

Université de Montréal

Rôle de la modulation de la phosphatidylsérine dans l'activation des cellules T

Par

Audrey Connolly

Département de Microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)

en Microbiologie et Immunologie

Septembre 2020

© Audrey Connolly, 2020

Université de Montréal

Département de microbiologie, infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

Rôle de la modulation de la phosphatidylsérine dans l'activation des cellules T

Présenté par

Audrey Connolly

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Heather Melichar

Président-rapporteur

Etienne Gagnon

Directeur de recherche

Christopher Rudd

Membre du jury

Martin Richer

Examineur externe

Résumé

Les lymphocytes T orchestrent la réponse immunitaire adaptative afin de nous protéger contre les pathogènes. Les lymphocytes T sont dotés d'un récepteur de surface, le récepteur de cellules T (TCR), qui transmet le signal de stimulation vers l'intérieur de la cellule afin d'amorcer la cascade d'activation des cellules T. Le TCR est un complexe multimérique composé des dimères $TCR\alpha\beta$, $CD\epsilon\gamma$, $CD3\epsilon\delta$ et $CD3\zeta\eta$. Les chaînes $TCR\alpha\beta$ reconnaissent les antigènes pathogéniques tandis que les chaînes CD3 initient la cascade de signalisation des cellules T par la phosphorylation de leurs chaînes cytoplasmiques. Il est toujours incompris comment le signal d'activation du TCR est transmis des chaînes $TCR\alpha\beta$ jusqu'aux domaines cytoplasmiques des chaînes CD3.

Chez les lymphocytes T au repos, les chaînes $CD3\epsilon$ et $CD3\zeta$ sont associées au feuillet interne de la membrane plasmique (MP). Le domaine cytoplasmique de $CD3\epsilon$ et $CD3\zeta$ est riche en acides aminés basiques, ce qui permet leur association électrostatique avec les phospholipides acides de la MP. La phosphatidylsérine (PS) est le phospholipide acide le plus abondant de la MP. La PS est redistribuée exclusivement à la face cytoplasmique de la MP. Lors de l'activation des lymphocytes T, les chaînes $CD3\epsilon$ et $CD3\zeta$ des TCRs doivent se détacher de la PS pour leur phosphorylation. La dissociation membranaire d'un grand nombre de chaînes CD3 est essentielle à l'amplification de l'activation des lymphocytes T.

Un mécanisme de dissociation des chaînes $CD3\epsilon$ et $CD3\zeta$ des TCRs proposé dans la littérature est par l'élévation intracellulaire de calcium. Un influx robuste de calcium est généré suivant la stimulation des cellules T. En plus d'être essentiel à l'activation efficace des cellules T, il a été proposé que le calcium neutralise les phospholipides acides de la MP afin de dissocier les chaînes CD3. Le calcium est également un co-facteur dans l'activité de plusieurs enzymes, comme la scramblase lipidique TMEM16F. TMEM16F redistribue la PS à la MP suivant l'élévation du calcium intracellulaire, ce qui résulte en la réduction de la PS au feuillet interne. Nous avons donc émis l'hypothèse que le calcium régule la dissociation des chaînes CD3 par l'activation de TMEM16F.

Notre étude démontre que la redistribution calcium-dépendante de la PS par TMEM16F est essentielle à la dissociation membranaire de CD3 ϵ dans la lignée de cellules T Jurkat. La réduction de l'expression de TMEM16F par ARN interférant (shTMEM16F) empêche la dissociation massive des chaînes CD3 ϵ suivant la stimulation des cellules T. De plus, les cellules shTMEM16F démontrent une diminution de la phosphorylation des molécules de signalisation des cellules T. En contraste, l'expression d'une forme constitutivement active de TMEM16F augmente la redistribution de PS à la MP, la dissociation membranaire des chaînes CD3 ϵ et la phosphorylation des molécules de signalisation. Notre étude démontre que la redistribution de la PS par la scramblase calcium-dépendante TMEM16F régule la dissociation membranaire des chaînes CD3 du TCR afin d'amplifier l'activation des cellules T. Enfin, nous avons confirmé les défauts d'activation dans des cellules T murines primaires exprimant shTMEM16F lors d'une réponse immunitaire.

En conclusion, notre étude démontre le rôle de la régulation de la PS dans l'activation des cellules T. Nous avons démontré que nous pouvons modifier le niveau d'activation des cellules T en modulant la PS à la MP. Nos résultats ont ainsi plusieurs implications pour la conception et l'amélioration des immunothérapies basées sur les cellules T.

Mots-clés : Immunologie, Cellules T, Récepteur de cellules T, TCR, Phosphatidylsérine, Signalisation, Réponse immunitaire

Abstract

T lymphocytes protect us against pathogens by orchestrating the adaptive immune response. T lymphocytes possess a specific surface receptor, the T cell receptor (TCR), which conveys the stimulation signal towards the cytoplasm for the initiation of the T cell activation cascade. The TCR is a multimeric complex composed of the TCR $\alpha\beta$, CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ and CD3 $\zeta\zeta$ dimers. The TCR $\alpha\beta$ chains recognize the pathogenic antigens while the CD3 chains initiate the T cells signaling cascade through the phosphorylation of their cytoplasmic tails. It is not yet understood how the TCR activating signal is transmitted through the membrane from the TCR $\alpha\beta$ chains towards the cytoplasmic tails of the CD3 chains.

In resting T cells, the CD3 ϵ and CD3 ζ chains are associated to the inner leaflet of the plasma membrane (PM). The cytoplasmic tails of CD3 ϵ and CD3 ζ are rich in basic amino acids, which allow electrostatic association with acidic phospholipids at the PM. Phosphatidylserine (PS) is the most abundant acidic phospholipid and is exclusively distributed towards the cytoplasmic PM leaflet. During T cell activation, the CD3 ϵ and CD3 ζ cytoplasmic tails have to dissociate from PS for their phosphorylation. The membrane dissociation of a large number of CD3 chains is essential for the amplification of T cell activation.

A mechanism of CD3 ϵ and CD3 ζ chain dissociation that has been proposed in the literature is through intracellular calcium elevation. A robust calcium influx is generated following T cell stimulation. In addition to its essential role in regulating T cell activation, it has been proposed that calcium ions neutralize the PM acidic phospholipids for CD3 chain dissociation. Calcium is also an essential cofactor for the activity of many enzymes, such as the phospholipid scramblase TMEM16F. TMEM16F redistributes PS at the PM following intracellular calcium mobilization, resulting in a reduction of inner leaflet PS. We propose that calcium regulates CD3 chain dissociation through TMEM16F activity.

Our study demonstrates that calcium-dependent PS redistribution by TMEM16F is required for CD3 ϵ membrane dissociation in the Jurkat T cell line. Reduction of TMEM16F expression by shRNA targeting (shTMEM16F) prevents massive CD3 ϵ chain dissociation following

T cell stimulation. The shTMEM16F cells show a reduction in the phosphorylation of TCR-proximal signaling molecules. In contrast, expression of a constitutively active mutant of TMEM16F increases PS redistribution, CD3 ϵ chain dissociation and phosphorylation of TCR-proximal signaling molecules. Our study demonstrates that PS redistribution by the calcium-dependent TMEM16F scramblase regulates CD3 chain dissociation for the amplification of T cell activation. In addition, we have confirmed T cell activation defects in shTMEM16F murine primary T cells during an immune response.

In conclusion, our study demonstrates the role of PS regulation by TMEM16F in T cell activation. We showed that we could modify the level of T cell activation by modulating the concentration of PS at the inner leaflet of the PM. Our results thus have important implications for the development and improvement of immune receptor-based cancer immunotherapies.

Keywords : Immunology, T cells, T cell receptor, TCR, Phosphatidylserine, Signaling, Immune response

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	17
Liste des figures	19
Liste des sigles et abréviations	22
Remerciements	35
Avant-propos	37
Chapitre 1 - Introduction	39
1.1 Le système immunitaire	39
1.1.1 La réponse immunitaire innée	39
1.1.2 La réponse immunitaire adaptative	40
1.2 Biologie et ontogenèse des lymphocytes T	42
1.2.1 Le récepteur de cellules T	42
1.2.1.1 Les composantes du complexe du TCR	43
1.2.1.2 La diversité des TCRs	43
1.2.1.3 Assemblage du TCR	44
1.2.2 Développement des lymphocytes T	46
1.2.3 Tolérance centrale et périphérique	47
1.2.4 Circulation des lymphocytes T naïfs	49
1.3 Les lymphocytes T dans la réponse immunitaire	50
1.3.1 Présentation de l'antigène	51

1.3.2 Voies de signalisation du TCR.....	52
1.3.2.1 Interaction TCR-pCMH et signalisation initiale	52
1.3.2.2 Formation et maturation de la synapse immunologique	55
1.3.2.3 Influx de calcium	59
1.3.2.4 Voie de signalisation NFAT	60
1.3.2.5 Voie de signalisation NF- κ B	60
1.3.2.6 Voie de signalisation MAP kinase.....	61
1.3.2.7 Internalisation des TCRs et extinction de la signalisation	61
1.3.3 Expansion des lymphocytes T	63
1.3.4 Différenciation des lymphocytes T CD4+	63
1.3.5 Différenciation des lymphocytes T CD8+	65
1.3.6 Sortie des ganglions et migration vers le site de l'infection	67
1.3.7 Réponse effectrice des lymphocytes T CD8+	68
1.3.8 Contraction de la réponse immunitaire	69
1.3.9 Développement de la mémoire des lymphocytes T	69
1.4 Mécanismes de régulation du TCR chez les lymphocytes T au repos.....	71
1.4.1 Régulation kinase-phosphatase	71
1.4.2 Régulation électrostatique avec la MP	72
1.4.2.1 Phosphatidylsérine	73
1.4.2.1.1 Régulation spatiale et enzymatique de la PS	74
1.4.2.1.2 Cascade de coagulation sanguine	75
1.4.2.1.3 La scramblase TMEM16F	76
1.4.2.1.4 Apoptose	77
1.4.2.2 Phosphoinositides	78

1.4.2.2.1 Régulation des Pls	78
1.4.2.2.2 Hydrolyse.....	79
1.4.2.3 Autres phospholipides acides	79
1.4.2.4 Modulation du potentiel électrostatique	80
1.4.2.5 Association électrostatique de CD3ε et CD3ζ à la MP	81
1.4.2.6 Autres récepteurs immuns s’associant à la MP	84
1.5 L’activation initiale du TCR	86
1.5.1 Interaction TCR-pCMH	87
1.5.2 Dissociation membranaire des chaînes CD3ε et CD3ζ.....	88
1.5.3 Régulation de la phosphorylation du TCR.....	89
1.5.4 Mécanismes de dissociation des chaînes CD3ε et CD3ζ du TCR.....	90
1.5.4.1 Débalancement kinase-phosphatase	91
1.5.4.2 Changement conformationnel du TCR.....	92
1.5.4.3 Réarrangement latéral de la PS.....	93
1.6 Mécanismes d’amplification de l’activation du TCR	95
1.6.1 Engagement en série des TCRs	95
1.6.2 Amplification par les peptides du soi.....	96
1.6.3 Modulation des phosphoinositides.....	98
1.6.4 Élévation du calcium intracellulaire	99
1.7 Objectifs de la thèse.....	102
Chapitre 2 - TMEM16F régule la dissociation membranaire de CD3ε et l’activation des TCRs non-engagés à la synapse immunologique	105
2.1 Mise en contexte du projet.....	106
2.2 Contributions des auteurs.....	107

