphocytes T naïfs avec une phase d'expression à ZT8 proche du temps circadien où nous avons observé une plus forte expansion clonale^{1, 103}. Nous avons également observé des facteurs impliqués dans la voie calcique⁵⁶⁴, tels que NFAT et PLC γ ainsi que des régulateurs de la voie mTOR : PI3K, PIP2, PIP3, AKT, PDK1, VSP34, et RHEB⁵⁶⁵. Pour finir nous avons mis en évidence des régulateurs connus qui dictent la réponse des lymphocytes T

CD8, et permettent le maintien de l'expansion et les réponses effectrices des lymphocytes T CD8 à une infection, telle que IRF4 et BATF^{276, 277, 278}. À l'opposé, nous avons observé parmi les régulateurs de gènes ayant une phase d'expression la nuit, la kinase LYN qui agit sur la phosphorylation de SHP1, lui-même appartenant à liste des régulateurs des gènes exprimés fortement la nuit, qui va avoir pour rôle d'inhiber la kinase FYN impliquée dans la phosphorylation de ZAP70⁵⁶⁶ et donc dans l'activation de la signalisation du TCR. Finalement nous avons également retrouvé PTEN connu pour inhiber la formation de PIP3 à partir de PIP2⁵⁶⁶ et donc d'inhiber la voie de signalisation AKT/PI3K/mTOR impliquée également dans l'activation des lymphocytes T. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les horloges circadiennes des lymphocytes T CD8 agissent dans les temps précoces de l'activation des lymphocytes T CD8 et que potentiellement ces cellules seraient prédisposées à être activées le jour et à l'inverse potentiellement prédisposées à être inhibées la nuit.

À la lumière des résultats obtenus par nos analyses du transcriptome des lymphocytes T CD8 sur 48 heures, nous avons ensuite confirmé certains régulateurs clés de l'activation des lymphocytes T CD8 dans les temps précoces de l'activation de ces cellules par des cellules dendritiques. Pour cela, nous avons utilisé un système de chimères mixtes hématopoïétiques permettant d'augmenter le nombre de précurseurs de lymphocytes T CD8 spécifiques pour le complexe K^bOVA permettant de passer d'environ 100 cellules à 1 million de cellules. En effet, il est connu dans la littérature que le nombre de précurseurs de lymphocytes T pour un complexe CMH-peptide est limité à 10-1000 cellules. Nous nous sommes dirigés vers ce système expérimental plutôt que vers un système de transfert adoptif décrit dans l'étude de Druzd et *al.* qui montre un rôle des horloges des lymphocytes T dans la réponse immunitaire pour nous assurer que les horloges circadiennes de nos cellules précurseurs (lymphocytes T CD8 OT-I) sont en phases avec celles de l'organisme de la souris. En effet, la manipulation de cellules *ex vivo* lors de la collecte et la préparation en vue d'être injecté (changement de température, milieux de culture supplémentés en facteurs de croissance, FBS, etc) peut entraîner la resynchronisation des horloges de ces cellules et donc entraîner un décalage de phase par rapport à l'organisme de la souris et induire un biais par rapport à nos premières expériences de vaccination avec des DC-OVA. Une fois reconstituées puis entraînées dans un cycle LD puis DD, ces souris ont été vaccinées à CT6 ou CT18 puis sacrifiées pour analyse de la réponse précoce à jour 3. Nous avons observé une plus forte expression de certains marqueurs d'activation : CD5, CD69 et IRF4. Plusieurs études, dont

Man et *al.* ont mis en évidence le rôle d'IRF4 dans l'expansion et la formation des réponses effectrices des lymphocytes T CD8 en réponse à une infection^{276, 277, 278}. Ce facteur de transcription est également ressorti dans nos prédictions de régulateurs de nos gènes rythmés ayant une phase d'expression le jour. Nous avons également observé une augmentation de la phosphorylation de S6 cible de la voie de signalisation mTOR ainsi qu'une tendance à une augmentation de la phosphorylation d'AKT, après restimulation des splénocytes issus de souris vaccinées avec des DC-OVA à CT6 par rapport à CT18. De manière très intéressante nous avons observé un résultat identique concernant la phosphorylation de S6 et une augmentation significative la phosphorylation d'AKT après une restimulation avec le peptide OVA des splénocytes issus de souris vaccinées avec des DC-LPS à CT6 par rapport à CT18. Nous avons confirmé ces résultats via des stimulations *ex vivo* avec le peptide OVA de cellules OT-I de souris sacrifiées à CT6 versus CT18. Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T CD8 sont potentiellement prédisposés à être activées en milieu de jour par rapport en milieu de nuit dans notre système expérimental, ce qui corrèle avec nos observations faites à partir de notre étude du transcriptome des lymphocytes T CD8 naïfs collectés toutes les 4 heures sur 48 heures.

Perspectives

Bien que notre étude n'ait pas mis en évidence de rythme circadien de la proportion des lymphocytes T CD8 dans la rate de souris, nous ne pouvons pas exclure avec certitude qu'il n'y a pas de corrélation entre le nombre de lymphocytes T CD8 dans la rate au moment de la vaccination et la magnitude de la réponse de ces cellules à une vaccination à ce même moment. En effet, bien que le nombre de lymphocytes T CD8 total soit similaire à différents moments de la journée dans la rate, nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que le nombre de précurseurs de lymphocytes T CD8 spécifiques pour le complexe K^bOVA varie au cours d'un cycle circadien. Il est connu dans la littérature que le nombre moyen de précurseurs de lymphocytes T pour un complexe CMH-peptide dans des souris C57BL/6J est d'environ 10-1000 cellules. Pour répondre à cette question, nous pourrions faire des expériences de *tétramères pull down* permettant d'isoler via l'usage de tétramère une population de lymphocytes T spécifique pour un antigène donné. Dans un premier temps, nous ferions un marquage avec le tétramère-OVA complexé au fluorochrome PE suivi d'une isolation via l'usage de billes magnétiques anti-PE suivi d'un deuxième marquage avec le même

tétramère couplé au fluorochrome APC permettant d'isoler notre population d'intérêt en isolant les cellules doubles positives pour les deux fluorochromes PE et APC. Ainsi nous déterminerons la proportion de ces cellules à CT6 versus CT18 permettant de conclure quant à l'éventualité d'un rythme de réponse des lymphocytes T CD8 dû à un rythme de ces précurseurs.

Notre étude a mis en évidence une augmentation du niveau d'expression du facteur de transcription IRF4 3 jours après la vaccination réalisée à CT6 par rapport à CT18. Ce facteur de transcription a été décrit dans plusieurs études comme étant impliqué dans le maintien de l'expansion des lymphocytes T CD8 ainsi que dans les fonctions effectrices de ces cellules^{276, 277, 278}. En effet, les lymphocytes T CD8 déficients pour le gène codant pour IRF4 ne présentent pas de défaut d'activation, mais ont cependant une incapacité à maintenir l'expansion clonale ainsi qu'à produire des cytokines en réponse à une infection^{276, 277, 278}. Ainsi nous aimerions tester le rôle d'IRF4 dans le rythme de réponse des cellules T CD8 à la présentation antigénique. Nous regarderions l'expansion de ces cellules ainsi que leurs réponses effectrices et l'expression de gènes cibles de IRF4 impliqués dans l'activation des lymphocytes T CD8, tels que TBET et BLIMP1. Cependant, nous utiliserions des souris *Irf4*^{+/-} dans les lymphocytes T CD8 plutôt que des souris *Irf4*^{-/-} dans les lymphocytes T CD8, car les études publiées montrent un défaut important dans le maintien de l'expansion des lymphocytes T CD8 et notre étude montre qu'après une vaccination avec des DC-OVA faite à CT18, la réponse des lymphocytes T CD8 est également très faible par rapport à CT6. En effet, nous risquerions de ne pas observer de différence entre les deux temps de vaccination et donc un effet circadien dans un système où les réponses sont faibles.

Nos analyses de régulateurs en amont et en aval de l'expression des gènes rythmés dans les lymphocytes T CD8 a mis en lumière les molécules NFAT, RAS et RAF impliquées dans la signalisation calcique de l'activation des lymphocytes T CD8. Il est connu dans la littérature qu'une interaction spécifique entre le TCR et le complexe CMH-peptide entraîne une augmentation de calcium dans la cellule T permettant d'augmenter le temps d'interaction entre les deux cellules et d'activer de manière efficace le lymphocyte T^{567, 568}. Mon projet de recherche de doctorat a mis en lumière la contribution des horloges circadiennes des cellules dendritiques dans le contrôle de la migration des cellules dendritiques dans la rate et le rôle essentiel des horloges des lymphocytes T CD8 dans le rythme d'activation précoce des lymphocytes T CD8 en réponse à une vaccination avec des DC-OVA. Ces deux cellules sont intimement liées dans le processus d'activation des lymphocytes CD8 et ont toutes les deux une horloge circadienne qui contribue au rythme de

réponses des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. Il serait intéressant de déterminer si la communication entre ces cellules est contrôlée par une horloge circadienne. Ainsi nous pourrions déterminer via un système de microscopie *in vivo* l'interaction des lymphocytes T CD8 spécifiques au complexe K^bOVA avec des DC-OVA. Pour ce faire nous utiliserions un système de chimères mixtes hématopoïétiques comme décrit précédemment avec une reconstitution de la moelle des souris avec un mélange de cellules de moelle contenant 1% de précurseurs de cellules OT-I. Cependant, dans ce système expérimental ces cellules OT-I seraient fluorescentes pour la molécule CFP (cyan fluorescent protein) permettant d'identifier les cellules OT-I lors de l'analyse des interactions avec les DC-OVA. Après reconstitution ces souris seraient vaccinées à CT6 ou CT18 avec des DC-OVA marquées au préalable avec du CFSE permettant ainsi de visualiser dans notre système les cellules dendritiques. Nous observerons 4 heures post vaccination les interactions *in vivo* de ces cellules et déterminerons s'il y a un impact de la rencontre de ces cellules dans le rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. Ainsi cette expérience permettrait de déterminer la contribution des horloges circadiennes des deux acteurs majeurs de notre étude du contrôle circadien de la réponse immunitaire.

1.4 Fonctionnement et impact des horloges circadiennes des lymphocytes T CD8

Les rythmes circadiens contrôlent de nombreux processus physiologiques via l'action des horloges circadiennes présentes dans la majorité des tissus chez les mammifères⁵⁶⁹. Ces horloges circadiennes vont permettre à l'organisme d'anticiper les changements de l'environnement dus au cycle jour/nuit en contrôlant des processus homéostatiques. Cependant, il est intéressant de noter que les rythmes circadiens ne contrôlent pas uniquement l'homéostasie du vivant, mais régulent également des processus complexes où l'organisme a besoin de s'adapter tels que la réponse immunitaire spécifique à un antigène. En effet, plusieurs études, dont la nôtre, ont mis en évidence l'impact des horloges circadiennes dans la réponse immunitaire adaptative en réponse à une infection, au développement d'une tumeur ou à une vaccination. Mes travaux de recherche de doctorat ont mis en lumière que 5,9% des gènes codant pour des protéines dans les lymphocytes T CD8 de souris de type sauvage naïves étaient contrôlés par une horloge circadienne. Cependant nous ne pouvons pas confirmer le caractère intrinsèque de l'horloge des lymphocytes T CD8 dans

le contrôle de l'expression de manière rythmique de ces gènes. Ainsi dans le but de comprendre comment fonctionnent les horloges circadiennes des lymphocytes T CD8, il serait intéressant dans un premier temps de déterminer leur contribution dans la régulation circadienne de leur transcriptome. Pour cela nous pourrions analyser le transcriptome des lymphocytes T CD8 déficients pour le gène *Bmall* toutes les quatre heures sur quarante-huit heures et comparer à nos premiers résultats obtenus chez des souris de type sauvage. Plusieurs études ont mis en lumière un rôle à la fois intrinsèque et extrinsèque aux cellules des horloges circadiennes dans la régulation circadienne de la réponse des lymphocytes T et des lymphocytes B à une stimulation antigénique *in vivo*^{496, 501, 507}. Ainsi nous pourrions penser qu'il existe une contribution d'autres horloges circadiennes dans le rythme de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. Il est établi dans la littérature depuis plusieurs décennies le rôle des lymphocytes T CD4 dans l'activation de manière optimale des lymphocytes T CD8^{238, 239, 240, 241, 242, 243, 244}. Ainsi nous pouvons spéculer que la machinerie circadienne des lymphocytes T CD4 pourrait agir dans la régulation circadienne de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique. Pour cela, nous pourrions analyser le transcriptome sur plusieurs cycles circadiens des lymphocytes T CD8 issus de souris dont les horloges circadiennes sont déficientes uniquement dans les lymphocytes T CD4. Nous utiliserions des souris exprimant la recombinaison Cre sous le promoteur CD4, de manière inductible via l'injection de tamoxifène. Cela nous permettrait d'abolir l'expression du gène des horloges circadiennes *Bmall* dans les lymphocytes T CD4 en périphérie. Nous avons également mis en évidence un enrichissement de régulateurs en amont et en aval des gènes exprimés de manière rythmique dans les lymphocytes T CD8 impliqués dans la signalisation du TCR, telle que BLIMP1, TBET, IRF4, NFAT, AKT, etc. Il est intéressant de noter que ces régulateurs ne sont pas forcément retrouvés de manière rythmique dans d'autres cellules ou tissus. La nature des ccg des lymphocytes T CD8 est ainsi différente par rapport aux ccg d'autres cellules qui n'ont pas les mêmes fonctions, comme les macrophages⁴⁶⁵. Ces résultats en lien avec la littérature suggèrent que les horloges circadiennes vont contrôler l'expression de gènes en lien avec la fonction de la cellule. Ainsi, les horloges circadiennes contrôlent de nombreux processus physiologiques via la régulation de l'expression de milliers de gènes dans la majorité des tissus et des cellules. Cependant ces gènes diffèrent en fonction de la nature de la cellule dans l'organisme. De manière évolutive ces résultats suggèrent que le système circadien agit de manière à pouvoir anticiper les changements dus au cycle jour nuit afin de maintenir constant

l'environnement de celui-ci via l'action différentielle de la machinerie circadienne dans les différents tissus et cellules de l'organisme. Les horloges circadiennes dans un contexte de réponse immunitaire permettent de maintenir une vigilance de celui-ci afin de pouvoir contrôler au mieux l'invasion d'un microorganisme. Ainsi, nous pourrions penser que l'absence de rythme circadien dans la réponse immunitaire pourrait être délétère. Le niveau d'expression de gène de la réponse immunitaire toujours à son maximum ou à l'opposé à son minimum au cours d'un cycle circadien pourrait entraîner une sur-activation ou à l'opposé une sous-activation de la réponse immunitaire entraînant ainsi le développement de maladies inflammatoires ou de maladies chroniques. Il est donc essentiel de considérer le rôle des horloges circadiennes dans la réponse immunitaire.