2.3 Abstract	109
2.4 Introduction.....	110
2.5 Material and Methods.....	113
2.5.1 Mice	113
2.5.2 Cell lines.....	113
2.5.3 Plasmids.....	114
2.5.4 Lentivirus production	114
2.5.5 Lentiviral transduction	115
2.5.6 Flow cytometry.....	115
2.5.7 Bystander TCR activation assay.....	116
2.5.7.1 Cognate pMHC stimulation	116
2.5.7.2 Chimeric Immune Receptor Stimulation.....	116
2.5.8 Western blotting	117
2.5.9 Immunoprecipitation assay.....	117
2.5.10 RNA extraction and real-time PCR	119
2.5.11 High-resolution confocal imaging	119
2.5.12 Measurement of relative inner leaflet PS content	119
2.5.13 Fluorescence lifetime imaging and FRET efficiency calculations.....	120
2.5.14 Calcium flux imaging	121
2.5.15 Conjugate formation	121
2.5.16 Donor dequenching measurements and calculations	122
2.5.16.1 mTFP1 Normalized Relative Fold Change (NRFC)	122
2.5.16.2 mVenus relative fold change (RFC).....	123
2.5.17 Statistical analysis.....	123

2.6 Results	124
2.6.1 TMEM16F regulates Ca ²⁺ -dependent PS redistribution at the plasma membrane....	124
2.6.2 Ca ²⁺ -dependent PS redistribution modulates bystander CD3ε _{CD} membrane binding dynamics at the plasma membrane.....	127
2.6.3 Inhibition of PS redistribution hinders bystander CD3ε _{CD} -PM dissociation at the synapse and reduces TCR signaling.....	131
2.6.4 TMEM16F enables bystander TCR engagement in signaling and promotes T cell activation.....	134
2.6.5 Facilitation of Ca ²⁺ -dependent PS redistribution enhances CD3ε _{CD} dissociation.	139
2.6.6 Mutant TMEM16F enhances bystander CDε _{CD} dissociation at the synapse and TCR signaling.....	143
2.6.7 TMEM16F regulates pMHC-stimulated T cell activation through bystander TCR engagement in signaling.	146
2.7 Discussion	151
2.8 Acknowledgements.....	156
2.9 References.....	157
2.10 Supplemental figures	161
Chapitre 3 – TMEM16F régule l’activation et la différenciation des lymphocytes T.....	177
3.1 Contributions des auteurs.....	178
3.2 Mise en contexte du projet.....	179
3.3 Méthodologie	180
3.3.1 Souris.....	180
3.3.2 Lignées cellulaires.....	180
3.3.3 Plasmides.....	180
3.3.4 Production lentivirale.....	181

3.3.5 Isolation des lymphocytes T CD8+	181
3.3.6 Transduction lentivirale	182
3.3.7 Essais de prolifération cellulaire	182
3.3.8 Essais d'influx de calcium	183
3.3.9 Isolation des ARNs et qPCR	183
3.3.10 Infection au <i>Listeria monocytogenes</i>	184
3.3.11 Cytométrie en flux.....	184
3.3.12 Analyses statistiques	185
3.4 Résultats	186
3.4.1 L'expression de TMEM16F est régulée lors du développement des thymocytes	186
3.4.2 Modulation de l'expression de TMEM16F lors de l'activation des lymphocytes T	187
3.4.3. TMEM16F est la scramblase calcium-dépendante dominante chez les lymphocytes T murins.....	189
3.4.4 TMEM16F régule la persistance des lymphocytes T activés.....	192
3.4.5 TMEM16F amplifie l'expansion des lymphocytes T.....	193
3.4.6 TMEM16F régule la survie des lymphocytes T activés.....	194
3.4.7 TMEM16F n'influence pas le phénotype d'activation in vitro.....	196
3.4.8 La diminution de l'expression de TMEM16F maintient les lymphocytes T effecteurs dans un phénotype immature.....	198
3.4.9 Diminution de l'activation des cellules T shTMEM16F lors d'une réponse immunitaire protectrice.....	200
Chapitre 4 – Discussion	203
4.1 La perte de l'asymétrie de la PS : un phénomène régulé	203
4.2 Développement d'une nouvelle approche pour étudier l'association dynamique de CD3ε à la MP.....	208

4.3	TMEM16F : le pont entre l'entrée de calcium et la dissociation membranaire de CD3ε..	209
4.3.1	La redistribution de PS régule la dissociation de CD3ε.....	210
4.3.2	Le ciblage de TMEM16F à la MP dans sa fonction de scramblase.....	211
4.3.3	La modulation de la PS à la synapse immunologique régule la dissociation membranaire de CD3ε	213
4.4	La régulation de la PS dans l'initiation de l'activation des cellules T	214
4.5	La redistribution de PS dans l'amplification de l'activation des cellules T	217
4.5.1	TMEM16F amplifie l'activation des cellules T par les TCRs non-engagés.....	218
4.5.1.1	Les TCRs non-engagés amplifient l'activation des cellules T	219
4.5.1.2	TMEM16F active les TCRs non-engagés.....	223
4.5.2	L'engagement en série des TCRs.....	225
4.5.3	L'amplification par les pCMHs du soi	226
4.5.4	La modulation des phosphoinositides	227
4.6	Limitations du modèle cellulaire Jurkat dans l'étude des lipides à la MP et dans la signalisation TCR-proximale	229
4.7	La redistribution de la PS dans la réponse immunitaire des lymphocytes T	231
4.7.1	TMEM16F dans l'éducation des lymphocytes T.....	231
4.7.2	TMEM16F dans l'activation des lymphocytes T primaires.....	234
4.7.3	La PS externalisée comme bouclier contre la perforine	238
4.7.4	Régulation de l'expression de protéines par la PS externalisée	239
4.8	TMEM16F comme cible thérapeutique dans l'immunothérapie du cancer.....	240
4.8.1	Amplification de l'activation des récepteurs chimériques d'antigènes.....	240
4.8.2	Réhabilitation des lymphocytes T épuisés	243
Chapitre 5 - Conclusion		245

Références bibliographiques.....251

Annexes277

 Annexe 1.....278

 Annexe 2.....285

 Annexe 3.....287

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1. – Charge nette des domaines cytoplasmiques des chaînes CD3 du TCR	83
Tableau 2. – Charge nette des chaînes cytoplasmiques de différents récepteurs immuns dotés d'un domaine BRS	86

Liste des figures

Chapitre 1

- Figure 1.** – Séquence d'assemblage des dimères en complexe TCR à la membrane du RE.45
- Figure 2.** – L'affinité de l'interaction TCR-pCMH génère le répertoire des cellules T49
- Figure 3.** – Activation des lymphocytes T par la liaison du pCMH au TCR et au co-récepteur CD4/CD8 lié à la kinase Lck53
- Figure 4.** – La synapse immunologie permet le maintien ou l'extinction de la signalisation selon la force de stimulation58
- Figure 5.** – Différenciation des lymphocytes T CD4+ auxiliaires65
- Figure 6.** – Chevauchement du spectre d'émission du donneur et l'excitation de l'accepteur lorsque les protéines fluorescentes se trouvent à une distance de moins de 10nm83
- Figure 7.** – Mécanismes proposés de dissociation initiale des chaînes CD3ε et CD3ζ du TCR ...94
- Figure 8.** – Modèles d'amplification de l'activation par les peptides non-agonistes pour les co-récepteurs CD4 (pseudodimère) et CD8 (pré-concentration)98

Chapitre 2

- Figure 1.** – Knockdown of endogenous TMEM16F in Jurkat T cells abrogates Ca²⁺-dependent phosphatidylserine redistribution at the plasma membrane.126
- Figure 2.** – Elevated intracellular Ca²⁺ is not sufficient to induce CD3ε dissociation from the plasma membrane.130
- Figure 3.** – Bystander CD3ε dissociation and signal amplification following TCR crosslinking is TMEM16F-dependent.133
- Figure 4.** – TMEM16F is required for bystander TCR activation.138
- Figure 5.** – Mutant TMEM16F constitutively redistributes PS at the plasma membrane and promotes Ca²⁺-induced CD3ε dissociation.142
- Figure 6.** – Mutant TMEM16F expression amplifies bystander CD3ε dissociation and signal amplification following T cell activation.145

Figure 7. –	Mutant TMEM16F expression amplifies T cell signaling through bystander TCR activation.	149
--------------------	---	-----

Chapitre 2 - Figures supplémentaires

Figure 1. –	Figure S1. Knockdown of endogenous TMEM16F in Jurkat T cells abrogates Ca ²⁺ -dependent phosphatidylserine flipping.	161
Figure 2. –	Figure S2. Elevated intracellular Ca ²⁺ is not sufficient to induce CD3ε dissociation from the plasma membrane.	164
Figure 3. –	Figure S3. Bystander CD3ε dissociation and signal amplification following TCR crosslinking is TMEM16F-dependent.	165
Figure 4. –	Figure S4. TMEM16F is required for bystander TCR activation.	168
Figure 5. –	Figure S5. Mutant TMEM16F constitutively redistributes PS at the plasma membrane and promotes Ca ²⁺ -induced CD3ε dissociation.	171
Figure 6. –	Figure S6. Mutant TMEM16F expression amplifies bystander TCR activation and signal amplification following T cell activation.	172
Figure 7. –	Figure S7: Mutant TMEM16F expression amplifies T cell signaling through bystander TCR activation.	174

Chapitre 3

Figure 1. –	Modulation de l'expression de <i>Tmem16F</i> durant le développement des lymphocytes T	187
Figure 2. –	Diminution de l'expression de <i>Tmem16f</i> suivant l'activation de lymphocytes T primaires murins	189
Figure 3. –	Redistribution calcium-dépendante de la PS par TMEM16F chez les lymphocytes T murins	191
Figure 4. –	Réduction de la population des lymphocytes T shTMEM16F suivant leur activation	192
Figure 5. –	Réduction de la division des cellules T shTMEM16F suivant l'activation	194

Figure 6. – Augmentation de la population de cellules apoptotiques dans les cellules shTMEM16F activées	195
Figure 7. – Aucun défaut dans l’expression des marqueurs d’activation suivant l’activation in vitro des cellules shTMEM16F.....	197
Figure 8. – Les cellules shTMEM16F se différencient préférentiellement en phénotype effecteur précoce EEC	200
Figure 9. – Diminution de l’expression des marqueurs d’activation dans les cellules shTMEM16F	202

Chapitre 4

Figure 1. – Méthode d’identification de protéine proximales par la méthode de biotinylation BiOID	207
Figure 2. – Conception des récepteurs chimériques d’antigènes.....	240

Annexe 2

Figure 1. – Phosphorylation des molécules TCR-proximales chez les cellules exprimant la chimère DR ϵ δ suivant leur activation avec l’anti-DR/CD4 ou l’anti-CD3/CD4.....	285
---	-----

Annexe 3

Figure 1. – Organization of modular immune receptors via electrostatic TM interactions. ...	294
Figure 2. – Metabolism and dynamics of anionic lipids of the plasma membrane.	298
Figure 3. – Amino acid sequences of the various cytoplasmic tails of the immune receptor accessory signaling modules.	306
Figure 4. – Proposed mechanisms that regulate TCR triggering through modulation of electrostatic interactions.	314
Figure 5. – Electrostatic interactions regulate immune receptor signaling.....	316

Liste des sigles et abréviations

A-B

ADAM: Désintégrine et Metalloprotéinase

ADCC: Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADN: Acide désoxyribonucléique

Akt: Protéine kinase B

ARN: Acide ribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

ATP11A: Adénosine triphosphatase de type 11A

ATP11C: Adénosine triphosphatase de type 11C

ATPase: Adénosine triphosphatase

BAI1: Brain-specific angiogenesis inhibitor 1

Bam32: *B cell adaptor molecule of 32 kDa*

BCR: Récepteur de cellules B

Bim: Bcl-2-like protein 11

BRS: Domaine riche en résidus basiques

B

Bcl6: B-cell lymphoma 6 protein

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

C

C1: Domaine riche en cystéine 1

cADPR: Adénosine 5'-diphosphate-ribose cyclique

CAR: Récepteur chimérique d'antigène

CARMA1: *Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein 1*

CCL19: *C-C motif chemokine ligand 19*

CCL21: *C-C motif chemokine ligand 21*

CCR7: *C-C chemokine receptor type 7*

CD: *Cluster of differentiation*

CDR: *Complementarity determining region*

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CRAC: *Calcium release-activated channel*

cSMAC: Complexe supramoléculaire central d'activation

CPA: Cellule présentatrice d'antigène

CTL: Lymphocyte T cytotoxique

CTLA-4: *Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*

CX3CL1: *C-X3-C motif chemokine ligand 1*

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

D-E

DAG: Diacylglycérol

DAP10: *DNAX-activating protein 10*

DAP12: *DNAX-activating protein of 12 kDa*

DC: Cellule dendritique

DGK: Diacylglycérol kinase

DN: Thymocyte double-négatif

DP: Thymocyte double-positif

dSMAC: Complexe supramoléculaire distal d'activation

EEC: Cellules effectrices précoces

Eomes: *Eomesodermin*

ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*

F-G-H

FasL: Ligand de Fas

FcεR1γ : Chaîne γ du récepteur d'IgE à haute affinité

FLIM: Microscopie à temps de vie de fluorescence

FRAP: Redistribution de fluorescence après photoblanchiment

FRET: Transfert d'énergie par résonance de type Förster

Gads: Adapteur de protéine relié à Grb2

GAS6: *Growth arrest specific 6*

GATA-3: *GATA binding protein 3*

GDP: Guanosine diphosphate

GEF: Facteur d'échange nucléotidique de la guanine

GlyCAM1: *Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1*

GPVI: Récepteur de collagène glycoprotéine VI

GRP1: *General receptor of phosphoinositides 1*

Grb2: Protéine-2 liant un récepteur de facteur de croissance

GTP: Guanosine triphosphate

GTPase: Guanosine triphosphatase

HEV: Veinule à endothelium épais

I

ICAM: *Intercellular adhesion molecule 1*

ICOS: *Inducible co-stimulatory molecule*

Id2: *Inhibitor of DNA binding 2*

Id3: *Inhibitor of DNA binding 3*

IFN- γ : Interféron γ

I κ b: Inhibiteur de NF- κ B

I κ κ : I κ B kinase

IL: Interleukine

IL-2R: Récepteur de l'interleukine-2

IL-7R α : Chaîne α du récepteur de l'interleukine-7

Inp54p: Inositol polyphosphate-5-phosphatase

IP₃: Inositol-1,4,5-triphosphate

IRF4: Régulateur de l'interféron 4

ITAM: Motif d'Activation des Récepteurs Immuns basé sur la Tyrosine

ITIM: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*

iT_{reg}: Lymphocyte T régulateur induit

ITSM: *Immunoreceptor tyrosine-based switch motif*

I κ k: Tyrosine kinase inductible par l'IL-2

J-K-L-M-N-O

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

KLRG1: *Killer cell lectin like receptor G1*

Lact-C2: Domaine C2 de la lactadhérine

LAMP-1: *Lysosome-associated membrane protein-1*

LAT: Adapteur de l'activation des cellules T

LFA-1: *Lymphocyte function-associated antigen 1*

MAP: Mitogènes activés par des protéines kinases

MARCKS: *Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*

MEK: *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MP: Membrane plasmique

mTFP1: Monomeric teal fluorescent protein 1

mVenus: Monomeric Venus

NFAT: Facteur de transcription des cellules T activées

NF- κ B: *Nuclear factor- κ B*

NAADP: Acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate

NK: Cellules natural killer

NMR: Résonance nucléaire magnétique

ORP: Protéine reliée à la protéine de liaison à l'oxystérol

ORAI1: *Calcium release-activated calcium modulator 1*

P

PA: Acide phosphatidique

PAMP: Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PC: Phosphatidylcholine

pCMH: Peptide présenté sur une molécule du CMH

PD-1: *Programmed cell death protein 1*

PD-L1: *Programmed death ligand 1*

PD-L2: *Programmed death ligand 2*

PK1: *Pyruvate dehydrogenase kinase 1*

PE: Phosphatidyléthanolamine

PG: Phosphatidylglycérol

PH: Domaine d'homologie à la pleckstrine

PI: Phosphoinositide

PI3K: Phosphoinositide-3-kinase

PI4K: Phosphoinositide-4-kinase

PIP5K: Phosphoinositide 4-phosphate 5-kinases

PI(4)P: Phosphatidylinositol-4-phosphate

PI(3,4)P₂: Phosphatidylinositol-3,4-biphosphate

PI(4,5)P₂: Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

PI(3,4,5)P₃: Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PKC: Protéine-kinase C

PLC: Phospholipase C

PSCR1: *Phospholipid scramblase 1*

PRR: Récepteur de reconnaissance des motifs moléculaires

PRS: Domaine riche en proline

PS: Phosphatidylsérine

pSMAC: Complexe supramoléculaire périphérique d'activation

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

PTPN22: *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*

Q-R

RAG: *Recombination-activating gene*

Raf: *Rapidly accelerated fibrosarcoma*

RasGRP: *Ras guanyl nucleotide releasing protein*

RE: Réticulum endoplasmique

RYR : Récepteurs de la ryanodine

S

S1P: Sphingosine-1-phosphate

S1P₁: Récepteur au sphingosine-1-phosphate

SH2: Domaine d'homologie Src 2

SH3: Domaine d'homologie Src 3

SHP: *SH-2-containing protein tyrosine phosphatase 2*

SHIP: *SH2-containing inositol-5-phosphatase*

SLP-76: *Src homology 2 domain containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa*

SOS: *Son of Sevenless*

STIM1: Molécule d'interaction stromale 1

T

TAK1: *Transforming growth factor β -activated kinase 1*

TAM: Récepteurs TYRO3-AXL-MER

T-bet: *T-box protein expressed in T cells*

TCF-1: *T cell factor 1*

T_{CM}: Lymphocyte T central mémoire

TCR: Récepteur de cellules T

T_{EFF}: Lymphocyte T effecteur terminalement différencié

T_{EM}: Lymphocyte T effecteur mémoire

T_{FH}: Lymphocyte T auxiliaire folliculaire

T_{H1}: Lymphocyte T auxiliaire 1

T_{H2}: Lymphocyte T auxiliaire 2

T_{H17}: Lymphocyte T auxiliaire 17

TIM4: *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 4*

TMEM16F: Protéine transmembranaire 16F

TMEM30a: Protéine transmembranaire 30a

THEMIS: Thymocyte-expressed molecule

T_{MP}: Lymphocyte T précurseur mémoire

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α

TNFR1: Récepteur de TNF- α 1

TRAF6: *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*

T_{reg}: Lymphocyte T régulateur

T_{RM}: Lymphocyte T résidant mémoire

U-V-W-X-Y-Z

Xkr8: *Xk-related protein 8*

ZAP-70: Protéine de 70 kDa associée à la chaîne zêta

Acides aminés :

Ala, A: Alanine

Arg, R: Arginine

Asn, N: Asparagine

Asp, D: Acide aspartique

Cys, C: Cystéine

Gln, Q: Glutamine

Glu, E: Acide glutamique

Gly, G: Glycine

His, H: Histidine

Leu, L: Leucine

Lys, K: Lysine

Ile, I: Isoleucine

Met, M: Méthionine

Phe, F: Phénylalanine

Pro, P: Proline

Ser, S: Sérine

Thr, T: Thréonine

Trp, W: Tryptophane

Tyr, Y: Tyrosine

Val, V: Valine

Life is not like water

Things in life don't necessarily flow over the shortest possible route

Haruki Murakami, 1Q84

Remerciements

Je peux me considérer fier du travail que j'ai pu accomplir durant les dernières années, mais l'aboutissement de cette thèse de doctorat n'aurait jamais eu lieu sans le support constant des gens qui m'entourent. Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Etienne Gagnon, pour la confiance et pour m'avoir permis de travailler sur des projets de recherches stimulants dès mon arrivée au laboratoire à la maîtrise. Son enthousiasme débordant et constant pour la science a été une constante source de motivation. Etienne a toujours su me donner des défis et me sortir de ma zone de confort. Je le remercie pour les outils qu'il m'a transmis et pour tout ce que j'ai appris lors de mon doctorat.

Je remercie mes collègues du laboratoire, présents et passés, qui m'ont épaulé dans la poursuite de mon projet de recherche durant les dernières années. Je remercie plus précisément Jordan, Margaux et Rébecca d'avoir rendu le laboratoire un lieu agréable et chaleureux et je suis à tout jamais reconnaissante des liens d'amitié que nous avons pu créer. Je remercie Angélique, Margaux et Raphaël pour leur contribution à mon manuscrit, ainsi que Rébecca pour l'aide essentielle apportée aux travaux en cellules primaires. Je souhaite remercier Etienne et Angélique pour l'organisation d'activités qui ont certainement forgé l'esprit d'équipe du laboratoire.

Je remercie nos collaborateurs, Jean-François Daudelin et Nathalie Labrecque, pour leur contribution aux expériences in vivo. Je souhaite remercier le personnel des plateformes de cytométrie et de microscopie de l'IRIC pour leur disponibilité constante et leur aide essentielle à l'avancement de la recherche. Les affaires académiques de l'IRIC et le département de microbiologie ont été un support constant au cours des années. Je tiens à remercier plus précisément Julie Mantovani pour les sessions de suivi ainsi que pour la création du groupe de rédaction de l'IRIC. Le support, les discussions et l'échange de conseils avec les membres de ce groupe m'ont été essentiels à l'écriture de ma thèse. Enfin, je souhaite remercier les membres de mon comité de thèse pour avoir lu et corrigé ma thèse avec attention, ainsi que les membres de mes comités de suivis et de pré-doc pour m'avoir accompagné et soutenu au cours des dernières années pour mon développement en tant que scientifique.

Je suis fortement reconnaissante des amitiés que j'ai pu me créer à l'IRIC durant les sept dernières années. Je remercie mes amis de l'IRIC pour toutes les discussions, scientifiques ou non, pour le support moral constant et pour tous les beaux moments que nous avons passés ensemble, soit à l'IRIC ou à l'extérieur. Je remercie également mes collègues de l'association étudiante, avec qui j'ai pu m'impliquer dans divers projets stimulants à l'IRIC. Enfin, je remercie mes amis de l'école secondaire, avec qui j'ai énormément grandi en tant que personne durant les dix dernières années.

Finalement, je tiens à remercier les membres de ma famille pour leur amour et pour le support inconditionnel qu'ils m'ont démontré durant mes études. Je suis à tout jamais reconnaissante pour les valeurs qu'ils m'ont inculquées et sans lesquelles je n'aurais pu réaliser une thèse de doctorat.