Chapitre 6 – Conclusion

La réponse immunitaire permet à l'organisme de se défendre contre des infections et des cancers. Les lymphocytes T CD8 par leur fonction cytotoxique ont un rôle dans l'élimination de cellules infectées et de cellules tumorales. Les rythmes circadiens permettent d'anticiper les changements de l'environnement et ainsi permettent à l'organisme d'adapter leur homéostasie afin de maintenir l'organisme dans un état d'équilibre stable. Cependant, une altération des rythmes circadiens observés par exemple chez des travailleurs de nuits est corrélée avec une augmentation du développement de maladies auto-immunes, de développement de cancers et de maladies métaboliques entre autres. Ainsi il est essentiel de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires du contrôle circadien de la réponse immunitaire dans un but de mettre en place des thérapies permettant d'améliorer les effets de traitements déjà existants tout en diminuant les effets secondaires.

Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous avons répondu aux trois questions clés reliées au rythme de réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique par des cellules dendritiques décrit dans le laboratoire par Erin E. Fortier¹. Nous avons dans un premier temps confirmé la nature circadienne de ce rythme, puis dans un second temps, mis en lumière la contribution des horloges circadiennes des cellules dendritiques ainsi que le rôle essentiel des horloges circadiennes des lymphocytes T CD8 dans le rythme d'activation précoce de ces cellules suite à une vaccination. Nous avons montré que ces horloges circadiennes sont fonctionnelles puisque les horloges des cellules dendritiques vont contrôler leur migration des à la rate et puisque les horloges circadiennes des lymphocytes T CD8 vont mieux contrôler la clairance d'une infection bactérienne après une vaccination faite à CT6 par rapport à CT18. Pour finir, nos résultats apportent plusieurs évidences que les lymphocytes T CD8 sont potentiellement prédisposés à être activés le jour par rapport à la nuit, leur donnant ainsi un avantage dans la réponse à la présentation antigénique.

Références bibliographiques

1. Fortier, E.E. *et al.* Circadian variation of the response of T cells to antigen. *J Immunol* **187**, 6291-6300 (2011).
2. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983 (1996).
3. Galluzzi, L. *et al.* Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* **1**, 699-716 (2012).
4. Spengler, M.L. *et al.* Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF-kappaB-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2457-2465 (2012).
5. Silver, A.C., Arjona, A., Walker, W.E. & Fikrig, E. The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity* **36**, 251-261 (2012).
6. Wang, Y. *et al.* A proteomics landscape of circadian clock in mouse liver. *Nat Commun* **9**, 1553 (2018).
7. Ahmadi, T., Flies, A., Efebera, Y. & Sherr, D.H. CD40 Ligand-activated, antigen-specific B cells are comparable to mature dendritic cells in presenting protein antigens and major histocompatibility complex class I- and class II-binding peptides. *Immunology* **124**, 129-140 (2008).
8. Steinman, R.M., Gutchinov, B., Witmer, M.D. & Nussenzweig, M.C. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med* **157**, 613-627 (1983).
9. Steinman, R.M. & Witmer, M.D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5132-5136 (1978).
10. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820 (2010).
11. Sprent, J. Antigen-presenting cells. Professionals and amateurs. *Curr Biol* **5**, 1095-1097 (1995).
12. Bhardwaj, N., Young, J.W., Nisanian, A.J., Baggers, J. & Steinman, R.M. Small amounts of superantigen, when presented on dendritic cells, are sufficient to initiate T cell responses. *J Exp Med* **178**, 633-642 (1993).
13. Probst, H.C. & van den Broek, M. Priming of CTLs by lymphocytic choriomeningitis virus depends on dendritic cells. *J Immunol* **174**, 3920-3924 (2005).

14. Jung, S. *et al.* In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**, 211-220 (2002).
15. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res* **4 Suppl 3**, S127-132 (2002).
16. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**, 1142-1162 (1973).
17. Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
18. Eisenbarth, S.C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol* **19**, 89-103 (2019).
19. Dress, R.J. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D(+) lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage. *Nat Immunol* **20**, 852-864 (2019).
20. Onai, N., Obata-Onai, A., Tussiwand, R., Lanzavecchia, A. & Manz, M.G. Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *J Exp Med* **203**, 227-238 (2006).
21. Merad, M. & Manz, M.G. Dendritic cell homeostasis. *Blood* **113**, 3418-3427 (2009).
22. Adolfsson, J. *et al.* Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* **15**, 659-669 (2001).
23. McKenna, H.J. *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**, 3489-3497 (2000).
24. Kingston, D. *et al.* The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood* **114**, 835-843 (2009).
25. Maraskovsky, E. *et al.* Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* **184**, 1953-1962 (1996).
26. Maraskovsky, E. *et al.* In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* **96**, 878-884 (2000).
27. Manfra, D.J. *et al.* Conditional expression of murine Flt3 ligand leads to expansion of multiple dendritic cell subsets in peripheral blood and tissues of transgenic mice. *J Immunol* **170**, 2843-2852 (2003).

28. Fong, L. *et al.* Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8809-8814 (2001).
29. Schmid, M.A., Kingston, D., Boddupalli, S. & Manz, M.G. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol Rev* **234**, 32-44 (2010).
30. Witmer-Pack, M.D. *et al.* Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *J Cell Sci* **104 (Pt 4)**, 1021-1029 (1993).
31. Lin, H. *et al.* Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* **320**, 807-811 (2008).
32. Bogunovic, M. *et al.* Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* **31**, 513-525 (2009).
33. Ginhoux, F. *et al.* The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* **206**, 3115-3130 (2009).
34. Inaba, K. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**, 1693-1702 (1992).
35. Caux, C. *et al.* CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* **184**, 695-706 (1996).
36. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-1118 (1994).
37. Daro, E. *et al.* Polyethylene glycol-modified GM-CSF expands CD11b(high)CD11c(high) but not CD11b(low)CD11c(high) murine dendritic cells in vivo: a comparative analysis with Flt3 ligand. *J Immunol* **165**, 49-58 (2000).
38. Banchereau, J. & Palucka, A.K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* **5**, 296-306 (2005).
39. Vremec, D. *et al.* The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur J Immunol* **27**, 40-44 (1997).
40. Vremec, D. & Shortman, K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* **159**, 565-573 (1997).
41. Greter, M. *et al.* Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity* **37**, 1050-1060 (2012).

42. King, I.L., Kroenke, M.A. & Segal, B.M. GM-CSF-dependent, CD103⁺ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *J Exp Med* **207**, 953-961 (2010).
43. Zhan, Y. *et al.* GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8⁽⁺⁾ spleen dendritic cells. *Eur J Immunol* **41**, 2585-2595 (2011).
44. Edelson, B.T. *et al.* Peripheral CD103⁺ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α ⁺ conventional dendritic cells. *J Exp Med* **207**, 823-836 (2010).
45. Varol, C. *et al.* Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* **31**, 502-512 (2009).
46. Gilliet, M. *et al.* The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **195**, 953-958 (2002).
47. Hamilton, J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 533-544 (2008).
48. Wu, Q. *et al.* The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues. *J Exp Med* **190**, 629-638 (1999).
49. Wang, Y.G., Kim, K.D., Wang, J., Yu, P. & Fu, Y.X. Stimulating lymphotoxin beta receptor on the dendritic cells is critical for their homeostasis and expansion. *J Immunol* **175**, 6997-7002 (2005).
50. Kabashima, K. *et al.* Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* **22**, 439-450 (2005).
51. Borkowski, T.A., Letterio, J.J., Farr, A.G. & Udey, M.C. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* **184**, 2417-2422 (1996).
52. Strobl, H. *et al.* flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood* **90**, 1425-1434 (1997).
53. Strobl, H. *et al.* TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34⁺ hemopoietic progenitors. *J Immunol* **157**, 1499-1507 (1996).
54. Geissmann, F. *et al.* Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* **187**, 961-966 (1998).

55. Kaplan, D.H. *et al.* Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* **204**, 2545-2552 (2007).
56. Suzuki, S. *et al.* Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11bhighCD8alpha-dendritic cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8981-8986 (2004).
57. Becker, A.M. *et al.* IRF-8 extinguishes neutrophil production and promotes dendritic cell lineage commitment in both myeloid and lymphoid mouse progenitors. *Blood* **119**, 2003-2012 (2012).
58. Li, L., Jin, H., Xu, J., Shi, Y. & Wen, Z. Irf8 regulates macrophage versus neutrophil fate during zebrafish primitive myelopoiesis. *Blood* **117**, 1359-1369 (2011).
59. Holtschke, T. *et al.* Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* **87**, 307-317 (1996).
60. Schiavoni, G. *et al.* ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J Exp Med* **196**, 1415-1425 (2002).
61. Tsujimura, H., Tamura, T. & Ozato, K. Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **170**, 1131-1135 (2003).
62. Tamura, T. *et al.* IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. *J Immunol* **174**, 2573-2581 (2005).
63. Taylor, P., Tamura, T., Morse, H.C., 3rd & Ozato, K. The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse. *Blood* **111**, 1942-1945 (2008).
64. Edelson, B.T. *et al.* Batf3-dependent CD11b(low/-) peripheral dendritic cells are GM-CSF-independent and are not required for Th cell priming after subcutaneous immunization. *PLoS One* **6**, e25660 (2011).
65. Esashi, E. *et al.* The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8. *Immunity* **28**, 509-520 (2008).
66. Laouar, Y., Welte, T., Fu, X.Y. & Flavell, R.A. STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* **19**, 903-912 (2003).
67. Hildner, K. *et al.* Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* **322**, 1097-1100 (2008).
68. Tussiwand, R. *et al.* Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* **490**, 502-507 (2012).

69. Meredith, M.M. *et al.* Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *J Exp Med* **209**, 1153-1165 (2012).
70. Meredith, M.M. *et al.* Zinc finger transcription factor zDC is a negative regulator required to prevent activation of classical dendritic cells in the steady state. *J Exp Med* **209**, 1583-1593 (2012).
71. Satpathy, A.T. *et al.* Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med* **209**, 1135-1152 (2012).
72. Cisse, B. *et al.* Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* **135**, 37-48 (2008).
73. Ghosh, H.S., Cisse, B., Bunin, A., Lewis, K.L. & Reizis, B. Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **33**, 905-916 (2010).
74. Hacker, C. *et al.* Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol* **4**, 380-386 (2003).
75. Kusunoki, T. *et al.* TH2 dominance and defective development of a CD8⁺ dendritic cell subset in Id2-deficient mice. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 136-142 (2003).
76. Wu, L., Nichogiannopoulou, A., Shortman, K. & Georgopoulos, K. Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* **7**, 483-492 (1997).
77. Anderson, K.L. *et al.* Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J Immunol* **164**, 1855-1861 (2000).
78. Guerriero, A., Langmuir, P.B., Spain, L.M. & Scott, E.W. PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood* **95**, 879-885 (2000).
79. Caton, M.L., Smith-Raska, M.R. & Reizis, B. Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8⁻ dendritic cells in the spleen. *J Exp Med* **204**, 1653-1664 (2007).
80. Lewis, K.L. *et al.* Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* **35**, 780-791 (2011).
81. Lawlor, D.A., Ward, F.E., Ennis, P.D., Jackson, A.P. & Parham, P. HLA-A and B polymorphisms predate the divergence of humans and chimpanzees. *Nature* **335**, 268-271 (1988).
82. Flajnik, M.F. & Kasahara, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* **11**, 47-59 (2010).
83. Neefjes, J., Jongstra, M.L., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **11**, 823-836 (2011).

84. Kobayashi, K.S. NLRC5/CITA: a novel regulator of class I major histocompatibility complex genes. *J Immunodeficient Disord* **1** (2012).
85. Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **12**, 557-569 (2012).
86. Michalek, M.T., Grant, E.P., Gramm, C., Goldberg, A.L. & Rock, K.L. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* **363**, 552-554 (1993).
87. Rock, K.L. *et al.* Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**, 761-771 (1994).
88. Groll, M. *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471 (1997).
89. Lowe, J. *et al.* Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539 (1995).
90. Fenteany, G. *et al.* Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268**, 726-731 (1995).
91. Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L. & Goldberg, A.L. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J* **20**, 2357-2366 (2001).
92. Sijts, E.J. & Kloetzel, P.M. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1491-1502 (2011).
93. Toes, R.E. *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* **194**, 1-12 (2001).
94. Reits, E. *et al.* Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**, 97-108 (2003).
95. Hinz, A. & Tampe, R. ABC transporters and immunity: mechanism of self-defense. *Biochemistry* **51**, 4981-4989 (2012).
96. Bevan, M.J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* **143**, 1283-1288 (1976).
97. Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K.L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**, 243-246 (1995).
98. Palmowski, M.J. *et al.* Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J Immunol* **177**, 983-990 (2006).

99. Di Pucchio, T. *et al.* Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol* **9**, 551-557 (2008).
100. Sengupta, D., Graham, M., Liu, X. & Cresswell, P. Proteasomal degradation within endocytic organelles mediates antigen cross-presentation. *EMBO J* **38**, e99266 (2019).
101. den Haan, J.M., Lehar, S.M. & Bevan, M.J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* **192**, 1685-1696 (2000).
102. Pooley, J.L., Heath, W.R. & Shortman, K. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* **166**, 5327-5330 (2001).
103. Helft, J. *et al.* GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* **42**, 1197-1211 (2015).
104. Xu, Y., Zhan, Y., Lew, A.M., Naik, S.H. & Kershaw, M.H. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* **179**, 7577-7584 (2007).
105. Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J.L. & Maliszewski, C.R. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* **96**, 3029-3039 (2000).
106. Naik, S.H. *et al.* Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* **174**, 6592-6597 (2005).
107. Kudo, S., Matsuno, K., Ezaki, T. & Ogawa, M. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* **185**, 777-784 (1997).
108. Moll, H., Fuchs, H., Blank, C. & Rollinghoff, M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* **23**, 1595-1601 (1993).
109. Knight, S.C., Hunt, R., Dore, C. & Medawar, P.B. Influence of dendritic cells on tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4495-4497 (1985).
110. Flamand, V. *et al.* Vaccination with tumor-antigen-pulsed dendritic cells induces in vivo resistance to a B cell lymphoma. *Adv Exp Med Biol* **329**, 611-616 (1993).
111. Grabbe, S. *et al.* Tumor antigen presentation by murine epidermal cells. *J Immunol* **146**, 3656-3661 (1991).

112. Mayordomo, J.I. *et al.* Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* **1**, 1297-1302 (1995).
113. Zitvogel, L. *et al.* IL-12-engineered dendritic cells serve as effective tumor vaccine adjuvants in vivo. *Ann N Y Acad Sci* **795**, 284-293 (1996).
114. Coffman, R.L., Sher, A. & Seder, R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**, 492-503 (2010).
115. Klechevsky, E. *et al.* Cross-priming CD8⁺ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* **116**, 1685-1697 (2010).
116. Sancho, D. *et al.* Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* **118**, 2098-2110 (2008).
117. Dakappagari, N. *et al.* Internalizing antibodies to the C-type lectins, L-SIGN and DC-SIGN, inhibit viral glycoprotein binding and deliver antigen to human dendritic cells for the induction of T cell responses. *J Immunol* **176**, 426-440 (2006).
118. Flacher, V., Sparber, F., Tripp, C.H., Romani, N. & Stoitzner, P. Targeting of epidermal Langerhans cells with antigenic proteins: attempts to harness their properties for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 1137-1147 (2009).
119. Hsu, F.J. *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **2**, 52-58 (1996).
120. Rosenblatt, J. *et al.* Vaccination with dendritic cell/tumor fusions following autologous stem cell transplant induces immunologic and clinical responses in multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res* **19**, 3640-3648 (2013).
121. Butterfield, L.H. *et al.* Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clin Cancer Res* **9**, 998-1008 (2003).
122. Paczesny, S. *et al.* Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8⁺ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells. *J Exp Med* **199**, 1503-1511 (2004).
123. Paczesny, S. *et al.* Measuring melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes elicited by dendritic cell vaccines with a tumor inhibition assay in vitro. *J Immunother* **28**, 148-157 (2005).
124. Mitchell, D.A. *et al.* Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients. *Nature* **519**, 366-369 (2015).
125. Van Tendeloo, V.F. *et al.* Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13824-13829 (2010).

126. Takahashi, H., Nakagawa, Y., Yokomuro, K. & Berzofsky, J.A. Induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by immunization with syngeneic irradiated HIV-1 envelope derived peptide-pulsed dendritic cells. *Int Immunol* **5**, 849-857 (1993).
127. Rosalia, R.A. *et al.* Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *Eur J Immunol* **43**, 2554-2565 (2013).
128. Binder, R.J., Anderson, K.M., Basu, S. & Srivastava, P.K. Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo. *J Immunol* **165**, 6029-6035 (2000).
129. Palucka, A.K. *et al.* Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J Immunother* **29**, 545-557 (2006).
130. Anguille, S., Smits, E.L., Lion, E., van Tendeloo, V.F. & Berneman, Z.N. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol* **15**, e257-267 (2014).
131. Robert, C. *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* **372**, 320-330 (2015).
132. Robert, C. *et al.* Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* **372**, 2521-2532 (2015).
133. Larkin, J., Hodi, F.S. & Wolchok, J.D. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* **373**, 1270-1271 (2015).
134. Motzer, R.J. *et al.* Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **373**, 1803-1813 (2015).
135. Vasaturo, A. *et al.* Clinical Implications of Co-Inhibitory Molecule Expression in the Tumor Microenvironment for DC Vaccination: A Game of Stop and Go. *Front Immunol* **4**, 417 (2013).
136. Garg, A.D., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J. & Agostinis, P. Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends Immunol* **38**, 577-593 (2017).
137. Wilgenhof, S. *et al.* Long-term clinical outcome of melanoma patients treated with messenger RNA-electroporated dendritic cell therapy following complete resection of metastases. *Cancer Immunol Immunother* **64**, 381-388 (2015).
138. Ribas, A. *et al.* Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* **15**, 6267-6276 (2009).

139. Manickan, E., Kanangat, S., Rouse, R.J., Yu, Z. & Rouse, B.T. Enhancement of immune response to naked DNA vaccine by immunization with transfected dendritic cells. *J Leukoc Biol* **61**, 125-132 (1997).
140. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* **9**, 833-844 (2009).
141. Capone, M., Romagnoli, P., Beermann, F., MacDonald, H.R. & van Meerwijk, J.P. Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood* **97**, 1336-1342 (2001).
142. Ramsdell, F., Lantz, T. & Fowlkes, B.J. A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* **246**, 1038-1041 (1989).
143. van Meerwijk, J.P. *et al.* Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med* **185**, 377-383 (1997).
144. Rossjohn, J. *et al.* T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu Rev Immunol* **33**, 169-200 (2015).
145. Surh, C.D. & Sprent, J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* **29**, 848-862 (2008).
146. Seddon, B. & Zamoyska, R. Regulation of peripheral T-cell homeostasis by receptor signalling. *Curr Opin Immunol* **15**, 321-324 (2003).
147. Palacios, E.H. & Weiss, A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* **23**, 7990-8000 (2004).
148. Parsons, S.J. & Parsons, J.T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**, 7906-7909 (2004).
149. Seddon, B. & Zamoyska, R. TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells. *J Immunol* **169**, 2997-3005 (2002).
150. Nika, K. *et al.* Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* **32**, 766-777 (2010).
151. Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M. & Bolen, J.B. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**, 301-308 (1988).
152. Artyomov, M.N., Lis, M., Devadas, S., Davis, M.M. & Chakraborty, A.K. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16916-16921 (2010).

153. Deindl, S. *et al.* Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70. *Cell* **129**, 735-746 (2007).
154. Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. & Jordan, M.S. T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**, 591-619 (2009).
155. Paz, P.E. *et al.* Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem J* **356**, 461-471 (2001).
156. Cantrell, D.A. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* **105**, 369-374 (2002).
157. Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P. & Samelson, L.E. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**, 83-92 (1998).
158. Finco, T.S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L.E. & Weiss, A. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**, 617-626 (1998).
159. Blattman, J.N. *et al.* Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 657-664 (2002).
160. Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H.K., Hasan, M. & Albert, M.L. Enumeration of human antigen-specific naive CD8⁺ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* **115**, 3718-3725 (2010).
161. Obar, J.J., Khanna, K.M. & Lefrancois, L. Endogenous naive CD8⁺ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* **28**, 859-869 (2008).
162. Valitutti, S. The Serial Engagement Model 17 Years After: From TCR Triggering to Immunotherapy. *Front Immunol* **3**, 272 (2012).
163. Kjer-Nielsen, L. *et al.* A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity* **18**, 53-64 (2003).
164. Krogsgaard, M. *et al.* Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature* **434**, 238-243 (2005).
165. Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F. & Alarcon, B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* **109**, 901-912 (2002).
166. Gil, D., Schrum, A.G., Alarcon, B. & Palmer, E. T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes. *J Exp Med* **201**, 517-522 (2005).

167. Beddoe, T. *et al.* Antigen ligation triggers a conformational change within the constant domain of the alphabeta T cell receptor. *Immunity* **30**, 777-788 (2009).
168. Delon, J. *et al.* CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. *Immunity* **9**, 467-473 (1998).
169. Boniface, J.J. *et al.* Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected]. *Immunity* **9**, 459-466 (1998).
170. Kersh, G.J., Kersh, E.N., Fremont, D.H. & Allen, P.M. High- and low-potency ligands with similar affinities for the TCR: the importance of kinetics in TCR signaling. *Immunity* **9**, 817-826 (1998).
171. Kalergis, A.M. *et al.* Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat Immunol* **2**, 229-234 (2001).
172. Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H. & Lanzavecchia, A. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* **181**, 577-584 (1995).
173. Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E. & Lanzavecchia, A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375**, 148-151 (1995).
174. Hudrisier, D. *et al.* The efficiency of antigen recognition by CD8⁺ CTL clones is determined by the frequency of serial TCR engagement. *J Immunol* **161**, 553-562 (1998).
175. Madrenas, J., Chau, L.A., Smith, J., Bluestone, J.A. & Germain, R.N. The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. *J Exp Med* **185**, 219-229 (1997).
176. Morris, G.P. & Allen, P.M. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat Immunol* **13**, 121-128 (2012).
177. Dustin, M.L. & Depoil, D. New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat Rev Immunol* **11**, 672-684 (2011).
178. Huppa, J.B. & Davis, M.M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983 (2003).
179. Yokosuka, T. & Saito, T. Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol Rev* **229**, 27-40 (2009).
180. Yokosuka, T. *et al.* Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol* **6**, 1253-1262 (2005).
181. Purbhoo, M.A. *et al.* Dynamics of subsynaptic vesicles and surface microclusters at the immunological synapse. *Sci Signal* **3**, ra36 (2010).

182. Saito, T. & Yokosuka, T. Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells. *Curr Opin Immunol* **18**, 305-313 (2006).
183. Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T. & Dustin, M.L. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* **25**, 117-127 (2006).
184. Dustin, M.L. Stop and go traffic to tune T cell responses. *Immunity* **21**, 305-314 (2004).
185. Lillemeier, B.F. *et al.* TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation. *Nat Immunol* **11**, 90-96 (2010).
186. Fooksman, D.R. *et al.* Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol* **28**, 79-105 (2010).
187. Smith, A. *et al.* A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol* **170**, 141-151 (2005).
188. D'Oro, U. & Ashwell, J.D. Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J Immunol* **162**, 1879-1883 (1999).
189. Lafferty, K.J. & Woolnough, J. The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunol Rev* **35**, 231-262 (1977).
190. 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).
191. Schwartz, R.H. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**, 305-334 (2003).
192. Sperling, A.I. *et al.* CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J Immunol* **157**, 3909-3917 (1996).
193. Howland, K.C., Ausubel, L.J., London, C.A. & Abbas, A.K. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *J Immunol* **164**, 4465-4470 (2000).
194. Frauwirth, K.A. *et al.* The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* **16**, 769-777 (2002).
195. Janardhan, S.V., Praveen, K., Marks, R. & Gajewski, T.F. Evidence implicating the Ras pathway in multiple CD28 costimulatory functions in CD4⁺ T cells. *PLoS One* **6**, e24931 (2011).
196. Okkenhaug, K. *et al.* A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nat Immunol* **2**, 325-332 (2001).

197. Kirchhoff, S., Muller, W.W., Li-Weber, M. & Krammer, P.H. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* **30**, 2765-2774 (2000).
198. Burr, J.S. *et al.* Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J Immunol* **166**, 5331-5335 (2001).
199. Radvanyi, L.G. *et al.* CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* **156**, 1788-1798 (1996).
200. Rudd, C.E. & Schneider, H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **3**, 544-556 (2003).
201. Schneider, H., Valk, E., Leung, R. & Rudd, C.E. CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B (PKB/AKT) sustains T-cell anergy without cell death. *PLoS One* **3**, e3842 (2008).
202. Boise, L.H. *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity*. 1995. 3: 87-98. *J Immunol* **185**, 3788-3799 (2010).
203. Dubois, P.M., Pihlgren, M., Tomkowiak, M., Van Mechelen, M. & Marvel, J. Tolerant CD8 T cells induced by multiple injections of peptide antigen show impaired TCR signaling and altered proliferative responses in vitro and in vivo. *J Immunol* **161**, 5260-5267 (1998).
204. Zha, Y. *et al.* T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase- α . *Nat Immunol* **7**, 1166-1173 (2006).
205. Croft, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* **9**, 271-285 (2009).
206. Chen, L. & Flies, D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* **13**, 227-242 (2013).
207. 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).
208. Fuse, S., Bellfy, S., Yagita, H. & Usherwood, E.J. CD8⁺ T cell dysfunction and increase in murine gammaherpesvirus latent viral burden in the absence of 4-1BB ligand. *J Immunol* **178**, 5227-5236 (2007).
209. Takahashi, C., Mittler, R.S. & Vella, A.T. Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* **162**, 5037-5040 (1999).