Avant-propos

Le système immunitaire est un mécanisme de défense complexe contre les pathogènes. Le système immunitaire est composé d'une grande variété de cellules qui régulent de manière spatio-temporelle la réponse contre un agent infectieux. Les lymphocytes T ont un rôle majeur dans la réponse immunitaire cellulaire. Nous commençons à mieux comprendre la cascade de signalisation qui régule l'activation des cellules T. De plus, les facteurs extrinsèques et intrinsèques régulant la différenciation des lymphocytes T en différents sous-types de cellules effectrices ou mémoires sont de plus en plus décrits. Toutefois, les premières étapes de l'activation du récepteur de cellules T restent peu connues. Cette thèse vise à éclaircir les mécanismes d'activation du TCR ainsi que les mécanismes d'amplification de l'activation des lymphocytes T.

Cette thèse est présentée en cinq chapitres. Le premier chapitre vise à introduire les concepts généraux de l'activation des lymphocytes T, puis des problématiques qui nous ont menés à poser nos objectifs de recherche. Le deuxième chapitre est constitué d'un article qui décrit le rôle de la phosphatidylsérine et de l'enzyme TMEM16F dans l'activation des cellules T. Le troisième chapitre est composé de résultats obtenus en modèle murin sur le rôle de la régulation de la phosphatidylsérine dans l'activation des lymphocytes T primaires. Dans le quatrième chapitre, les résultats des chapitres 2 et 3 sont discutés. Les perspectives de recherche découlant de nos observations sont également présentées dans ce quatrième chapitre. Enfin, les conclusions de la thèse sont décrites au cinquième chapitre. En annexe se trouvent des résultats complémentaires au Chapitre 2 ainsi qu'une revue de littérature qui complète le chapitre d'introduction et qui décrit le rôle des interactions électrostatiques dans la biologie et dans l'activation des récepteurs immuns.

Chapitre 1 - Introduction

En ce premier chapitre, nous allons introduire les concepts de régulation de l'activation des lymphocytes T au niveau du récepteur de cellules T (TCR). En premier lieu, la réponse immunitaire générale contre une infection pathogénique sera décrite (Chapitre 1.1). Puis, la biologie et l'ontogenèse des lymphocytes T (Chapitre 1.2) ainsi que leur rôle spécifique lors de la réponse immunitaire sera étudié (Chapitre 1.3). Enfin, nous allons nous concentrer les mécanismes de régulation du TCR chez les lymphocytes T au repos (Chapitre 1.4). Finalement, nous allons étudier les différents mécanismes d'activation du TCR (Chapitre 1.5) et de l'amplification de l'activation des lymphocytes T (Chapitre 1.6). Les objectifs de la thèse découlant des problématiques posées dans l'introduction seront décrits au Chapitre 1.7.

1.1 Le système immunitaire

Le système immunitaire est un mécanisme de protection évolutivement conservé permettant aux organismes de se défendre contre une vaste diversité de pathogènes. Chez les mammifères, les cellules composant le système immunitaire sont générées à partir des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes dans la moelle osseuse. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques en progéniteurs multipotents engendre les deux axes majeurs du système immunitaire, soit le système immunitaire inné et le système adaptatif. Chaque axe du système immunitaire est composé d'une variété de cellules immunitaires différenciées qui sont essentielles à l'homéostasie et à la défense de l'organisme [1].

1.1.1 La réponse immunitaire innée

Le système immunitaire inné agit en tant que première ligne de défense contre les pathogènes. Ce système est dit 'inné' puisque les cellules qui le composent reconnaissent les motifs caractéristiques des pathogènes par des récepteurs encodés de manière fixe dans la lignée germinale. Ces récepteurs, nommés récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRRs), se lient à des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) comme l'ARN double-brin des virus [2].

Les cellules du système immunitaire inné et les cellules sanguines sont générées à partir des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes communs issus des cellules souches hématopoïétiques. Le progéniteur myéloïde commun s'engage dans différentes voies de différenciation menant à la génération des globules rouges, des plaquettes sanguines, des monocytes, des granulocytes ou des cellules dendritiques (DCs). Les cellules du système immunitaire inné générées à partir du progéniteur lymphoïde commun sont les cellules natural killer (NKs) et certaines populations de DCs [1].

Les cellules du système inné circulent constamment dans l'organisme à la recherche d'agents pathogéniques. Lors d'une infection, le pathogène s'introduit dans l'organisme par une brèche dans les barrières physiques comme la peau ou le mucus. L'entrée de l'agent infectieux active une sécrétion locale de chimiokines et de cytokines. Les chimiokines recrutent les cellules du système immunitaire inné au site de l'infection tandis que les cytokines contrôlent leur activation et leur différenciation [1]. Le type de pathogène reconnu par les PRRs des cellules du système immunitaire inné au site de l'infection engendre une sécrétion de cytokines spécifiques qui polariseront la réponse immunitaire adaptative [2].

Les neutrophiles et les macrophages sont recrutés rapidement au site de l'infection, où ils phagocytent les pathogènes et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires [1, 2]. Les DCs et les macrophages capturent les antigènes au site de l'infection et migrent aux organes lymphoïdes secondaires, comme les ganglions lymphatiques, afin de présenter les antigènes aux cellules du système immunitaire adaptatif. La structure des organes lymphoïdes secondaires est adaptée à l'activation, à l'expansion et à la maturation des lymphocytes du système immunitaire adaptatif. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) comme les DCs et les macrophages agissent en tant que pont entre la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative [3].

1.1.2 La réponse immunitaire adaptative

Les cellules du système immunitaire adaptatif reconnaissent spécifiquement les antigènes issus des pathogènes et génèrent une mémoire immunitaire à long terme contre les antigènes infectieux. Les deux populations majeures de cellules composant le système immunitaire adaptatif se développent dans des niches distinctes à partir du progéniteur lymphoïde commun.

Le progéniteur résidant à la moelle osseuse se différencie en lymphocytes B tandis que les lymphocytes T sont générés suite à l'émigration du progéniteur de la moelle osseuse vers le thymus [1].

Les lymphocytes B et T reconnaissent les antigènes pathogéniques à travers un récepteur de surface, soit le récepteur de cellules B (BCR), ou le récepteur de cellules T (TCR), respectivement. Malgré que leur structure soit relativement similaire, le BCR et le TCR reconnaissent les antigènes par un mécanisme distinct. Le TCR reconnaît des fragments digérés d'antigènes présentés sur un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [4]. En contraste, le BCR reconnaît les antigènes dans leur état natif et soluble [2]. Contrairement aux PRRs, qui sont fixés dans le code génétique, les récepteurs des lymphocytes sont uniques et sont générés par réarrangement aléatoire de l'ADN. La diversité générée par les réarrangements génétiques est essentielle à la reconnaissance d'une grande variété d'antigènes exogènes [5].

Suite à la reconnaissance de leurs antigènes, les cellules B et T s'expandent de manière clonale afin de générer une réponse immunitaire robuste et spécifique. Contrairement aux cellules du système immunitaire inné, les lymphocytes nécessitent plusieurs jours de maturation et d'expansion aux organes lymphoïdes secondaires avant de migrer au site de l'infection. Les lymphocytes T sont divisés en deux populations majeures selon leur expression différentielle des co-récepteurs CD4 ou CD8. Les lymphocytes T CD4+ sont des lymphocytes auxiliaires qui régulent l'activation et la fonction effectrice de différentes cellules immunitaires. Les lymphocytes T auxiliaires sont essentiels à la maturation des lymphocytes T CD8+, des lymphocytes B et des CPAs. Une fois activés, les lymphocytes T CD8+ acquièrent des capacités cytotoxiques menant à la mort de cellules cibles [6]. Enfin, les lymphocytes B matures sécrètent des anticorps à haute affinité pour l'antigène.

Les branches innée et adaptative de la réponse immunitaire coopèrent afin de combattre les agents infectieux. Les anticorps sécrétés par les lymphocytes B se lient aux pathogènes et sont reconnus par les récepteurs Fc des cellules du système inné. La fixation d'un anticorps sur les récepteurs Fc active la phagocytose par les macrophages ainsi que la fonction cytotoxique des cellules NKs [1].

Une activation contrôlée des lymphocytes est essentielle à l'efficacité de la réponse immunitaire. Une activation sous-optimale mène à la persistance du pathogène tandis qu'une activation trop robuste entraîne la destruction de tissus sains par les lymphocytes T cytotoxiques. Différents mécanismes de régulation au niveau moléculaire et cellulaire sont en place afin de contrôler le développement et l'activation des cellules T.

1.2 Biologie et ontogenèse des lymphocytes T

Les lymphocytes T orchestrent la réponse immunitaire adaptative afin d'éliminer efficacement un pathogène. Les lymphocytes T reconnaissent par leur TCR des peptides présentés sur des molécules du CMH (pCMHs). La particularité du TCR est qu'il reconnaît à la fois des peptides du soi et des antigènes exogènes chargés sur le CMH, mais avec différentes affinités. La réponse générée par l'interaction à faible affinité avec les pCMHs du soi donne des signaux de survie au lymphocyte T, tandis que l'interaction à plus haute affinité avec un antigène exogène spécifique engendre une réponse immunitaire robuste [7]. Le TCR des lymphocytes T est généré de manière aléatoire et doit ainsi être sélectionné afin de reconnaître les antigènes exogènes tout en maintenant une tolérance aux antigènes du soi. Dans ce sous-chapitre, nous allons étudier la biologie des lymphocytes T et les étapes de leur développement dans le thymus.

1.2.1 Le récepteur de cellules T

Le TCR des cellules T permet la reconnaissance d'antigènes présentés par des CPAs. Le TCR est un complexe formé d'un dimère de chaînes α et β (TCR $\alpha\beta$) ou γ et δ (TCR $\gamma\delta$) associé de manière non-covalente à différents dimères de chaînes CD3. La forte majorité (90-95%) des cellules T sont dotées d'un TCR composé de chaînes α et β [1]. Les chaînes α et β du TCR reconnaissent un peptide présenté sur une molécule du CMH d'une CPA [1]. Les lymphocytes exprimant un TCR $\gamma\delta$ sont une population mineure de lymphocytes T qui reconnaissent des antigènes de manière CMH-indépendante. Les ligands connus du TCR $\gamma\delta$ sont des lipides présentés sur la molécule CD1d [8].

1.2.1.1 Les composantes du complexe du TCR

Les chaînes du TCR sont dotées d'un domaine extracellulaire composé de régions variables et constantes, puis d'un peptide connectant, d'un domaine transmembranaire et d'une chaîne cytoplasmique. La reconnaissance d'antigènes par les molécules du TCR est dictée par des régions hypervariables ("complementarity determining regions" ou CDR) du domaine extracellulaire. Les régions du TCR interagissant avec les molécules présentatrices d'antigènes sont conservées et encodées dans la lignée germinale afin de s'adapter aux polymorphismes des gènes du CMH et de CD1d [9, 10]. Les domaines CDR1 et CDR2 du TCR se lient aux régions conservées du CMH ou de CD1d [8, 10]. En contraste, le domaine CDR3 est soumis à des recombinaisons génétiques afin de reconnaître les divers antigènes présentés par les CPAs [10].

Les chaînes du TCR possèdent un domaine cytoplasmique court et dépourvu de domaine de signalisation intrinsèque. Afin que le signal de reconnaissance du peptide soit transmis à l'intérieur de la cellule, le dimère du TCR s'associe de manière non-covalente avec trois dimères de chaînes de signalisation CD3 ($\epsilon\delta$, $\epsilon\gamma$, $\zeta\zeta$). Les chaînes CD3 possèdent un domaine de signalisation à la portion C-terminale de leurs domaines cytoplasmiques nommé le Motif d'Activation des Récepteurs Immuns basé sur la Tyrosine (ITAM). Les ITAMs sont des modules de signalisation communs à plusieurs récepteurs immuns, comme les chaînes $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ du BCR, certains récepteurs Fc et la molécule adaptatrice DAP12 chez les cellules NKs. Les chaînes $CD3\gamma$, $CD3\delta$ et $CD3\epsilon$ possèdent un seul domaine ITAM tandis que la chaîne $CD3\zeta$ est dotée de trois ITAMs. La séquence canonique des ITAMs est $YxxI/Lx_{(6-8)}YxxI/L$, où les deux tyrosines sont suivies d'un résidu aliphatique de leucine ou d'isoleucine [11]. Lors de l'activation du TCR, les deux tyrosines des ITAMs sont phosphorylées par les kinases Lck ou Fyn de la famille des kinases Src. Les ITAMs phosphorylés agissent comme site de recrutement pour des protéines possédant des domaines d'homologie Src 2 (SH2) en tandem, tel que la kinase ZAP-70 chez les cellules T [12]. Le recrutement de ZAP-70 aux ITAMs phosphorylés initie la cascade d'activation des cellules T.

1.2.1.2 La diversité des TCRs

Les gènes codants pour le domaine CDR3 du TCR sont composés de segments d'ADN nommés variable (V), diversité (D) et jonction (J). Les gènes codants pour les chaînes $TCR\alpha$ et $TCR\gamma$ possèdent des segments V et J, tandis que les gènes de $TCR\beta$ et $TCR\delta$ possèdent également des

segments D. La diversité des TCRs est conférée par le réarrangement génétique des différents segments de gènes V, D, et J lors du développement des lymphocytes T [5]. Chez l'humain, les gènes codants pour le TCR β sont composés de 52 segments V, 2 segments D et 13 segments J. Les gènes du TCR α sont composés de 70 segments V et 61 segments J [13].

Des séquences d'ADN conservées dans les segments VDJ des gènes du TCR sont reconnues et clivées par les enzymes RAG1 et RAG2 [14]. Le clivage génère une cassure double-brin dans l'ADN. Les enzymes RAG1 et RAG2 sont spécifiques aux lymphocytes et la déficience en l'une ou l'autre de ces enzymes résulte en l'absence de lymphocytes B et T matures [15, 16]. La cassure double-brin générée par RAG1/2 est réparée par mécanisme de jonction d'extrémités non-homologues.

Les gènes D et J sont recombinaisonnés en premier, puis le segment V se joint aux segments DJ réarrangés. Aux jonctions d'ADN clivés, soit entre chaque segment V(D)J, des nucléotides sont ajoutés ou supprimés de manière aléatoire, augmentant la diversité des séquences du TCR. La recombinaison de l'ADN aux différents segments VDJ ainsi que l'ajout de nucléotides génère une séquence génétique unique pour chaque gène du TCR [5]. La diversité théorique de TCRs générée par la recombinaison de l'ADN et l'ajout de nucléotide se situe entre 10^{15} et 10^{20} séquences uniques [17].

1.2.1.3 Assemblage du TCR

L'expression du TCR réarrangé à la surface des lymphocytes T nécessite un assemblage complexe entre les différentes chaînes. Les hétérodimères TCR $\alpha\beta$ (ou TCR $\gamma\delta$) s'assemblent par liens hydrogènes dans leurs domaines transmembranaires et un lien disulfure dans le peptide connectant [18]. Les hétérodimères CD3 $\epsilon\delta$ et CD3 $\epsilon\gamma$ s'assemblent par des liens hydrogènes dans leurs domaines extracellulaires [19]. L'homodimère CD3 $\zeta\zeta$ est assemblé par un lien disulfure et des liens hydrogènes entre des résidus polaires dans les domaines transmembranaires du dimère [20].

Le complexe du TCR s'assemble avec une stœchiométrie de 1 :1 :1 :1 pour les chaînes TCR, CD3 $\epsilon\delta$, CD3 $\epsilon\gamma$ et CD3 $\zeta\zeta$ [18, 21, 22]. L'assemblage des différents dimères en complexe TCR fonctionnel est séquentiel et requiert des interactions électrostatiques transmembranaires

(**Figure 1**). Ces interactions sont dictées par des résidus basiques dans les domaines transmembranaires de TCR α et TCR β et des résidus acides dans les portions transmembranaires de chacune des chaînes CD3. En premier lieu, une lysine située dans la troisième hélice transmembranaire de TCR α interagit avec un acide aspartique dans chacune des chaînes du dimère CD3 $\delta\epsilon$. Puis, une lysine de la troisième hélice transmembranaire de TCR β interagit avec un acide aspartique de CD3 ϵ et un acide glutamique de CD3 γ . Finalement, le dimère CD3 $\zeta\zeta$ s'associe au complexe TCR par interaction entre ses acides aspartiques avec une arginine dans la seconde hélice transmembranaire de TCR α [21]. L'assemblage final du TCR est stabilisé par des liens hydrogènes entre les domaines extracellulaires et le peptide connectant des différents dimères du TCR [18]. L'assemblage de complexes par interactions électrostatiques dans les domaines transmembranaires est commun à plusieurs récepteurs immuns (**Annexe 3, Figure 1**).

L'assemblage de chacune des sous-unités du complexe du TCR dans le réticulum endoplasmique (RE) est requis pour l'expression en surface. L'assemblage inadéquat des sous-unités du TCR expose les résidus basiques des domaines transmembranaires des chaînes TCR α et TCR β , entraînant leur dégradation [23].

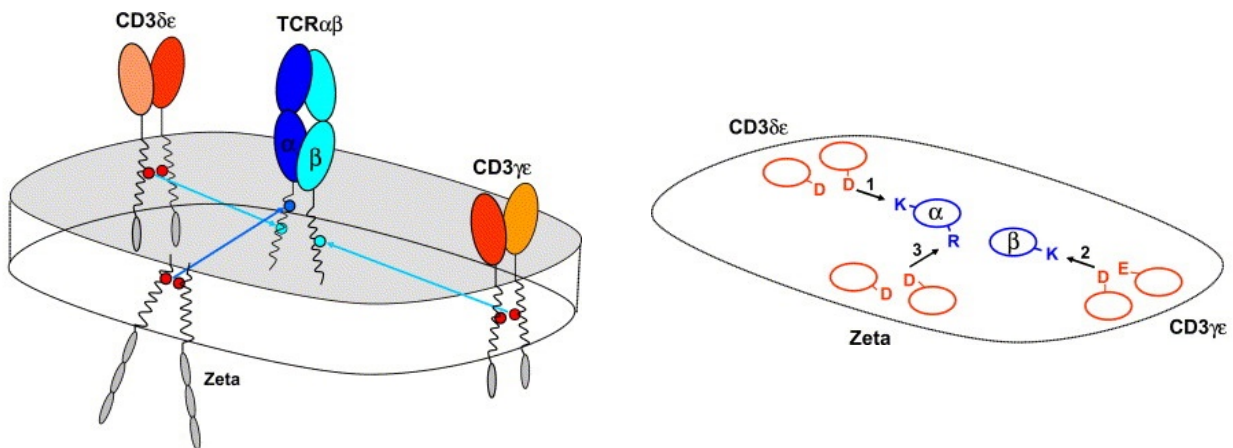


Figure 1. – Séquence d'assemblage des dimères en complexe TCR à la membrane du RE.

Image reproduite avec la permission d'Elsevier (Molecular Immunology, Vol. 40, Matthew E. Call et Kai W. Wucherpfennig, "Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex", p.1295-1305, © 2004) [23].

1.2.2 Développement des lymphocytes T

Les lymphocytes T sont issus des cellules souches hématopoïétiques différenciées en progéniteur lymphoïde multipotent. Le progéniteur lymphoïde migre de la moelle osseuse vers le thymus où il se polarise vers la lignée T. Les précurseurs de cellules T, ou les thymocytes, s'engageront à travers différents stades régulés de différenciation caractérisés par le réarrangement des gènes du TCR, la prolifération et la sélection clonale [24].

Les stades de différenciation des thymocytes sont phénotypiquement caractérisés par leur expression des co-récepteurs CD4 et CD8. Les thymocytes les moins différenciés sont appelés double-négatifs (DNs) par leur absence d'expression de CD4 et CD8. Au stade DN, les thymocytes peuvent générer des lymphocytes exprimant soit le TCR $\alpha\beta$ ou le TCR $\gamma\delta$ [24]. Les thymocytes DN sont divisés en quatre sous-types distincts, du moins différencié (DN1) au plus différencié (DN4). Les thymocytes DN3 réarrangent le gène β du TCR par l'activité de RAG1/2. Afin que la cellule T exprime des TCRs avec une seule spécificité, l'ADN est réarrangé sur seulement un des deux allèles de TCR β à la fois. Le processus d'exclusion allélique permet d'inhiber l'expression simultanée de deux différentes chaînes de TCR β [25].

La chaîne β réarrangée avec succès se joint à la chaîne pré-T α , qui est associée aux chaînes CD3, pour former le complexe du pré-TCR. L'association du TCR β réarrangé avec le pré-T α bloque le processus de réarrangement par RAG1/2 [25]. Une signalisation productive par le pré-TCR mène à la prolifération des thymocytes et à la maturation au stade double-positif caractérisé par l'expression de CD4 et CD8. La signalisation par le pré-TCR est le processus de β -sélection, où seuls des thymocytes exprimant une chaîne TCR β réarrangée progressent au prochain stade de maturation [24].

Au stade DP, la chaîne α se réarrange et s'associe au TCR β , menant à l'expression du TCR $\alpha\beta$ en surface [24]. Contrairement à la chaîne TCR β , les deux allèles du TCR α se réarrangent simultanément. Un des deux allèles codants pour le TCR α sera soumis à une exclusion allélique afin d'exprimer un TCR possédant une seule spécificité [26]. Le développement des lymphocytes T exprimant un TCR composé des chaînes γ et δ est similaire au TCR $\alpha\beta$. Les gènes codant pour les

chaînes TCR γ et TCR δ sont réarrangés et forment un TCR $\gamma\delta$ à la surface du thymocyte au stade DN [27].

Malgré que la diversité théorique des TCRs soit élevée, le nombre de clonotypes de TCRs est estimé à 2.5×10^7 chez l'humain et 2×10^6 chez la souris [17]. Les TCRs sont réactifs à plus d'une séquence peptidique, permettant de pallier à la diversité relativement faible des TCRs en circulation [28]. Étant donné la diversité et la réactivité croisée des TCRs, les thymocytes DP dont le TCR a été réarrangé avec succès sont soumis à une sélection stricte afin d'éviter l'auto-immunité.

1.2.3 Tolérance centrale et périphérique

Le réarrangement des chaînes du TCR étant aléatoire, il est essentiel d'éliminer les clones de thymocytes ayant une forte réaction au soi. Les thymocytes doivent toutefois reconnaître avec une faible affinité les peptides du soi présentés sur un CMH afin de recevoir des signaux essentiels à la survie [24]. Moins de 10% des thymocytes respectent la mince fenêtre de reconnaissance du soi en absence d'auto-réactivité [1, 29]. La sélection des thymocytes dans le thymus contrôle le répertoire des TCRs exprimé par les lymphocytes T en périphérie.

Lors du processus de sélection positive, les cellules stromales du thymus, un sous-type spécialisé de cellules épithéliales, présentent des peptides chargés sur un CMH de classe I ou de classe II aux thymocytes DP exprimant un TCR $\alpha\beta$ réarrangé. Une interaction d'affinité faible ou modérée entre le TCR réarrangé et les pCMHs du soi résulte en une signalisation du TCR et à la survie du thymocyte [24]. Chez environ 85% des cellules DP, l'interaction avec les pCMHs du soi dans le thymus se situe sous le seuil d'affinité nécessaire à la signalisation de survie TCR-dépendante, entraînant la mort par négligence du thymocyte (**Figure 2**) [24, 29].