210. Shuford, W.W. *et al.* 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8⁺ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* **186**, 47-55 (1997).
211. Pearce, E.L. & Shen, H. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J Immunol* **179**, 2074-2081 (2007).
212. Welsh, R.M., Bahl, K., Marshall, H.D. & Urban, S.L. Type 1 interferons and antiviral CD8 T-cell responses. *PLoS Pathog* **8**, e1002352 (2012).
213. 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).
214. Vignali, D.A. & Kuchroo, V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* **13**, 722-728 (2012).
215. 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).
216. Henry, C.J., Ornelles, D.A., Mitchell, L.M., Brzoza-Lewis, K.L. & Hiltbold, E.M. IL-12 produced by dendritic cells augments CD8⁺ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *J Immunol* **181**, 8576-8584 (2008).
217. 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).
218. Staron, M.M. *et al.* The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection. *Immunity* **41**, 802-814 (2014).
219. 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).
220. Klebanoff, C.A. *et al.* Inhibition of AKT signaling uncouples T cell differentiation from expansion for receptor-engineered adoptive immunotherapy. *JCI Insight* **2** (2017).
221. Gonzalez-Navajas, J.M., Lee, J., David, M. & Raz, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol* **12**, 125-135 (2012).
222. 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).
223. Muller, U. *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918-1921 (1994).

224. Marshall, H.D., Prince, A.L., Berg, L.J. & Welsh, R.M. IFN-alpha beta and self-MHC divert CD8 T cells into a distinct differentiation pathway characterized by rapid acquisition of effector functions. *J Immunol* **185**, 1419-1428 (2010).
225. 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).
226. 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).
227. 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).
228. Kalia, V. *et al.* Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* **32**, 91-103 (2010).
229. 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).
230. 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).
231. 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).
232. Bennett, S.R. *et al.* Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**, 478-480 (1998).
233. Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Miller, J.F. & Heath, W.R. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* **186**, 65-70 (1997).
234. Hervas-Stubbs, S., Olivier, A., Boisgerault, F., Thieblemont, N. & Leclerc, C. TLR3 ligand stimulates fully functional memory CD8+ T cells in the absence of CD4+ T-cell help. *Blood* **109**, 5318-5326 (2007).
235. Oh, S. *et al.* IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5201-5206 (2008).
236. 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).

237. 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).
238. Sokke Umeshappa, C. *et al.* CD154 and IL-2 signaling of CD4⁺ T cells play a critical role in multiple phases of CD8⁺ CTL responses following adenovirus vaccination. *PLoS One* **7**, e47004 (2012).
239. Zloza, A. *et al.* NKG2D signaling on CD8(+) T cells represses T-bet and rescues CD4-unhelped CD8(+) T cell memory recall but not effector responses. *Nat Med* **18**, 422-428 (2012).
240. 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).
241. 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).
242. Janssen, E.M. *et al.* CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852-856 (2003).
243. 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).
244. Azadniv, M., Bowers, W.J., Topham, D.J. & Crispe, I.N. CD4⁺ T cell effects on CD8⁺ T cell location defined using bioluminescence. *PLoS One* **6**, e16222 (2011).
245. Castellino, F. *et al.* Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890-895 (2006).
246. 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).
247. Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* **111**, 837-851 (2002).
248. 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).
249. Hickman, H.D. *et al.* CXCR3 chemokine receptor enables local CD8(+) T cell migration for the destruction of virus-infected cells. *Immunity* **42**, 524-537 (2015).
250. Zhang, N. & Bevan, M.J. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* **35**, 161-168 (2011).
251. Cox, M.A., Kahan, S.M. & Zajac, A.J. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology* **435**, 157-169 (2013).

252. Cox, M.A., Harrington, L.E. & Zajac, A.J. Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends Immunol* **32**, 180-186 (2011).
253. Obar, J.J. *et al.* Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *J Immunol* **187**, 4967-4978 (2011).
254. 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).
255. 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).
256. Intlekofer, A.M. *et al.* Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* **6**, 1236-1244 (2005).
257. 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).
258. Paley, M.A. *et al.* Technical Advance: Fluorescent reporter reveals insights into eomesodermin biology in cytotoxic lymphocytes. *J Leukoc Biol* **93**, 307-315 (2013).
259. Glimcher, L.H., Townsend, M.J., Sullivan, B.M. & Lord, G.M. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat Rev Immunol* **4**, 900-911 (2004).
260. Pearce, E.L. *et al.* Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* **302**, 1041-1043 (2003).
261. Lotem, J. *et al.* Runx3-mediated transcriptional program in cytotoxic lymphocytes. *PLoS One* **8**, e80467 (2013).
262. 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).
263. Ichii, H. *et al.* Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* **3**, 558-563 (2002).
264. Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y. & Tokuhiya, T. Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* **173**, 883-891 (2004).
265. Manders, P.M. *et al.* BCL6b mediates the enhanced magnitude of the secondary response of memory CD8⁺ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7418-7425 (2005).
266. Yoshida, K. *et al.* Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8⁺ T cells. *Eur J Immunol* **36**, 3146-3156 (2006).

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* **17**, 422-432 (2016).
268. 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).
269. 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).
270. 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).
271. Cannarile, M.A. *et al.* Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. *Nat Immunol* **7**, 1317-1325 (2006).
272. 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).
273. Kurachi, M. *et al.* The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. *Nat Immunol* **15**, 373-383 (2014).
274. Grusdat, M. *et al.* IRF4 and BATF are critical for CD8(+) T-cell function following infection with LCMV. *Cell Death Differ* **21**, 1050-1060 (2014).
275. R. Anthony Barnitz, M.K., Madeleine E. Lemieux, Nir Yosef, Michael A. DiIorio, Kathleen B. Yates, Jernej Godec, Pamela Odorizzi, Aviv Regev, E. John Wherry and W. Nicholas Haining. The Transcription Factor BATF Controls CD8+ T Cell Effector Differentiation. *Blood* **122** (2013).
276. Man, K. *et al.* The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat Immunol* **14**, 1155-1165 (2013).
277. Yao, S. *et al.* Interferon regulatory factor 4 sustains CD8(+) T cell expansion and effector differentiation. *Immunity* **39**, 833-845 (2013).
278. Raczkowski, F. *et al.* The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 15019-15024 (2013).
279. Mittrucker, H.W. *et al.* Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* **275**, 540-543 (1997).
280. Krauss, S., Brand, M.D. & Buttgerit, F. Signaling takes a breath--new quantitative perspectives on bioenergetics and signal transduction. *Immunity* **15**, 497-502 (2001).

281. Roos, D. & Loos, J.A. Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. II. Relative importance of glycolysis and oxidative phosphorylation on phytohaemagglutinin stimulation. *Exp Cell Res* **77**, 127-135 (1973).
282. Rathmell, J.C., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Frauwirth, K.A. & Thompson, C.B. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell* **6**, 683-692 (2000).
283. Kaech, S.M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **12**, 749-761 (2012).
284. Michalek, R.D. & Rathmell, J.C. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol Rev* **236**, 190-202 (2010).
285. Pearce, E.L. Metabolism in T cell activation and differentiation. *Curr Opin Immunol* **22**, 314-320 (2010).
286. Chi, H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat Rev Immunol* **12**, 325-338 (2012).
287. Wieman, H.L., Wofford, J.A. & Rathmell, J.C. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell* **18**, 1437-1446 (2007).
288. Araki, K. *et al.* mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* **460**, 108-112 (2009).
289. Pearce, E.L. *et al.* Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* **460**, 103-107 (2009).
290. Sinclair, L.V. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* **9**, 513-521 (2008).
291. Barata, J.T. *et al.* Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med* **200**, 659-669 (2004).
292. Elstrom, R.L. *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* **64**, 3892-3899 (2004).
293. Jones, R.G. & Thompson, C.B. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity* **27**, 173-178 (2007).
294. Rathmell, J.C., Elstrom, R.L., Cinalli, R.M. & Thompson, C.B. Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma. *Eur J Immunol* **33**, 2223-2232 (2003).

295. Edinger, A.L. & Thompson, C.B. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* **13**, 2276-2288 (2002).
296. DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C.B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* **7**, 11-20 (2008).
297. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314 (1956).
298. Krisher, R.L. & Prather, R.S. A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Mol Reprod Dev* **79**, 311-320 (2012).
299. Redel, B.K. *et al.* Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the Warburg Effect. *Mol Reprod Dev* **79**, 262-271 (2012).
300. Abdel-Haleem, A.M. *et al.* The Emerging Facets of Non-Cancerous Warburg Effect. *Front Endocrinol (Lausanne)* **8**, 279 (2017).
301. Fox, C.J., Hammerman, P.S. & Thompson, C.B. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol* **5**, 844-852 (2005).
302. 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).
303. Rathmell, J.C., Farkash, E.A., Gao, W. & Thompson, C.B. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* **167**, 6869-6876 (2001).
304. Lum, J.J., DeBerardinis, R.J. & Thompson, C.B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 439-448 (2005).
305. Kay, J.E., Kromwel, L., Doe, S.E. & Denyer, M. Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. *Immunology* **72**, 544-549 (1991).
306. Shaw, R.J. *et al.* The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**, 91-99 (2004).
307. Inoki, K. *et al.* TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* **126**, 955-968 (2006).
308. Vander Heiden, M.G. *et al.* Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* **21**, 5899-5912 (2001).
309. Alves, N.L. *et al.* The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity* **24**, 703-716 (2006).
310. Bensinger, S.J. *et al.* LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* **134**, 97-111 (2008).

311. Mellor, A.L. & Munn, D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* **4**, 762-774 (2004).
312. Angelini, G. *et al.* Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1491-1496 (2002).
313. Edinger, A.L. & Thompson, C.B. Antigen-presenting cells control T cell proliferation by regulating amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1107-1109 (2002).
314. Badovinac, V.P., Porter, B.B. & Harty, J.T. CD8⁺ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* **5**, 809-817 (2004).
315. Prlic, M. & Bevan, M.J. Exploring regulatory mechanisms of CD8⁺ T cell contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16689-16694 (2008).
316. 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).
317. Beverley, P.C. Functional analysis of human T cell subsets defined by CD45 isoform expression. *Semin Immunol* **4**, 35-41 (1992).
318. Buckle, A.M. & Hogg, N. Human memory T cells express intercellular adhesion molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon-gamma. *Eur J Immunol* **20**, 337-341 (1990).
319. Budd, R.C., Cerottini, J.C. & MacDonald, H.R. Selectively increased production of interferon-gamma by subsets of Lyt-2⁺ and L3T4⁺ T cells identified by expression of Pgp-1. *J Immunol* **138**, 3583-3586 (1987).
320. Butterfield, K., Fathman, C.G. & Budd, R.C. A subset of memory CD4⁺ helper T lymphocytes identified by expression of Pgp-1. *J Exp Med* **169**, 1461-1466 (1989).
321. Cerottini, J.C., Budd, R.C. & MacDonald, H.R. Phenotypic identification of memory cytolytic T lymphocytes in a subset of Lyt-2⁺ cells. *Ann N Y Acad Sci* **532**, 68-75 (1988).
322. 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).
323. Curtsinger, J.M., Lins, D.C. & Mescher, M.F. CD8⁺ memory T cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) are more sensitive than naive cells to (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen. *J Immunol* **160**, 3236-3243 (1998).
324. Mackay, C.R., Marston, W.L. & Dudler, L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* **171**, 801-817 (1990).

325. McFarland, H.I., Nahill, S.R., Maciaszek, J.W. & Welsh, R.M. CD11b (Mac-1): a marker for CD8⁺ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. *J Immunol* **149**, 1326-1333 (1992).
326. Okumura, M. *et al.* Age-related accumulation of LFA-1^{high} cells in a CD8⁺CD45RA^{high} T cell population. *Eur J Immunol* **23**, 1057-1063 (1993).
327. Walunas, T.L., Bruce, D.S., Dustin, L., Loh, D.Y. & Bluestone, J.A. Ly-6C is a marker of memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* **155**, 1873-1883 (1995).
328. Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F. & Sprent, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* **8**, 591-599 (1998).
329. Wherry, E.J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* **4**, 225-234 (2003).
330. Rogers, P.R., Dubey, C. & Swain, S.L. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* **164**, 2338-2346 (2000).
331. Pihlgren, M., Dubois, P.M., Tomkowiak, M., Sjogren, T. & Marvel, J. Resting memory CD8⁺ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J Exp Med* **184**, 2141-2151 (1996).
332. Kearney, E.R., Pape, K.A., Loh, D.Y. & Jenkins, M.K. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* **1**, 327-339 (1994).
333. Constant, S. *et al.* Are primed CD4⁺ T lymphocytes different from unprimed cells? *Eur J Immunol* **24**, 1073-1079 (1994).
334. Beadling, C. & Slifka, M.K. Differential regulation of virus-specific T-cell effector functions following activation by peptide or innate cytokines. *Blood* **105**, 1179-1186 (2005).
335. 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).
336. Soudja, S.M., Ruiz, A.L., Marie, J.C. & Lauvau, G. Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity* **37**, 549-562 (2012).
337. Richer, M.J., Nolz, J.C. & Harty, J.T. Pathogen-specific inflammatory milieu tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. *Immunity* **38**, 140-152 (2013).
338. Richer, M.J. *et al.* Inflammatory IL-15 is required for optimal memory T cell responses. *J Clin Invest* **125**, 3477-3490 (2015).

339. King, D.P. & Takahashi, J.S. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* **23**, 713-742 (2000).
340. Ko, C.H. & Takahashi, J.S. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**, R271-277 (2006).
341. Partch, C.L., Green, C.B. & Takahashi, J.S. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol* **24**, 90-99 (2014).
342. Dibner, C., Schibler, U. & Albrecht, U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* **72**, 517-549 (2010).
343. Zhang, R., Lahens, N.F., Ballance, H.I., Hughes, M.E. & Hogenesch, J.B. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 16219-16224 (2014).
344. Czeisler, C.A. *et al.* Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med* **332**, 6-11 (1995).
345. Foster, R.G. Shedding light on the biological clock. *Neuron* **20**, 829-832 (1998).
346. Stephan, F.K. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 1583-1586 (1972).
347. Moore, R.Y. Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med* **48**, 253-266 (1997).
348. Lehman, M.N. *et al.* Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci* **7**, 1626-1638 (1987).
349. Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C. & Menaker, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975-978 (1990).
350. Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P.A. & Lehman, M.N. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* **382**, 810-813 (1996).
351. Morin, L.P. & Allen, C.N. The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev* **51**, 1-60 (2006).
352. Vujovic, N., Davidson, A.J. & Menaker, M. Sympathetic input modulates, but does not determine, phase of peripheral circadian oscillators. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R355-360 (2008).

353. Balsalobre, A., Marcacci, L. & Schibler, U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol* **10**, 1291-1294 (2000).
354. Le Minh, N., Damiola, F., Tronche, F., Schutz, G. & Schibler, U. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J* **20**, 7128-7136 (2001).
355. Nakamura, W. *et al.* In vivo monitoring of circadian timing in freely moving mice. *Curr Biol* **18**, 381-385 (2008).
356. Guo, H., Brewer, J.M., Champhekar, A., Harris, R.B. & Bittman, E.L. Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3111-3116 (2005).
357. Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J. & Herzog, E.D. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* **8**, 476-483 (2005).
358. Brown, S.A., Zimbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N. & Schibler, U. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol* **12**, 1574-1583 (2002).
359. Damiola, F. *et al.* Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* **14**, 2950-2961 (2000).
360. Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. & Menaker, M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* **291**, 490-493 (2001).
361. Storch, K.F. *et al.* Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell* **130**, 730-741 (2007).
362. Tosini, G. & Menaker, M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* **272**, 419-421 (1996).
363. Lamia, K.A., Storch, K.F. & Weitz, C.J. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15172-15177 (2008).
364. Granados-Fuentes, D., Tseng, A. & Herzog, E.D. A circadian clock in the olfactory bulb controls olfactory responsivity. *J Neurosci* **26**, 12219-12225 (2006).
365. Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J.S. & Schibler, U. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol* **5**, e34 (2007).
366. Kornmann, B., Schaad, O., Reinke, H., Saini, C. & Schibler, U. Regulation of circadian gene expression in liver by systemic signals and hepatocyte oscillators. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**, 319-330 (2007).

367. Ebling, F.J. The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol* **50**, 109-132 (1996).
368. Hannibal, J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* **309**, 73-88 (2002).
369. Harrington, M.E. The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev* **21**, 705-727 (1997).
370. Brown, T.M. & Piggins, H.D. Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock. *Prog Neurobiol* **82**, 229-255 (2007).
371. Albers, H.E. & Ferris, C.F. Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neurosci Lett* **50**, 163-168 (1984).
372. Morin, L.P. Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Exp Neurol* **243**, 4-20 (2013).
373. Yoo, S.H. *et al.* PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5339-5346 (2004).
374. Balsalobre, A., Damiola, F. & Schibler, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**, 929-937 (1998).
375. Yamazaki, S. *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-685 (2000).
376. Nagoshi, E. *et al.* Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* **119**, 693-705 (2004).
377. Ueyama, T. *et al.* Suprachiasmatic nucleus: a central autonomic clock. *Nat Neurosci* **2**, 1051-1053 (1999).
378. Kalsbeek, A., Fliers, E., Hofman, M.A., Swaab, D.F. & Buijs, R.M. Vasopressin and the output of the hypothalamic biological clock. *J Neuroendocrinol* **22**, 362-372 (2010).
379. Kalsbeek, A., La Fleur, S., Van Heijningen, C. & Buijs, R.M. Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci* **24**, 7604-7613 (2004).
380. Cailotto, C. *et al.* The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur J Neurosci* **22**, 2531-2540 (2005).

381. Gillette, M.U. & McArthur, A.J. Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. *Behav Brain Res* **73**, 135-139 (1996).
382. Arendt, J. & Broadway, J. Light and melatonin as zeitgebers in man. *Chronobiol Int* **4**, 273-282 (1987).
383. Armstrong, S.M., Cassone, V.M., Chesworth, M.J., Redman, J.R. & Short, R.V. Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J Neural Transm Suppl* **21**, 375-394 (1986).
384. Cassone, V.M., Chesworth, M.J. & Armstrong, S.M. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav* **36**, 1111-1121 (1986).
385. Cassone, V.M., Chesworth, M.J. & Armstrong, S.M. Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin. *J Biol Rhythms* **1**, 219-229 (1986).
386. Redman, J.R. & Armstrong, S.M. Reentrainment of rat circadian activity rhythms: effects of melatonin. *J Pineal Res* **5**, 203-215 (1988).
387. Sack, R.L., Brandes, R.W., Kendall, A.R. & Lewy, A.J. Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *N Engl J Med* **343**, 1070-1077 (2000).
388. Liu, C. *et al.* Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* **19**, 91-102 (1997).
389. Shimomura, K. *et al.* Genetic suppression of the circadian Clock mutation by the melatonin biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8399-8403 (2010).
390. Reppert, S.M. & Weaver, D.R. Melatonin madness. *Cell* **83**, 1059-1062 (1995).
391. Scheer, F.A., Van Montfrans, G.A., van Someren, E.J., Mairuhu, G. & Buijs, R.M. Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension* **43**, 192-197 (2004).
392. Campino, C. *et al.* Melatonin exerts direct inhibitory actions on ACTH responses in the human adrenal gland. *Horm Metab Res* **43**, 337-342 (2011).
393. Torres-Farfan, C. *et al.* Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J Physiol* **554**, 841-856 (2004).
394. Torres-Farfan, C. *et al.* mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 450-458 (2003).
395. Balsalobre, A. *et al.* Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* **289**, 2344-2347 (2000).

396. Buijs, R.M. *et al.* Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci* **11**, 1535-1544 (1999).
397. Oster, H., Damerow, S., Hut, R.A. & Eichele, G. Transcriptional profiling in the adrenal gland reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes and nucleosome assembly genes. *J Biol Rhythms* **21**, 350-361 (2006).
398. Oster, H. *et al.* The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab* **4**, 163-173 (2006).
399. Reddy, A.B. *et al.* Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology* **45**, 1478-1488 (2007).
400. Kiessling, S., Eichele, G. & Oster, H. Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. *J Clin Invest* **120**, 2600-2609 (2010).
401. Kalsbeek, A., Buijs, R.M., Engelmann, M., Wotjak, C.T. & Landgraf, R. In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* **682**, 75-82 (1995).
402. Schwartz, W.J. & Reppert, S.M. Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* **5**, 2771-2778 (1985).
403. Marcheva, B. *et al.* Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* **466**, 627-631 (2010).
404. Sadacca, L.A., Lamia, K.A., deLemos, A.S., Blum, B. & Weitz, C.J. An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia* **54**, 120-124 (2011).
405. Barclay, J.L. *et al.* High-fat diet-induced hyperinsulinemia and tissue-specific insulin resistance in Cry-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **304**, E1053-1063 (2013).
406. Zhao, Y. *et al.* Loss of mPer2 increases plasma insulin levels by enhanced glucose-stimulated insulin secretion and impaired insulin clearance in mice. *FEBS Lett* **586**, 1306-1311 (2012).
407. Tahara, Y., Otsuka, M., Fuse, Y., Hirao, A. & Shibata, S. Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of Per2 and Rev-erb α with shifts in the liver clock. *J Biol Rhythms* **26**, 230-240 (2011).
408. Yamajuku, D. *et al.* Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. *Sci Rep* **2**, 439 (2012).

409. Yannielli, P.C., Molyneux, P.C., Harrington, M.E. & Golombek, D.A. Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J Neurosci* **27**, 2890-2895 (2007).
410. Gavrilu, A. *et al.* Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 2838-2843 (2003).
411. Scheer, F.A. *et al.* Day/night variations of high-molecular-weight adiponectin and lipocalin-2 in healthy men studied under fed and fasted conditions. *Diabetologia* **53**, 2401-2405 (2010).
412. Hashinaga, T. *et al.* Modulation by adiponectin of circadian clock rhythmicity in model mice for metabolic syndrome. *Endocr J* **60**, 483-492 (2013).
413. Prosser, R.A. & Bergeron, H.E. Leptin phase-advances the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Neurosci Lett* **336**, 139-142 (2003).
414. Aschoff, J., Gerecke, U., Wever, R., . Phasenbeziehungen zwischen den circadianen Perioden der Aktivit~t und der Kerntemperatur beim Menschen. *Pfliigers Arch* **295**, 173-183 (1967).
415. Abraham, U. *et al.* Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Mol Syst Biol* **6**, 438 (2010).
416. Buhr, E.D., Yoo, S.H. & Takahashi, J.S. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* **330**, 379-385 (2010).
417. Hara, R. *et al.* Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **6**, 269-278 (2001).
418. Pezuk, P., Mohawk, J.A., Yoshikawa, T., Sellix, M.T. & Menaker, M. Circadian organization is governed by extra-SCN pacemakers. *J Biol Rhythms* **25**, 432-441 (2010).
419. Stephan, F.K., Swann, J.M. & Sisk, C.L. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Neural Biol* **25**, 545-554 (1979).
420. Davidson, A.J. *et al.* Food-anticipatory activity persists after olfactory bulb ablation in the rat. *Physiol Behav* **72**, 231-235 (2001).
421. Mistlberger, R.E. & Rechtschaffen, A. Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol Behav* **33**, 227-235 (1984).
422. Landry, G.J., Yamakawa, G.R. & Mistlberger, R.E. Robust food anticipatory circadian rhythms in rats with complete ablation of the thalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* **1141**, 108-118 (2007).

423. Davidson, A.J., Poole, A.S., Yamazaki, S. & Menaker, M. Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav* **2**, 32-39 (2003).
424. Steeves, T.D. *et al.* Molecular cloning and characterization of the human CLOCK gene: expression in the suprachiasmatic nuclei. *Genomics* **57**, 189-200 (1999).
425. Sun, Z.S. *et al.* RIGUI, a putative mammalian ortholog of the Drosophila period gene. *Cell* **90**, 1003-1011 (1997).
426. Tei, H. *et al.* Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature* **389**, 512-516 (1997).
427. Vitaterna, M.H. *et al.* Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**, 719-725 (1994).
428. King, D.P. *et al.* Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* **89**, 641-653 (1997).
429. Vitaterna, M.H. *et al.* The mouse Clock mutation reduces circadian pacemaker amplitude and enhances efficacy of resetting stimuli and phase-response curve amplitude. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9327-9332 (2006).
430. Debruyne, J.P. *et al.* A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* **50**, 465-477 (2006).
431. Reick, M., Garcia, J.A., Dudley, C. & McKnight, S.L. NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* **293**, 506-509 (2001).
432. Thresher, R.J. *et al.* Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science* **282**, 1490-1494 (1998).
433. van der Horst, G.T. *et al.* Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **398**, 627-630 (1999).
434. Vitaterna, M.H. *et al.* Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12114-12119 (1999).
435. Zheng, B. *et al.* Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* **105**, 683-694 (2001).
436. Bae, K. *et al.* Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* **30**, 525-536 (2001).
437. Cermakian, N., Monaco, L., Pando, M.P., Dierich, A. & Sassone-Corsi, P. Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the Period1 gene. *EMBO J* **20**, 3967-3974 (2001).

438. Zheng, B. *et al.* The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* **400**, 169-173 (1999).
439. Shearman, L.P., Jin, X., Lee, C., Reppert, S.M. & Weaver, D.R. Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol* **20**, 6269-6275 (2000).
440. Bunger, M.K. *et al.* Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**, 1009-1017 (2000).
441. Kondratov, R.V., Kondratova, A.A., Gorbacheva, V.Y., Vykhovanets, O.V. & Antoch, M.P. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev* **20**, 1868-1873 (2006).
442. McDearmon, E.L. *et al.* Dissecting the functions of the mammalian clock protein BMAL1 by tissue-specific rescue in mice. *Science* **314**, 1304-1308 (2006).
443. Sun, Y. *et al.* The mortality of MOP3 deficient mice with a systemic functional failure. *J Biomed Sci* **13**, 845-851 (2006).
444. Takahashi, J.S. Circadian-clock regulation of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 301-309 (1993).
445. Dunlap, J.C. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290 (1999).
446. Akhtar, R.A. *et al.* Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* **12**, 540-550 (2002).
447. Duffield, G.E. *et al.* Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol* **12**, 551-557 (2002).
448. Hughes, M.E. *et al.* Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genet* **5**, e1000442 (2009).
449. Panda, S. *et al.* Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307-320 (2002).
450. Panda, S., Hogenesch, J.B. & Kay, S.A. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**, 329-335 (2002).
451. Miller, B.H. *et al.* Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3342-3347 (2007).
452. Keller, M. *et al.* A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21407-21412 (2009).