En contraste, une signalisation trop forte résultant de l'interaction avec le pCMH du soi entraîne la mort cellulaire programmée du thymocyte afin d'éviter les pathologies auto-immunitaires [24]. La mort cellulaire programmée, ou l'apoptose, est un mécanisme de mort cellulaire immunologiquement silencieux résultant en la phagocytose de la cellule apoptotique. L'apoptose est un processus régulé qui est induit soit par une stimulation extrinsèque ou intrinsèque. La voie extrinsèque est activée suite à la stimulation de récepteurs de la mort situés

à la surface des cellules [30]. Chez les thymocytes, une interaction de trop forte affinité entre le TCR et un pCMH du soi induit la protéine pro-apoptotique Bim et l'apoptose par la voie intrinsèque [31]. Les thymocytes apoptotiques sont phagocytés, évitant la dispersion de débris cellulaires et l'inflammation [32].

La sélection positive par les peptides du soi issus des cellules épithéliales corticales du thymus n'élimine pas les thymocytes réactifs contre des antigènes spécifiques à certains tissus de l'organisme [24]. La sélection contre les antigènes exogènes du thymus est accomplie par les cellules épithéliales médullaires du thymus qui expriment AIRE (régulateur de l'immunité) [33]. AIRE permet l'expression de protéines restreintes à certains tissus et normalement réprimées chez les cellules stromales du thymus. L'expression de ces antigènes par les cellules épithéliales médullaires engendre la délétion clonale de thymocytes réactifs aux antigènes du soi non-thymiques (**Figure 2**) [33].

L'intensité et la durée du signal reçu par les thymocytes DP lors de la sélection positive polarisent différemment vers la lignée CD4+ ou CD8+. Une signalisation plus robuste par le TCR polarise les thymocytes vers la lignée CD4+, tandis qu'une signalisation plus faible commet les thymocytes vers la lignée CD8+ [24]. De plus, un signal de sélection d'intensité moyenne, se situant entre la sélection positive et la sélection négative, entraîne la génération de cellules T régulatrices (T_{regs}). Les T_{regs} induisent la tolérance de cellules autoréactives en périphérie par la sécrétion de cytokines inhibitrices, par l'expression de molécules de surface inhibitrice et par la lyse de cellules cibles [34].

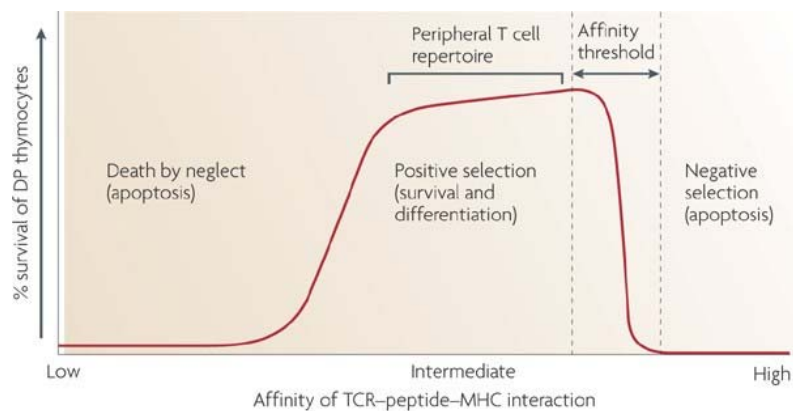


Figure 2. – L’affinité de l’interaction TCR-pCMH génère le répertoire des cellules T

Image reproduite avec la permission de Springer Nature (Nature Reviews Immunology, Vol. 9, Ludger Klein *et al*, “Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction”, p.833-844, © 2009) [35]

Une fois la maturation complétée dans le thymus, les thymocytes migrent vers la périphérie où ils prolifèrent de manière homéostatique IL-7-dépendante par interaction à faible affinité avec des pCMHs du soi [36-39]. Toutefois, la tolérance centrale induite par la délétion clonale de thymocytes autoréactifs n’est pas complètement étanche. Il a été démontré que des cellules T réactives aux peptides du soi circulent en périphérie [40]. La reconnaissance d’agents infectieux par les PRRs des CPAs induit l’expression de molécules de co-stimulation pour l’activation des lymphocytes T [3]. En contraste, la présentation d’antigènes du soi par les CPAs est dépourvue de signaux de co-stimulation. La stimulation de lymphocytes T en absence de co-stimulation entraîne l’anergie de la cellule et inhibe son activation lors de sa restimulation [31]. Ainsi, en plus des mécanismes de tolérance centraux générés par la sélection positive et négative dans le thymus, l’auto-immunité est contrôlée en périphérie par les T_{regs} et l’induction de l’anergie [40].

1.2.4 Circulation des lymphocytes T naïfs

Dans les conditions homéostatiques, c’est-à-dire en absence d’infection, les lymphocytes T naïfs recherchent les antigènes en circulant dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques et la rate [41]. Afin de pénétrer les ganglions, les lymphocytes T sortent du sang par extravasation aux veinules à endothélium épais (HEVs). Les lymphocytes T naïfs expriment différents types de molécules d’adhésion et de récepteurs leur permettant de s’associer à la surface des HEVs pour la migration à travers les cellules endothéliales.

Les lymphocytes T naïfs expriment la sélectine-L (CD62L) qui adhère aux mucines CD34 et GlyCAM1, des protéines glycosylées exprimées à la surface de l’endothélium des HEVs [42].

L'interaction sélectine-mucine entre les lymphocytes T naïfs et les HEVs permet un roulement et un ralentissement des lymphocytes T à la surface de l'endothélium [43]. Les HEVs expriment la chimiokine CCL21 reconnue par le récepteur à chimiokine CCR7 exprimé par lymphocytes T naïfs [44, 45]. L'activation de CCR7 augmente l'expression de l'intégrine LFA-1 à la surface des lymphocytes T [43]. LFA-1 lie une molécule d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines (ICAM-1) exprimée sur les cellules endothéliales des HEVs. L'interaction entre LFA-1 et ICAM-1 mène à l'arrêt et à l'adhésion des cellules T sur les HEVs [43]. Les lymphocytes à l'arrêt migrent à l'intérieur du ganglion par processus de transmigration à travers les cellules épithéliales des HEVs [41].

À l'intérieur du ganglion, les lymphocytes T migrent à la zone T où sont sécrétées les chimiokines CCL21 et CCL19 reconnues par le récepteur CCR7 [44-46]. Au ganglion, les lymphocytes T interagissent avec des CPAs afin de détecter un antigène agoniste présenté sur un CMH [41]. En absence d'interaction productive avec une CPA, les lymphocytes T naïfs quittent les ganglions en exprimant le récepteur au sphingosine-1-phosphate (S1P₁) [47]. La concentration élevée de S1P dans le sang permet la sortie des lymphocytes T des ganglions vers la périphérie pour leur recirculation [47, 48].

1.3 Les lymphocytes T dans la réponse immunitaire

Par leur fonction auxiliaire ou cytotoxique, les lymphocytes T sont essentiels à la réponse immunitaire contre les agents infectieux. La réponse immunitaire des lymphocytes T débute par leur activation par une CPA dans les organes lymphoïdes secondaires. Les signaux de stimulation reçus par l'activation du TCR, les molécules de co-stimulation et les cytokines environnantes programment la différenciation des lymphocytes T vers des phénotypes distincts. Les sous-types de cellules T possèdent une fonction ou un potentiel différentiel de développement en cellules mémoires. Dans ce sous-chapitre, nous allons étudier les lymphocytes T dans la réponse immunitaire, de leur activation jusqu'à leur maintien en tant que cellules mémoires à long terme.

1.3.1 Présentation de l'antigène

Les lymphocytes T parcourent l'organisme à la recherche de leur antigène présenté sur une molécule CMH d'une CPA. Les cellules dendritiques (DCs) sont les principales CPAs qui activent les cellules T naïves. Lors d'une infection, les DCs endocytent les antigènes exogènes provenant du pathogène. La reconnaissance de molécules typiques aux pathogènes par les PRRs induit plusieurs changements chez la CPA afin de maximiser sa capacité de stimulation d'une cellule T. La CPA augmente son expression de CMHs, des molécules de co-stimulation comme CD80, CD86 et CD40, et sécrète des cytokines. La CPA activée migre aux ganglions drainants le site de l'infection afin de présenter l'antigène aux lymphocytes T [3].

Les deux familles de lymphocytes T reconnaissent deux classes différentes de molécules du CMH. Les deux classes de CMHs possèdent une structure similaire, mais présentent des peptides d'origines distinctes aux cellules T [4]. Les classes de CMHs ont évolué afin de présenter le type d'antigène adapté à la fonction des lymphocytes T, soit la fonction auxiliaire ou cytotoxique. La spécificité de liaison au CMH est conférée par le co-récepteur CD4 ou CD8 exprimé par les lymphocytes T [49, 50].

Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent les peptides présentés sur un CMH de classe I. Les CMHs de classes I sont exprimés à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme. Les antigènes présentés sur les CMH de classe I proviennent d'une voie de présentation cytosolique. En absence d'infection, les peptides présentés par le CMH de classe I proviennent de protéines endogènes dégradées lors des processus homéostatiques de la cellule. Le protéasome dégrade constamment des protéines saines ou incorrectement synthétisées afin de recycler les acides aminés pour la synthèse de nouvelles protéines. Les peptides générés par le protéasome sont dirigés vers le RE, où ils sont chargés sur le CMH de classe I. Le chargement d'un peptide sur le CMH dirige le complexe vers l'appareil de Golgi pour son expression en surface. Lors d'une infection avec un pathogène intracellulaire, les protéines pathogéniques sont dégradées par le protéasome et chargées sur le CMH par un mécanisme identique aux protéines endogènes. L'ubiquité des CMH de classe I permet aux lymphocytes T cytotoxiques de reconnaître et de tuer avec précision toutes cellules de l'organisme infectées par un pathogène intracellulaire [4].

En contraste, les lymphocytes T CD4+ reconnaissent les CMHs de classe II. Chez les cellules immunitaires, l'expression du CMH de classe II est restreinte aux CPAs, soit les DCs, les macrophages et les lymphocytes B. Les peptides présentés sur les CMHs de classe II sont d'origine exogène et sont présentés suite à une dégradation par voie endocytaire. Les CPAs reconnaissent l'antigène exogène et l'internalisent par vésicules endocytaires. Dans les endosomes, des enzymes dégradent l'antigène en peptides. Les peptides dégradés se lient au CMH de classe II dans les endosomes, puis le complexe est transporté à la surface de la cellule. La stimulation des lymphocytes T auxiliaires par les CMHs de classe II permet de polariser ces lymphocytes T afin de monter une réponse immunitaire spécifique au type de pathogène rencontré [4].

Finalement, les CPAs ont la capacité de présenter un antigène exogène par le CMH de classe I aux lymphocytes T CD8+ par le processus de présentation croisée. Les CPAs non-infectées internalisent un antigène exogène par endocytose et phagocytose [51, 52]. L'antigène est transporté dans le cytosol, où il est dégradé par le protéasome [51, 52]. L'antigène dégradé est transporté au RE et est chargé sur un CMH de classe I [51]. Une voie alternative de présentation croisée est le recrutement de composantes du RE aux phagosomes. Les peptides exogènes dégradés au cytosol sont transportés aux phagosomes où ils sont chargés sur le CMH et classe I [52, 53]. La présentation croisée permet aux CPAs non-infectées d'activer les lymphocytes T CD8+.