453. Kervezee, L., Cuesta, M., Cermakian, N. & Boivin, D.B. Simulated night shift work induces circadian misalignment of the human peripheral blood mononuclear cell transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 5540-5545 (2018).
454. Oishi, K. *et al.* Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem* **278**, 41519-41527 (2003).
455. Nobis, C.C. *et al.* The circadian clock of CD8 T cells modulates their early response to vaccination and the rhythmicity of related signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2019).
456. Duffield, G.E. DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J Neuroendocrinol* **15**, 991-1002 (2003).
457. Storch, K.F. *et al.* Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* **417**, 78-83 (2002).
458. Akashi, M. & Takumi, T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 441-448 (2005).
459. Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V. & Cermakian, N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* **20**, 391-403 (2005).
460. Sato, T.K. *et al.* A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* **43**, 527-537 (2004).
461. Turek, F.W. *et al.* Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* **308**, 1043-1045 (2005).
462. Garcia, J.A. *et al.* Impaired cued and contextual memory in NPAS2-deficient mice. *Science* **288**, 2226-2230 (2000).
463. Menet, J.S., Pescatore, S. & Rosbash, M. CLOCK:BMAL1 is a pioneer-like transcription factor. *Genes Dev* **28**, 8-13 (2014).
464. Trott, A.J. & Menet, J.S. Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1. *PLoS Genet* **14**, e1007156 (2018).
465. Lam, M.T. *et al.* Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature* **498**, 511-515 (2013).
466. Rudic, R.D. *et al.* BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* **2**, e377 (2004).
467. Bunger, M.K. *et al.* Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the Mop3/Bmal-1 locus. *Genesis* **41**, 122-132 (2005).

468. Shimba, S. *et al.* Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12071-12076 (2005).
469. Laposky, A. *et al.* Deletion of the mammalian circadian clock gene BMAL1/Mop3 alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation. *Sleep* **28**, 395-409 (2005).
470. McClung, C.A. *et al.* Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9377-9381 (2005).
471. Naylor, E. *et al.* The circadian clock mutation alters sleep homeostasis in the mouse. *J Neurosci* **20**, 8138-8143 (2000).
472. Fu, L. & Lee, C.C. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* **3**, 350-361 (2003).
473. Gery, S. *et al.* The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol Cell* **22**, 375-382 (2006).
474. Abarca, C., Albrecht, U. & Spanagel, R. Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9026-9030 (2002).
475. Toh, K.L. *et al.* An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**, 1040-1043 (2001).
476. Gery, S. *et al.* Transcription profiling of C/EBP targets identifies Per2 as a gene implicated in myeloid leukemia. *Blood* **106**, 2827-2836 (2005).
477. Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P. & Lee, C. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* **111**, 41-50 (2002).
478. Archer, S.N. *et al.* A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep* **26**, 413-415 (2003).
479. Ebisawa, T. *et al.* Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep* **2**, 342-346 (2001).
480. Wisor, J.P. *et al.* A role for cryptochromes in sleep regulation. *BMC Neurosci* **3**, 20 (2002).
481. Matysiak-Scholze, U. & Nehls, M. The structural integrity of ROR alpha isoforms is mutated in staggerer mice: cerebellar coexpression of ROR alpha1 and ROR alpha4. *Genomics* **43**, 78-84 (1997).
482. Dussault, I., Fawcett, D., Matthyssen, A., Bader, J.A. & Giguere, V. Orphan nuclear receptor ROR alpha-deficient mice display the cerebellar defects of staggerer. *Mech Dev* **70**, 147-153 (1998).

483. Meyer, T., Kneissel, M., Mariani, J. & Fournier, B. In vitro and in vivo evidence for orphan nuclear receptor RORalpha function in bone metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9197-9202 (2000).
484. Steinmayr, M. *et al.* staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3960-3965 (1998).
485. Andre, E. *et al.* Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *EMBO J* **17**, 3867-3877 (1998).
486. Kurebayashi, S. *et al.* Retinoid-related orphan receptor gamma (RORgamma) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10132-10137 (2000).
487. Sun, Z. *et al.* Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* **288**, 2369-2373 (2000).
488. Ueda, E. *et al.* High incidence of T-cell lymphomas in mice deficient in the retinoid-related orphan receptor RORgamma. *Cancer Res* **62**, 901-909 (2002).
489. Dudley, C.A. *et al.* Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science* **301**, 379-383 (2003).
490. Curtis, A.M., Bellet, M.M., Sassone-Corsi, P. & O'Neill, L.A. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* **40**, 178-186 (2014).
491. Labrecque, N. & Cermakian, N. Circadian Clocks in the Immune System. *J Biol Rhythms* **30**, 277-290 (2015).
492. Scheiermann, C., Gibbs, J., Ince, L. & Loudon, A. Clocking in to immunity. *Nat Rev Immunol* **18**, 423-437 (2018).
493. Yu, X. *et al.* The basic leucine zipper transcription factor NFIL3 directs the development of a common innate lymphoid cell precursor. *Elife* **3** (2014).
494. Yu, X. *et al.* TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science* **342**, 727-730 (2013).
495. Gibbs, J.E. *et al.* The nuclear receptor REV-ERBalpha mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 582-587 (2012).
496. Druzd, D. *et al.* Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity* **46**, 120-132 (2017).

497. Sun, Y. *et al.* MOP3, a component of the molecular clock, regulates the development of B cells. *Immunology* **119**, 451-460 (2006).
498. Dimitrov, S. *et al.* Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood* **113**, 5134-5143 (2009).
499. Cohen, J.J. Thymus-derived lymphocytes sequestered in the bone marrow of hydrocortisone-treated mice. *J Immunol* **108**, 841-844 (1972).
500. Kawate, T., Abo, T., Hinuma, S. & Kumagai, K. Studies of the bioperiodicity of the immune response. II. Co-variations of murine T and B cells and a role of corticosteroid. *J Immunol* **126**, 1364-1367 (1981).
501. Suzuki, K., Hayano, Y., Nakai, A., Furuta, F. & Noda, M. Adrenergic control of the adaptive immune response by diurnal lymphocyte recirculation through lymph nodes. *J Exp Med* **213**, 2567-2574 (2016).
502. Scheiermann, C. *et al.* Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity* **37**, 290-301 (2012).
503. Born, J., Lange, T., Hansen, K., Molle, M. & Fehm, H.L. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J Immunol* **158**, 4454-4464 (1997).
504. He, W. *et al.* Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues. *Immunity* **49**, 1175-1190 e1177 (2018).
505. Besedovsky, L. *et al.* Cortisol increases CXCR4 expression but does not affect CD62L and CCR7 levels on specific T cell subsets in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**, E1322-1329 (2014).
506. Zhao, Y., Liu, M., Chan, XY., Tan, SY., Subramaniam, S. Fan, Y., Loh, E., Chan, KTE., Tan, T., and Chen, Q., . Uncovering the mystery of opposite circadian rhythms between mouse and human leukocytes in humanized mice. *Immunobiol Immunother* **130**, 1995-2005 (2018).
507. Shimba, A. *et al.* Glucocorticoids Drive Diurnal Oscillations in T Cell Distribution and Responses by Inducing Interleukin-7 Receptor and CXCR4. *Immunity* **48**, 286-298 e286 (2018).
508. Halberg, F., Johnson, E.A., Brown, B.W. & Bittner, J.J. Susceptibility rhythm to E. coli endotoxin and bioassay. *Proc Soc Exp Biol Med* **103**, 142-144 (1960).
509. Sato, S. *et al.* A circadian clock gene, Rev-erb α , modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. *J Immunol* **192**, 407-417 (2014).
510. Gibbs, J. *et al.* An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. *Nat Med* **20**, 919-926 (2014).

511. Pariollaud, M. *et al.* Circadian clock component REV-ERB α controls homeostatic regulation of pulmonary inflammation. *J Clin Invest* (2018).
512. Heipertz, E.L. *et al.* Circadian Rhythms Influence the Severity of Sepsis in Mice via a TLR2-Dependent, Leukocyte-Intrinsic Mechanism. *J Immunol* **201**, 193-201 (2018).
513. Shackelford, P.G. & Feigin, R.D. Periodicity of susceptibility to pneumococcal infection: influence of light and adrenocortical secretions. *Science* **182**, 285-287 (1973).
514. Nguyen, K.D. *et al.* Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science* **341**, 1483-1488 (2013).
515. Bellet, M.M. *et al.* Circadian clock regulates the host response to Salmonella. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9897-9902 (2013).
516. Gagnidze, K. *et al.* Nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian sensitivity to mortality in murine vesicular stomatitis virus-induced encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 5730-5735 (2016).
517. Edgar, R.S. *et al.* Cell autonomous regulation of herpes and influenza virus infection by the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 10085-10090 (2016).
518. Chen, S., Fuller, K.K., Dunlap, J.C. & Loros, J.J. Circadian Clearance of a Fungal Pathogen from the Lung Is Not Based on Cell-intrinsic Macrophage Rhythms. *J Biol Rhythms* **33**, 99-105 (2018).
519. Hopwood, T.W. *et al.* The circadian regulator BMAL1 programmes responses to parasitic worm infection via a dendritic cell clock. *Sci Rep* **8**, 3782 (2018).
520. Kiessling, S. *et al.* The circadian clock in immune cells controls the magnitude of Leishmania parasite infection. *Sci Rep* **7**, 10892 (2017).
521. Nobis, C.C.L., N; Cermakian, N. Circadian control of antigen-specific T cell responses. *ChronoPhysiology and Therapy* **6**, 65-74 (2016).
522. Fernandes, G., Halberg, F., Yunis, E.J. & Good, R.A. Circadian rhythmic plaque-forming cell response of spleens from mice immunized with SRBC. *J Immunol* **117**, 962-966 (1976).
523. Eskola, J., Frey, H., Molnar, G. & Soppi, E. Biological rhythm of cell-mediated immunity in man. *Clin Exp Immunol* **26**, 253-257 (1976).
524. Kaplan, M.S. *et al.* Circadian rhythm of stimulated lymphocyte blastogenesis. A 24 hour cycle in the mixed leukocyte culture reaction and with SKSD stimulation. *J Allergy Clin Immunol* **58**, 180-189 (1976).

525. Hiemke, C. *et al.* Circadian variations in antigen-specific proliferation of human T lymphocytes and correlation to cortisol production. *Psychoneuroendocrinology* **20**, 335-342 (1995).
526. Bonacho, M.G., Cardinali, D.P., Castrillon, P., Cutrera, R.A. & Esquifino, A.I. Aging-induced changes in 24-h rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset populations and neurotransmitter and amino acid content in rat submaxillary lymph nodes during Freund's adjuvant arthritis. *Exp Gerontol* **36**, 267-282 (2001).
527. Esquifino, A.I., Selgas, L., Arce, A., Maggiore, V.D. & Cardinali, D.P. Twenty-four-hour rhythms in immune responses in rat submaxillary lymph nodes and spleen: effect of cyclosporine. *Brain Behav Immun* **10**, 92-102 (1996).
528. Petrovsky, N., McNair, P. & Harrison, L.C. Circadian rhythmicity of interferon-gamma production in antigen-stimulated whole blood. *Chronobiologia* **21**, 293-300 (1994).
529. Bollinger, T. *et al.* Circadian clocks in mouse and human CD4+ T cells. *PLoS One* **6**, e29801 (2011).
530. Cuesta, M., Boudreau, P., Dubeau-Laramée, G., Cermakian, N. & Boivin, D.B. Simulated Night Shift Disrupts Circadian Rhythms of Immune Functions in Humans. *J Immunol* **196**, 2466-2475 (2016).
531. Hemmers, S. & Rudensky, A.Y. The Cell-Intrinsic Circadian Clock Is Dispensable for Lymphocyte Differentiation and Function. *Cell Rep* **11**, 1339-1349 (2015).
532. Bryant, C.D. The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. *Ann N Y Acad Sci* **1245**, 31-33 (2011).
533. Charbonneau, H., Tonks, N.K., Walsh, K.A. & Fischer, E.H. The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7182-7186 (1988).
534. Shinkai, Y. *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-867 (1992).
535. Hogquist, K.A. *et al.* T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17-27 (1994).
536. Maekawa, Y. *et al.* Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* **9**, 1140-1147 (2008).
537. Porgador, A., Yewdell, J.W., Deng, Y., Bennink, J.R. & Germain, R.N. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* **6**, 715-726 (1997).

538. Thaben, P.F. & Westermark, P.O. Detecting rhythms in time series with RAIN. *J Biol Rhythms* **29**, 391-400 (2014).
539. Cornelissen, G. Cosinor-based rhythmometry. *Theor Biol Med Model* **11**, 16 (2014).
540. Refinetti, R., Lissen, G.C. & Halberg, F. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res* **38**, 275-325 (2007).
541. Wang, J., Vasaikar, S., Shi, Z., Greer, M. & Zhang, B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res* **45**, W130-W137 (2017).
542. Mathieu, M., Duval, F., Daudelin, J.F. & Labrecque, N. The Notch signaling pathway controls short-lived effector CD8⁺ T cell differentiation but is dispensable for memory generation. *J Immunol* **194**, 5654-5662 (2015).
543. Denton, A.E. *et al.* Affinity thresholds for naive CD8⁺ CTL activation by peptides and engineered influenza A viruses. *J Immunol* **187**, 5733-5744 (2011).
544. Matys, V. *et al.* TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **34**, D108-110 (2006).
545. Casrouge, A. *et al.* Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol* **164**, 5782-5787 (2000).
546. Motamedi, M., Xu, L. & Elahi, S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J Immunol Methods* **437**, 43-52 (2016).
547. Ren, W. *et al.* Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation. *Cell Death Dis* **8**, e2655 (2017).
548. Ziegler, S.F., Ramsdell, F. & Alderson, M.R. The activation antigen CD69. *Stem Cells* **12**, 456-465 (1994).
549. Freitas, C.M.T., Hamblin, G.J., Raymond, C.M. & Weber, K.S. Naive helper T cells with high CD5 expression have increased calcium signaling. *PLoS One* **12**, e0178799 (2017).
550. Freitas, C.M.T., Johnson, D.K. & Weber, K.S. T Cell Calcium Signaling Regulation by the Co-Receptor CD5. *Int J Mol Sci* **19** (2018).
551. Rietveld, W.J., Minors, D.S. & Waterhouse, J.M. Circadian rhythms and masking: an overview. *Chronobiol Int* **10**, 306-312 (1993).
552. Silver, A.C., Arjona, A., Hughes, M.E., Nitabach, M.N. & Fikrig, E. Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B cells. *Brain Behav Immun* **26**, 407-413 (2012).