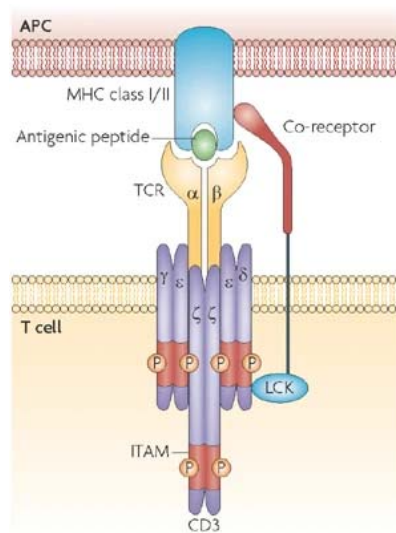
1.3.2 Voies de signalisation du TCR

Les signaux générés par la force de stimulation du TCR, de l'engagement des récepteurs de co-stimulation et des cytokines environnantes convergent en plusieurs voies de signalisation complexes qui conduisent à l'expansion des lymphocytes T spécifiques au pathogène.

1.3.2.1 Interaction TCR-pCMH et signalisation initiale

Les lymphocytes T sont activés suite à une stimulation de leur TCR par un pCMH agoniste présenté par une CPA [54]. Le TCR reconnaît avec une grande spécificité le peptide présenté sur le CMH par les domaines CDR3 réarrangés des chaînes TCR α et TCR β [10]. Les domaines CDR1 et CDR2 du TCR se lient au CMH et stabilisent l'interaction des domaines CDR3 avec le peptide [55].

Le co-récepteur CD4 ou CD8 se lie aux régions conservées du CMH de classe II ou de classe I, respectivement, afin de stabiliser l'interaction entre le lymphocyte T et la CPA [49, 50]. Le domaine cytoplasmique des co-récepteurs CD4 et CD8 est associé à Lck, une tyrosine kinase de la famille Src (**Figure 3**) [56, 57]. Lck est également associé à la bicouche lipidique de la membrane plasmique (MP) par modifications post-translotionnelles hydrophobiques de myristoylation et de palmitoylation dans son domaine N-terminal [58, 59]. Une proportion des kinases Lck sont constitutivement actives chez les lymphocytes T au repos [60]. En conditions homéostatiques, l'activité kinase de Lck est constamment contre-balançée par la phosphatase CD45 [54]. La stimulation du TCR par un pCMH et la liaison du co-récepteur au CMH recrute Lck aux chaînes CD3 du TCR [61]. En parallèle, la phosphatase CD45 est exclue de la zone d'interaction lymphocyte T-CPA par son domaine extracellulaire large [62, 63]. Ce débalancement kinase-phosphatase permet la phosphorylation des ITAMs des chaînes CD3 du TCR par Lck [62-64].



Nature Reviews | Immunology

Figure 3. – Activation des lymphocytes T par la liaison du pCMH au TCR et au co-récepteur CD4/CD8 lié à la kinase Lck

Image reproduite avec la permission de Springer Nature (Nature Reviews Immunology, Vol. 8, Nicholas R.J. Gascoigne, "Do T cells need endogenous peptides for activation?", p.895-900, © 2008) [65]

Les tyrosines phosphorylées des ITAMs des chaînes CD3 recrutent la kinase ZAP-70 par son domaine SH2 en tandem [12]. Le recrutement de ZAP-70 au TCR entraîne sa phosphorylation et son activation par Lck [66]. ZAP-70 phosphoryle plusieurs tyrosines sur l'adaptateur transmembranaire de l'activation des cellules T (LAT) [67, 68]. La protéine adaptatrice LAT phosphorylée forme un signalosome, permettant le recrutement de protéines dotées de domaines SH2 [68]. Le signalosome LAT recrute la phospholipase C γ 1 (PLC- γ 1), et les protéines adaptatrices Grb2 et Gads [69-71]. En plus du domaine SH2, Grb2 et Gads possèdent des domaines SH3, permettant de recruter au signalosome LAT des protéines dotées de motifs canoniques riches en prolines ou du domaine non-canonique RxxK [72]. Le recrutement de protéines par Grb2 et Gads au signalosome LAT est une étape critique de la signalisation des cellules T. Grb2 recrute SOS, qui comme nous allons en discuter plus loin, est essentiel à l'initiation d'une voie de signalisation des cellules T [69]. Gads recrute la protéine adaptatrice SLP-76 à LAT, qui est ensuite phosphorylée par ZAP-70 [73]. Le rapprochement de SLP-76 et de LAT à travers Gads est critique à l'influx de calcium robuste observé chez les cellules T activées [72].

Enfin, le récepteur de co-stimulation CD28 se lie aux molécules CD80 et CD86 sur la CPA [54]. Le recrutement de CD28 près du complexe TCR-CD4/CD8 mène à sa phosphorylation par Lck [74]. La phosphoinositide-3-kinase (PI3K) est recrutée par son domaine SH2 aux phosphotyrosines du complexe LAT/SLP-76 ainsi qu'au domaine cytoplasmique phosphorylé de CD28 [75, 76]. PI3K est ensuite activée par un mécanisme toujours non élucidé chez les lymphocytes T. PI3K phosphoryle le lipide membranaire phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI(4,5)P₂) en phosphatidylinositol-3,4,5-biphosphate (PI(3,4,5)P₃) [54]. La génération de PI(3,4,5)P₃ recrute la kinase Itk par son domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) [77]. Lck phosphoryle et active l'activité kinase d'Itk [78]. La kinase Itk catalytiquement active se lie à SLP-76, lui permettant de phosphoryler ce dernier [79, 80]. La phosphorylation de SLP-76 au résidu Y173 par Itk induit un

changement conformationnel chez PLC- γ 1, qui est requis pour sa phosphorylation [81, 82]. Ainsi, le recrutement d'Itk au signalosome LAT à travers SLP-76 et Gads mène à la phosphorylation et l'activation de PLC- γ 1 [78, 79, 83]. PLC- γ 1 hydrolyse PI(4,5)P₂, entraînant une augmentation du calcium intracellulaire essentielle à l'activation de voies de signalisation en aval de la stimulation du TCR [84].

1.3.2.2 Formation et maturation de la synapse immunologique

L'interaction entre un lymphocyte T et une CPA présentant un pCMH agoniste mène à la formation de la synapse immunologique. La synapse immunologique est composée de TCRs, de molécules de co-stimulation et de molécules d'adhésion. Des microagrégats de moins d'une centaine de TCRs et de récepteurs de co-stimulation CD28 se forment dans les secondes suivant le contact entre le lymphocytes T et la CPA [85-87]. Les agrégats de TCRs co-localisent également avec les molécules de signalisation Lck, ZAP-70, LAT et SLP-76, et excluent la phosphatase CD45 [85, 86, 88]. La partition latérale des molécules de signalisation à l'intérieur des microagrégats de TCRs favorise la balance kinase-phosphatase vers un état d'activation.

Plusieurs modèles ont été proposés pour la compréhension de la réorganisation latérale des protéines à la MP des cellules T activées. Des études ont démontré que les protéines de signalisation des cellules T sont partitionnées dans différents nanodomains de lipides à la MP [89, 90]. Les régions lipidiques ordonnées, aussi appelées radeaux lipidiques, sont riches en cholestérol et phospholipides saturés, tandis que les régions désordonnées sont riches en lipides insaturés [91]. Le modèle des radeaux lipidiques postule que chez les lymphocytes T, les radeaux lipidiques recrutent et organisent la localisation latérale de différentes protéines requises à la signalisation des cellules T [92, 93]. Une étude de microscopie réalisée avec le marqueur Laurdan, qui démontre un spectre d'émission distinct selon la condensation des lipides, a démontré que les TCRs résident dans les régions lipidiques ordonnées chez les lymphocytes T au repos [94]. Puis, lors de l'activation des cellules T, les lipides s'organisent en domaines ordonnés à la synapse immunologique de manière Lck-dépendante [95]. En contraste, le rapporteur composé de la toxine B du choléra, qui s'associe au glycosphingolipide GM1 dans les radeaux lipidiques, ne se trouve ni exclu ni enrichi des microagrégats de TCRs ou de la synapse immunologique [92, 93, 95]. Toutefois, il a été démontré que la toxine B du choléra ne se co-localisent pas nécessairement

avec les lipides ordonnés chez les lymphocytes T puisqu'elle s'associe également aux protéines glycosylées à la surface de la cellule [92, 96]. L'étude des protéines composant les radeaux lipidiques est compliquée par les méthodes d'extraction utilisées pour leur isolation. Les détergents utilisés pourraient résulter en des artéfacts, comme le mélange de domaines membranaires qui seraient séparés latéralement à la MP de la cellule [92]. Ainsi, la l'importance des radeaux lipidiques dans la fonction et l'organisation latérale des protéines à la MP lors de l'activation des cellules T reste controversée.

Le modèle des îlots postule que les TCRs et les molécules de signalisation résident dans des îlots de protéines distincts chez les cellules T au repos, et ces îlots préformés s'agrègent lors de l'activation afin de former les microagrégats de TCRs [89, 97, 98]. Il a été démontré que les microagrégats composés de TCRs et de LAT se rapprochent, sans se fusionner, lors de la stimulation des cellules T sur une bicouche lipidique composées de pCMHs et la molécule d'adhésion ICAM-1 [97]. En contraste, une autre étude a démontré que TCR et LAT se mélangent avec ZAP-70 chez des cellules T activées par des anticorps anti-CD3 immunobilisés [89]. Les différences observées pourraient être attribuées à la méthode d'activation, où le TCR se retrouve immobilisé ou non. Enfin, il a été démontré que ce sont plutôt des molécules de LAT recrutées à la MP à partir de vésicules intracellulaires qui sont impliquées dans la signalisation [99]. Les modèles de réorganisation des protéines de signalisation, que ce soit par les radeaux lipidiques, les îlots de protéines ou le recrutement par les vésicules, ne sont pas mutuellement exclusifs et chacun de ces mécanismes pourrait contribuer à la formation des microagrégats de TCRs et à une balance kinase-phosphatase favorisant l'activation des TCRs.

Dans les minutes suivant la stimulation, les agrégats de TCRs activés convergent vers le centre de l'aire de contact entre le lymphocyte T et la CPA [85, 86, 88, 100, 101]. Le cœur de la synapse immunologique est nommé le complexe supramoléculaire central d'activation (cSMAC). Le centre du cSMAC est riche en TCRs mais dépourvu du co-récepteur CD4 et de molécules de signalisation [101]. En périphérie du cSMAC, des nouveaux agrégats de TCRs phosphorylés sont continuellement générés et co-localisent avec les molécules de signalisation Lck, ZAP-70, SLP-76 et CD28 [85-88]. Les agrégats de TCRs nouvellement générés migrent au cœur du cSMAC où ils deviennent confinés et internalisés [86, 102, 103]. Entourant la région de signalisation du cSMAC

se trouve le complexe supramoléculaire périphérique d'activation (pSMAC). Le pSMAC maintient l'adhésion avec la CPA par interaction entre LFA-1 et ICAM-1 [100, 104, 105]. La région limite de la synapse immunologique est le complexe supramoléculaire distal d'activation (dSMAC). Le domaine extracellulaire large de la phosphatase CD45 mène à son exclusion au dSMAC et à sa ségrégation des régions de signalisation de la synapse immunologique [106]. L'organisation complexe de la synapse immunologique permet de réguler les molécules de signalisation de manière spatio-temporelle afin de maintenir la phosphorylation des TCRs.