553. Serbina, N.V., Shi, C. & Pamer, E.G. Monocyte-mediated immune defense against murine *Listeria monocytogenes* infection. *Adv Immunol* **113**, 119-134 (2012).
554. Ladel, C.H., Flesch, I.E., Arnoldi, J. & Kaufmann, S.H. Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **153**, 3116-3122 (1994).
555. Kirsch, S. *et al.* T-cell numbers and antigen-specific T-cell function follow different circadian rhythms. *J Clin Immunol* **32**, 1381-1389 (2012).
556. Shimba, A. *et al.* Glucocorticoids Drive Diurnal Oscillations in T Cell Distribution and Responses by Inducing Interleukin-7 Receptor and CXCR4. *Immunity* (2018).
557. Yue Zhao, M.L., Xue Ying Chan, Sue Yee Tan, Sharrada Subramaniam, Yong Fan, Eva Loh, & Kenneth Tou En Chang, T.C.T., and Qingfeng Chen. Uncovering the mystery of opposite circadian rhythms between mouse and human leukocytes in humanized mice. *IMMUNOBIOLOGY AND IMMUNOTHERAPY* **130**, 1995-2005 (2018).
558. Van, V.Q. *et al.* Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J* **25**, 5560-5568 (2006).
559. Kwon, I. *et al.* BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer. *Mol Cell Biol* **26**, 7318-7330 (2006).
560. Muratani, M. & Tansey, W.P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 192-201 (2003).
561. Sutton, C.E. *et al.* Loss of the molecular clock in myeloid cells exacerbates T cell-mediated CNS autoimmune disease. *Nat Commun* **8**, 1923 (2017).
562. Gerner, M.Y., Casey, K.A., Kastenmuller, W. & Germain, R.N. Dendritic cell and antigen dispersal landscapes regulate T cell immunity. *J Exp Med* **214**, 3105-3122 (2017).
563. Clarke, S.R. *et al.* Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol* **78**, 110-117 (2000).
564. Lewis, R.S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **19**, 497-521 (2001).
565. Pollizzi, K.N. & Powell, J.D. Regulation of T cells by mTOR: the known knowns and the known unknowns. *Trends Immunol* **36**, 13-20 (2015).
566. Brockdorff, J., Williams, S., Couture, C. & Mustelin, T. Dephosphorylation of ZAP-70 and inhibition of T cell activation by activated SHP1. *Eur J Immunol* **29**, 2539-2550 (1999).

567. Le Borgne, M. *et al.* Real-Time Analysis of Calcium Signals during the Early Phase of T Cell Activation Using a Genetically Encoded Calcium Biosensor. *J Immunol* **196**, 1471-1479 (2016).
568. Lim, T.S., Mortellaro, A., Lim, C.T., Hammerling, G.J. & Ricciardi-Castagnoli, P. Mechanical interactions between dendritic cells and T cells correlate with T cell responsiveness. *J Immunol* **187**, 258-265 (2011).
569. Duguay, D. & Cermakian, N. The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol Int* **26**, 1479-1513 (2009).

Annexes

- 1. Liste des gènes des horloges circadiennes exprimés de manière rythmique dans les tissus et cellules de rats et souris**

Tissus Souris						
	NSC	Tronc cérébral	Cervelet	Hypothalamus	Glande pituitaire	Glandes adrénérquiques
<i>Bmal1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Clock</i>	-	-	ZT2	-	ZT1	ZT22
<i>Cry1</i>	ZT10	-	-	-	ZT20	ZT17
<i>Cry2</i>	ZT7	-	ZT13	-	ZT12	-
<i>Dbp</i>	ZT8	ZT11	ZT11	ZT10	ZT11	ZT9
<i>Rev-Erbα</i>	ZT4	ZT8	ZT9.5	ZT8	ZT9	ZT7
<i>Per1</i>	ZT7-ZT8	ZT11	-	ZT12	ZT13	ZT10
<i>Per2</i>	ZT10	ZT13	ZT15	ZT12.5	ZT14	ZT14
<i>Per3</i>	-	ZT12	ZT13	ZT12	ZT13	ZT11
<i>Ror α</i>	ZT6-ZT8	-	-	-	-	-
	Aorte	Foie	Poumon	Cœur	Rein	Côlon distal
<i>Bmal1</i>	-	ZT0	-	-	ZT18	-
<i>Clock</i>	ZT22-ZT24	ZT23-ZT24	ZT23	ZT0-ZT1	ZT22	-
<i>Cry1</i>	ZT20	ZT19-ZT20	ZT17	ZT18	ZT18	-
<i>Cry2</i>	-	ZT12	ZT11	ZT12	ZT14	ZT15
<i>Dbp</i>	ZT10.5	ZT10-ZT11	ZT10	ZT10.5-ZT11	ZT10	ZT11
<i>Rev-Erbα</i>	ZT6-ZT8	ZT6-ZT8	ZT8	ZT7	ZT7	ZT9
<i>Per1</i>	-	ZT11-ZT13	ZT11	ZT9	ZT11-ZT12	-
<i>Per2</i>	ZT14	ZT10-ZT18	ZT13	ZT12-ZT15	ZT14	ZT15
<i>Per3</i>	ZT12	ZT10.5-ZT12	ZT11	ZT13	ZT11	-
<i>Ror α</i>	-	ZT6	ZT14	-	-	ZT9
	Tissu adipeux brun	Tissu adipeux blanc	Muscle	Muscle squelettique	Rate	Ganglion lymphatique
<i>Bmal1</i>	-	-	-	-	-	ZT21
<i>Clock</i>	ZT1	ZT23.5	-	ZT1	-	ZT21
<i>Cry1</i>	ZT19	ZT19	-	ZT19	-	ZT21
<i>Cry2</i>	ZT12	-	ZT11	ZT11	-	-
<i>Dbp</i>	ZT11	ZT11	ZT12	ZT10	ZT12.5	
<i>Rev-Erbα</i>	ZT7	ZT8	ZT6	ZT5	ZT10	ZT8-ZT9
<i>Per1</i>	-	-	-	ZT10	-	ZT13
<i>Per2</i>	ZT13	ZT12	-	ZT11	ZT15	ZT13-ZT14
<i>Per3</i>	ZT13	ZT14	-	ZT10.5	ZT13	-
<i>Ror α</i>	-	-	ZT6	-	-	-
Cellules Souris/Rat						
	NIH3T3	Monocyte	Macrophage péritonéal	Macrophage splénique	Cellule dendritique	Lymphocyte NK (rat)
<i>Bmal1</i>	-	-	CT4 ZT2-ZT22	-	-	CT16-CT20 ZT0-ZT4
<i>Clock</i>	-	-	CT0	ZT12	-	ZT0-ZT4
<i>Cry1</i>	ZT4.5	-	CT16-CT20	-	-	-

<i>Cry2</i>	ZT1.5	-	CT12	-	-	-
<i>Dbp</i>	ZT5	ZT16	CT12 ZT10	ZT16	ZT16	ZT12
<i>Rev-Erbα</i>	ZT22	ZT8	CT8-CT12 ZT10	ZT16	ZT16	-
<i>Per1</i>	-	-	CT12 ZT10	ZT12	ZT12	ZT12
<i>Per2</i>	ZT3	-	CT12 ZT14	-	ZT20	CT8-CT12 ZT16
<i>Per3</i>	ZT1.5	-	-	-	-	-
<i>Ror α</i>	-	-	-	-	-	-
	Lymphocyte B	Lymphocytes T CD4	Lymphocytes T CD8			
<i>Bmal1</i>	ZT16	-	-			
<i>Clock</i>	ZT20	-	-			
<i>Cry1</i>	-	-	-			
<i>Cry2</i>	-	-	-			
<i>Dbp</i>	ZT16	ZT7	CT14			
<i>Rev-Erbα</i>	ZT16	ZT7	CT10			
<i>Per1</i>	ZT16	-	-			
<i>Per2</i>	ZT16-ZT20	-	CT18			
<i>Per3</i>	-	-	-			
<i>Ror α</i>	-	-	CT6			

2. Schémas expérimentaux

Figure 11. L'horloge des cellules dendritiques contribue aux variations circadiennes de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique

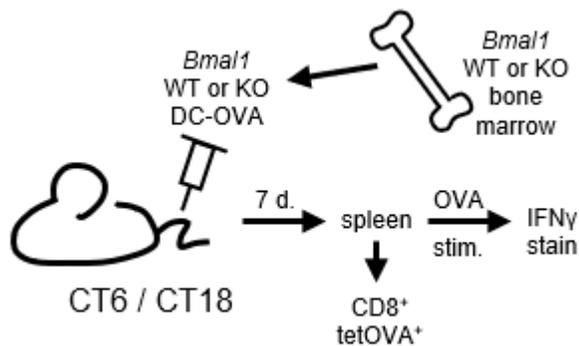


Figure 15. L'horloge circadienne des lymphocytes T CD8 matures est essentielle à la rythmicité de la réponse des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.

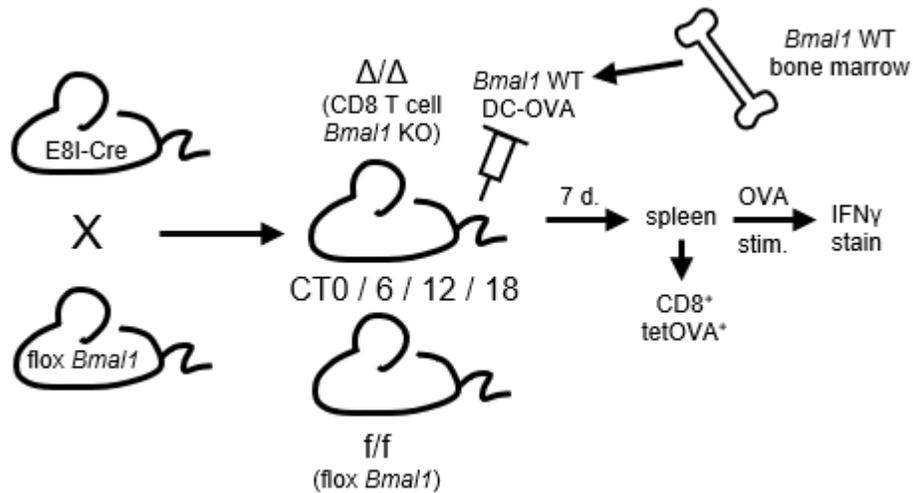


Figure 17. Contrôle circadien des lymphocytes T CD8

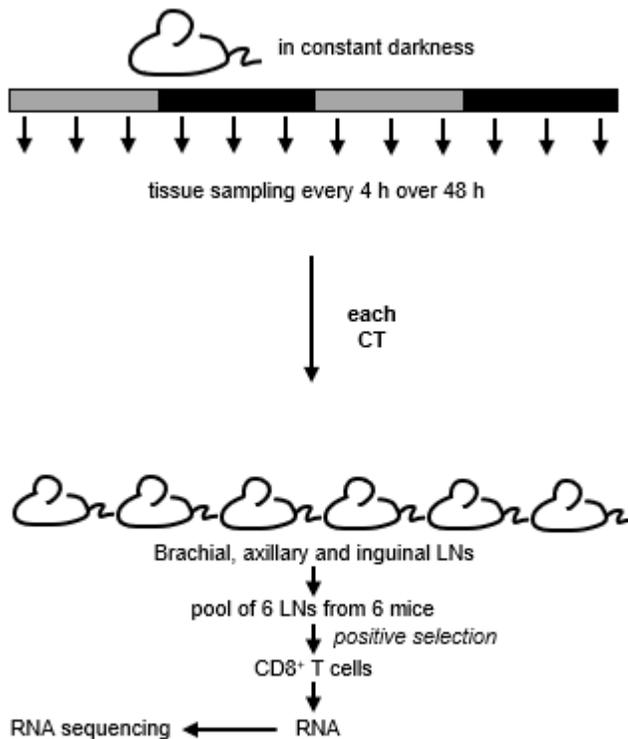


Figure 18. L'Horloge circadienne des lymphocytes T CD8 contrôle la réponse précoce des lymphocytes T CD8 à la présentation antigénique.

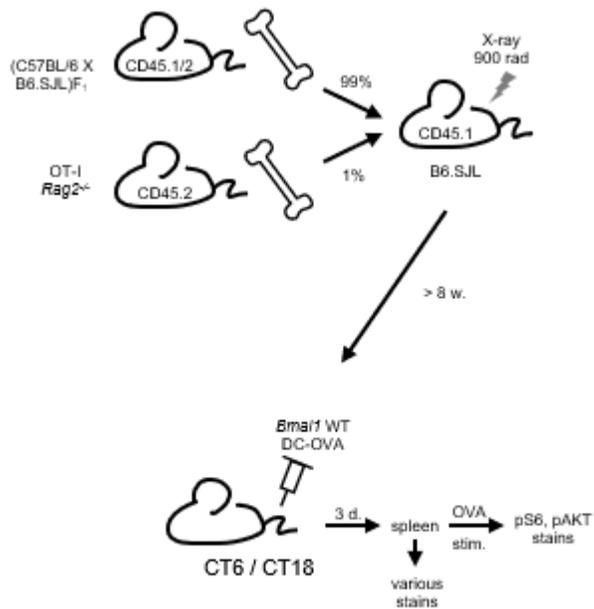
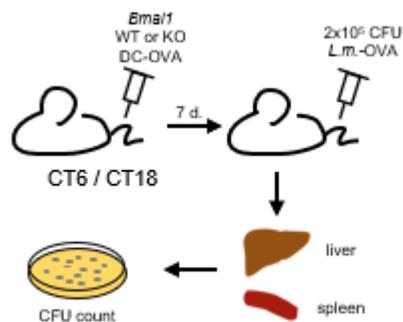


Figure 20. L'horloge des lymphocytes T CD8 contrôle les variations circadiennes dans le contrôle d'une infection avec *Listeria monocytogenes*-OVA suite à une vaccination avec des DC-OVA.



3. Liste des gènes rythmés dans les lymphocytes T CD8 organisés par phase d'expression

CT2	CT6	CT10	CT14	CT18	CT22
Zcchc7	Nol7	Pbx4	Entpd5	Ubxn4	Ctsz
Zfp759	Rpl10-ps3	Syt11	Arid4a	Ivns1abp	Nol3
mt-Nd4	Rab1b	Mttp	Rnasek	Tubb4b	Lipo3
Zfp97	Xrcc4	Mob2	Med22	Atp2c1	Zfp991
Nsdhl	Nmnat2	Aqp3	Kif3b	Plekha1	Alg8
Smim15	Arpc5	Thap3	Otud3	Dpy1911	Sap30
Cd53	Slc14a1	Mxi1	Ampd2	Ifi47	Nadk
Cyb561d2	BC049715	Trappe6a	Tef	Amigo1	Ptdc2
Cxcr5	Rpl23a	Bcas3	Ubn1	Prdm10	Adgre1
Usmg5	Haus1	Eef1a1	Phb2	Elov15	Tm2d1
Slc10a3	Retsat	Fhit	Tbc1d20	Sfpq	Zfp984
Gla	Rps24	Cpt1a	Chac2	Emid1	Gm4070
Snrpb2	Rpl13a	Rassf7	Cdk2	Mon1b	Gng5
Fkbp3	Nt5dc1	Cdkn2aip	Slc25a38	Slc5a3	Rgl1
Bbs12	Xrn2	Slc25a20	Acat2	Sp6	C1qb
Smc1a	Gm6904	Ttc28	Gpt	Dynll1	Hck
Tmem230	Smim4	Zkscan14	Zbtb7a	Nrd1	Ddx17
Bbip1	N6amt1	Gen1	Fbxo42	Hspa8	Ndufab1
Hnrnpa3	Smc3	Gbe1	Acp6	Nlrc5	Asph
mt-Nd1	Echs1	Cfap20	Myo19	Fbxl22	Adgre4
Zfp738	1700001O22Rik	Plagl1	Xpnpep3	Ints3	Cd300c2

CT2	CT6	CT10	CT14	CT18	CT22
Ap3b1	Serpinb6a	Ppp2r5c	Immt	Tmem158	Tlr4
Ttc27	Hddc2	Psmf1	March9	Mcl1	Gm10053
Tstd3	Fan1	Zbed3	Fut11	Ubr4	Cfp
Fbxo8	9430038I01Rik	Chst15	Rrnad1	Pus1	Cdc42
Spryd7	Cd55	Pmf1	Ankrd12	Hspd1	Sdf211
Zmpste24	Zfand1	Akap12	Gm28036	Dnajb4	Hus1
Zfp407	Gpalpp1	Card19	Flcn	Fubp1	Rab18
Spcs1	Gm8369	Usp10	Map4	Spout1	C1qc
Sdhb	5730455P16Rik	Rpl14	Srprb	Stk39	Tlr2
Cntd1	Mnat1	Il11ra1	Zfp276	Dnajc3	Mtpn
Ndufs2	Snx4	Cd7	Slc35e2	Pop1	Mgat2
Rpl2211	Fam204a	Mfsd2b	Heatr5b	Calhm2	Ctsb
Cox16	Ccdc28a	BC030867	Zfp410	Hacd3	Sod2
Lcn4	Nrde2	Hn1	Cacnb2	Zfp3611	Colec12
mt-Col	Elp3	Tnfrsf25	Hdac1	Zmynd19	Timp1
Odc1	Pef1	Mex3d	Il2rb	Synj2bp	Nr1h3
Eif2s3x	Zpbp2	Prrt2	Dbp	Atic	Ms4a8a
Jrk	Btbd16	Tatdn2	Akr7a5	Ptges3	Calr
Cd52	Cmc1	Ift140	Eif1b	Slc7a6	Trem2
Yipf2	Zrsr1	Sqstm1	Cxcr4	Bicd2	Cd302
Ebag9	Hnrnpa1	Rpusd1	Bclaf1	Pank1	Clec5a
Fopnl	Trpm1	Aste1	Ikbkb	Impa2	Epb4113
Osgepl1	Rdm1	Arrb1	Lta	Tmem164	Nupr1

CT2	CT6	CT10	CT14	CT18	CT22
Eme2	Pacsin3	Lrig1	Dip2b	Nop16	Serp1
Dnaje15	Tmem203	Wdr6	Irf1	Ywhab	Zfp992
Pdcd10	Ptpn18	Fbxo34	Anapc7	Ndc1	Gpx1
H3f3b	1110034G24Rik	Wdr91	Dopey1	Ptpn6	Clec4n
Ms4a6b	Wbscr27	Wdsub1	Zfp592	Hnrnpk	I118bp
Has3	Isoc2b	Zfp219	Dvl1	Pgam1	Ctss
Trim13	Gm1043	Txnip	Arhgap30	Atf6b	Naip2
Cab391	Hspb11	Tbccd1	Msl1	Slc39a7	Wdr78
Gm10131	Kdm4d	Fam168a	Gstp1	Prmt5	Tmem126a
Cmtm8	Manbal	H2afv	Chd7	Siah2	Raph1
Zfp3	Ift46	Ddx19a	Tfip11	Cct4	Cd68
Tmem258	Dcaf8	Trmt112	Mfng	Clptm11	Praf2
2810428I15Rik	Spata24	Nr1d1	Parp8	Mob1b	Brix1
mt-Nd5	Foxr1	Gnb5	Rhof	Hist2h3c2	Plau
Zfp386	4930486L24Rik	Phf13	Fbf1	Tagln2	0610040J01Rik
Trim5	Dnaje9	Nt5dc3	Tmem129	Tmem33	Anxa5
Micu2	Parn	Zkscan17	Ube2z	Rbm8a2	Cd180
mt-Cytb	Fus	Rnf6	Mov10	Itgb2	Ccr2
Pigk	Dazap2	Agap3	Ccl17	Tra2a	6430548M08Rik
Mrgprb2	Cwc27	Cdyl2	Ptpn7	Nefh	Lilra6
Ubb	Fbxo36	Gpsm1	Ppp4r1	9430015G10Rik	Dhrs9
Ddx52	Ganc	Trim62	Zfp664	Wdr55	Aasdhpt
Snrnp40	Gnb11	Lsm11	Nde1	Top1	mt-Atp8

CT2	CT6	CT10	CT14	CT18	CT22
Tmem147	Bckdha	Mrpl28	Nmt2	Zfp710	Ttc21b
Tmem209	Egln3	B3gnt3	Golga4	Caprin1	Cmklr1
Ndufs4	Zbtb22	Rnf114	Pea15a	Srsf7	Ly86
Btf3l4	Sars	Tram2	Epop	Mrfap1	Ovca2
Fancb	1110032A03Rik	Ncoa1	Cspp1	Gm3512	Pde7b
Col1a1	Cyp4f13	Rab3ip	Foxd2	Mfsd7b	Bst1
Fbxo6	Nme4	Lpcat4	Zfp574	Egr2	Slc11a1
Dnajc8	Dctn6	Cct2	Gm42742	Lcp1	Abcb10
Mrpl11	Ccdc181	Rrp1	Pdcd7	Gm35339	Nlrp1a
Yipf6	Fam161a	Rtn4r11	Fbxl19	Elavl1	Tcea1
Cwf19l2	Ebpl	Fam134a	Rsl24d1	Fosl2	Sirpb1b
1110059E24Rik	Rad18	Sertad3	Med18	Zxdb	Hdac9
Bckdk	Cerkl	Tjp3	Kctd5	Copa	Mrc1
Slc35d2	Fam71e1		Wdr1	Ywhag	Samd9l
Gatb	Tubgcp2		Paip1	Gm27029	Trem3
Taf1b	AB124611		Rap1gds1	Rmdn3	Selenot
Sell	Rabac1		Ythdc1	Abi3	Pnpt1
Vps41	Hbp1		Gbp4	Pa2g4	Abce1
Gm9949	Gstt2		Gnl1	4931414P19Rik	Csgalnact2
Exoc6	1110051M20Rik		Irgm2	Dnph1	Yme11l
mt-Nd4l	Egf		Agrn	Hnrnpa2b1	Il1b
Coq7	Gm10392		Cmtm4	Cox5a	Erap1
Crbn	Arhgap15		Lpin2	Ubap2l	Etf1

CT2	CT6	CT10	CT14	CT18	CT22
Rps3a1	Klhdc1		Got1	Dusp11	Uba3
Ssu72	Igflr		Nanos1	Papola	Snrpa
Gm10762	Sdhaf1		BC017643	Lyl1	Carnmt1
Ngly1	Srr		Zbtb1	Rbbp4	Trip4
Lsm7	Klhdc2		Lbp	Lmnb2	Thsd4
Tjp1	Ctnnb2		Zc3h11a	Kansl11	Zfp994
Smim8	Hmgb3		Ppp1r9b	Itgal	Hsd17b12
BC004004	Sfxn3		Lax1	Tnf	Ube2e1
Dyx1c1	Tkfc		1700102P08Rik	Heatr1	Gps1
Nmd3	Klhl6		Ywhah	Per2	Eif2s1
Rft1	Atp5g2		Trim65	Map3k8	Ccl2
1110032F04Rik	Prkag1		Trim28	Naa30	Hnrnpc
Nhlrc3	Atg4a		Dnajb2	Xiap	Gm590
Fis1	Kxd1		Ccdc117	Set	2610044O15Rik 8
Ndufb11	Thsd1		Psd4	Hexa	Aren1
Uxt	Rpl17		Ddx31	Rnpep	Spes3
Fam103a1	Chaf1b		Traf4	Zfp54	Amacr
Ublcp1	Zfp945		A830080D01Rik	Ap1s2	Slc25a36
Apopt1	Eif3i		B3galnt2	Lrppe	Cngal
D3Ertd751e	Emc9		Fbxo33	Ybx1	Srp54a
Gmfg	Fndc10		Prmt2	Acvrl1	Casp4

CT2	CT6	CT10	CT14	CT18	CT22
	Fanc1		Hsph1	Pced1a	Stk17b
	Gabrd		Ccnd2	Tpp2	Hist1h1c
	Atg14		Eaf1	Noc3l	Yif1b
	Tmem254c		Scrib	Layn	Cables1
	F2rl1		Ahsa2	Nus1	mt-Nd2
	Hadh		Usf1	Dpep2	Stk3
	Izumo4		Ppp1r16b	Txlng	Gk
	Slc35b3		Tomm34	Tnfrsf19	Caap1
	Tmem218		Rhobtb2	Myadm	Rmnd1
	Ubxn1		Upf3a	Rcan1	Actr2
	Mcrs1		Camkk1	Rab1a	Slc39a5
	Pfkfb1		Opa3	Vill	Sar1b
	Ctse		Tob2	Gpr55	Mplkip
	Agbl3		Coro2a	Zfp236	Stk26
	Ctps2		Dnaja4	Anxa4	Zfp518a
	Ndrg2		Csk	Nfam1	Uqcrq
	Specc11		Stip1	Dcun1d3	C330018D20Rik
	Rbm3		Socs1	Hk2	Ndufaf1
	Nudt14		Prdm15	Tram1	Eprs
	Pou6f1		Tufm	Chid1	Vps35
	Mturn		Mogs	Mettl2	
	Wwp2		Trim8	Arf6	
	Tprgl		Fastkd1	Ii27	

CT2	CT6	CT10	CT14	CT18	CT22
	Cand2		Dnaja1	Plxnb2	
	Lancl1		Arl6ip6	Ccnl1	
	Dyrk4		Lman2l		
	Gm20219		Ppp2r5e		
	Tmem42		Galnt12		
	Rora		Ubqln1		
	Kras		Dnaja1		
	Itga7		Uhrf2		
	Pde2a		Hsp90ab1		
	Vps4b		Ppef2		
	Tmem222		Slc38a2		
	Rbm44		Zbtb2		
	Ankrd50		BC037034		
	Mthfd2l		Pmepa1		
	Klc4		Slc27a4		
	4930427A07Rik		Chtf8		
	Scaper		Mat2a		
	Stx17		Gtf3c1		
	Cnot9		Baz1b		
	Atg4b		Rangap1		
	Gab3		Hspa1b		
	Zfp963		Nfkbid		
	Cisd3		Lars2		

CT2	CT6	CT10	CT14	CT18	CT22
	Usp3		Btbd10 Kdelr2 Ints11 Micall1 Wrnip1 Dis3 Pglyrp2 Mex3a Samd1 Dnmt3a Rbm15 Lpar2 Snx27		