La stabilité des microagrégats de TCRs et de la synapse immunologique est essentielle à la prolifération et à la fonction effectrice des lymphocytes T. L'activation des lymphocytes T est sensible à la densité et à l'affinité des peptides présentés par une CPA. La synapse immunologique se forme malgré une faible densité de ligand ou avec des peptides de faible affinité [103, 107]. En effet, seulement dix interactions TCR-pCMH sont nécessaires afin de former une synapse immunologique [107]. De plus, les cascades de signalisation TCR-proximales sont engagées aussi efficacement suivant un nombre élevé ou faible d'interactions TCR-pCMH [102]. En revanche, un nombre plus élevé d'interactions TCR-pCMH est requis pour l'activation robuste de la cellule T et pour sa prolifération [108]. La CPA doit présenter de 50 à 200 peptides agonistes sur ses CMHs, soit l'équivalent de moins de 0.1% des peptides présentés, afin de mener à la prolifération et à la production de cytokines par la cellule T [109, 110].

Il est toujours peu compris comment si peu d'interactions entre TCRs et pCMHs engendrent une réponse robuste de la cellule T [111]. De plus, l'affinité entre le TCR et le peptide présenté par un CMH est très faible. La constante de dissociation entre le TCR et un pCMH agoniste se situe entre 0.1-100 μ M et l'interaction a une durée de quelques secondes [112-115]. Ainsi, une interaction d'au moins deux heures avec la CPA est nécessaire afin de déclencher le processus de division de la cellule T [105]. La concentration des pCMHs et des TCRs en microagrégats augmente l'avidité des interactions TCRs-pCMHs. L'avidité résulte de la combinaison des affinités de chaque interaction entre un TCR et un peptide. L'activation des cellules T est corrélée à l'avidité des TCRs [116]. Afin d'activer un maximum de TCRs, malgré la quantité faible de pCMHs agonistes et l'affinité faible du TCR pour l'antigène, il a été proposé que les TCRs sont engagés en série par le même pCMH [111]. L'activation d'un TCR mène à la

dissociation et à la réassociation rapide du pCMH sur un autre TCR se situant à proximité. Ainsi, le rapprochement des TCRs à l'intérieur de microagrégat augmente le nombre de TCRs engagés par le même pCMH afin d'amplifier la signalisation des lymphocytes T activés.

La stimulation avec une concentration élevée de peptide agoniste mène à la migration des TCRs activés au cSMAC où ils sont internalisés [86]. En parallèle, une stimulation avec une faible dose de peptide agoniste maintient la signalisation au cSMAC [102]. Un peptide partiellement agoniste requiert une plus forte concentration ou une plus longue durée de stimulation afin de générer une réponse similaire au peptide agoniste [113, 117]. La synapse immunologique augmente la capacité de stimulation de peptides à faible affinité en permettant le maintien de la signalisation et en diminuant l'internalisation des TCRs [102, 117]. Ainsi, le rôle de la synapse immunologique est de moduler la signalisation et l'internalisation selon l'affinité et la densité de peptides afin de maximiser la stimulation des cellules T (**Figure 4**) [118].

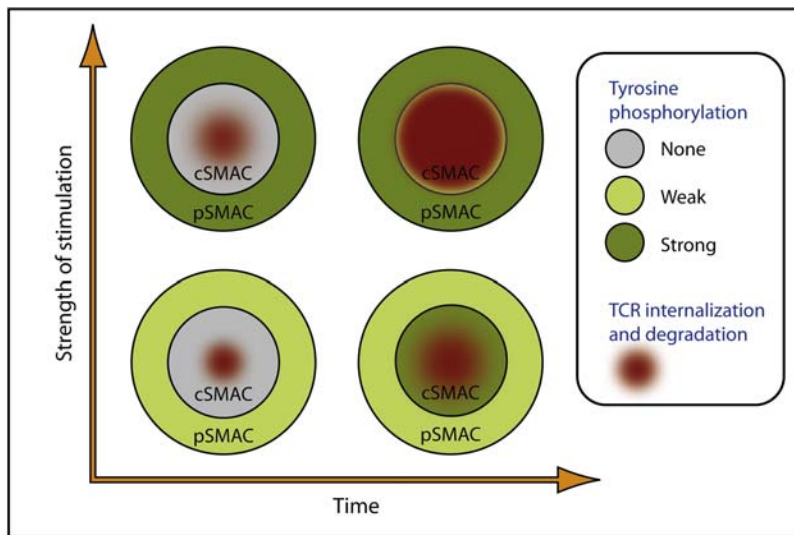


Figure 4. – La synapse immunologique permet le maintien ou l'extinction de la signalisation selon la force de stimulation

Image reproduite avec la permission d'Elsevier (Immunity, Vol. 29, Salvatore Valitutti, "Immunological synapse : Center of attention again", p.384-386, © 2008) [119]

1.3.2.3 Influx de calcium

Suite à la stimulation du TCR et à l'activation de PLC- γ 1 au signalosome LAT, PI(4,5)P₂ est hydrolysé entre le groupement glycérol et phosphoryle du glycérophospholipide. La réaction résulte en un produit lipidique maintenu à la MP, le diacylglycérol (DAG), et en un messenger secondaire soluble, l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃). L'IP₃ diffuse dans le cytoplasme, où il s'associe au récepteur à l'IP₃ au RE [120]. Le récepteur d'IP₃ est un canal ionique dont l'activation mène à une sortie de calcium du RE vers le cytoplasme [120].

Comme l'IP₃, les messagers secondaires acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate (NAADP) et adénosine 5'-diphosphate-ribose cyclique (cADPR) sont impliqués dans le relâchement de calcium du RE lors de l'activation des cellules T. Le NAADP et le cADPR se lient aux récepteurs de la ryanodine (RYRs) au RE, causant une translocation du calcium vers le cytoplasme. Le NAADP est produit dans les secondes suivant la stimulation du TCR [121]. Le NAADP fixe le récepteur RYR1, et le calcium relâché par ce canal ionique facilite l'activation du récepteur à l'IP₃ afin d'augmenter la sécrétion de calcium du RE vers le cytoplasme [122]. Le cADPR se lie à RYR3 dans les minutes suivant l'activation du TCR et permet le maintien de la signalisation du calcium chez les cellules T activées [123, 124].

La déplétion des réserves lumineuses du RE entraîne un influx de calcium par des canaux calciques activés par la libération de calcium (CRAC). La molécule d'interaction stromale 1 (STIM1) est un senseur de calcium et migre vers la MP suite à la déplétion du RE en calcium [125, 126]. STIM1 forme un oligomère et s'accumule aux jonctions entre le RE et la MP, où il co-localise avec ORAI1, qui forme le pore du canal CRAC à la MP [127-131]. L'association entre l'oligomère de STIM1 et un hexamère ORAI1 induit un changement conformationnel et l'activation de la fonction de canal calcique d'ORAI1 [132-136]. Chez les lymphocytes T activés, STIM1 et ORAI1 s'accumulent à la synapse immunologique, où un influx de calcium robuste et localisé est généré [137]. Des microdomaines de calcium se forment à la synapse immunologique moins d'une seconde suivant la stimulation des cellules T [121, 122, 137]. Puis, dans les secondes suivant l'activation des cellules T, l'élévation du calcium cytosolique se répand de la synapse immunologique vers la globalité du cytoplasme [121, 122, 137].

Une concentration élevée et soutenue du calcium cytosolique est nécessaire pour l'immobilisation de la cellule T et le maintien d'une synapse immunologique stable avec la CPA [138]. Les mitochondries absorbent le calcium à la synapse immunologique, ce qui promeut la synthèse d'ATP. Les lymphocytes T activés excrètent de l'ATP vers le milieu extracellulaire à travers des canaux à la MP [84]. L'ATP extracellulaire se lie au récepteur purinergique P2X7 de manière autocrine ou paracrine, entraînant un influx de calcium cytoplasmique par P2X7 [84, 139]. Ce mécanisme de rétroaction positive permet de soutenir l'influx de calcium chez les lymphocytes T activés.

1.3.2.4 Voie de signalisation NFAT

La signalisation du calcium chez les cellules T activées est essentielle à la réponse immunitaire. Un défaut dans la fonction des canaux CRAC par la mutation d'ORAI1 mène au déficit immunitaire combiné sévère caractérisé par des infections à répétition chez les patients atteints [140]. La majorité des gènes induits suite à l'activation des lymphocytes T sont calcium-dépendant [141]. Suite à l'influx de calcium généré par la stimulation du TCR, les ions de calcium s'associent à la calmoduline, qui subit un changement conformationnel pour s'associer à ses substrats [142]. La calmoduline fixe et active la phosphatase calcineurine [143]. La calcineurine déphosphoryle le facteur de transcription des cellules T activées (NFAT), induisant l'exposition de son signal de localisation nucléaire et masquant son signal d'export du noyau [144, 145]. NFAT transloque au noyau et cible l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription, des récepteurs de surface et des cytokines [146, 147]. L'élévation soutenue de calcium au cytoplasme est essentielle au maintien de l'activité transcriptionnelle de NFAT au noyau [148].

1.3.2.5 Voie de signalisation NF- κ B

L'engagement du TCR et du co-récepteur CD28 initie la voie de signalisation NF- κ B, un facteur de transcription majeur régulant l'activation des cellules T et la réponse immunitaire. La voie NF- κ B est activée par les protéines kinases C (PKCs). Une des isoformes de PKC exprimé chez les cellules T, PKC- θ , est recrutée à DAG à la MP par son domaine riche en cystéine 1 (C1). En parallèle, PKC- θ est également recruté au domaine cytoplasmique de CD28 par l'entremise de la kinase Lck [74, 149]. PKC- θ est activé par la kinase PDK1, qui est recrutée à PI(3,4,5)P₃ par son

domaine PH [150, 151]. À son tour, PKC- θ phosphoryle un complexe composé de la protéine CARMA1, ce qui recrute l'ubiquitine ligase TRAF6 [152, 153]. Le facteur de transcription NF- κ B est maintenu inactif au cytoplasme par l'inhibiteur de NF- κ B (I κ B) [154]. La kinase I κ B (I κ K) est activée par ubiquitination par TRAF6 [153]. I κ K phosphoryle I κ B, menant à son ubiquitination et à sa dégradation au protéasome [155]. La dégradation d'I κ B permet la translocation de NF- κ B au noyau, où il régule plus d'une centaine de gènes associés à l'expression de récepteurs de surface, de molécules d'adhésion, de chimiokines et de cytokines [154].

1.3.2.6 Voie de signalisation MAP kinase

La voie des mitogènes activés par des protéines kinases (MAP kinases) est évolutivement conservée et commune à plusieurs voies de signalisation résultant de l'activation de récepteurs de surface. La voie MAP kinase est initiée par l'activation de Ras. Ras est constitutivement associé à la MP par modifications hydrophobiques de farnesylation et de palmitoylation, mais est maintenu inactif par son association à la GDP [156]. Les facteurs d'échange nucléotidique de la guanine (GEFs) SOS et RasGRP activent Ras en transférant le GDP par un GTP [69, 157]. SOS est constitutivement associé à la protéine Grb2, qui est recrutée au signalosome LAT [69]. En parallèle, le GEF RasGRP est recruté au second messager lipidique DAG à la MP [157]. Le recrutement de SOS et de RasGRP au signalosome LAT et à la MP, respectivement, permet un rapprochement vers leur substrat Ras pour son activation.

Dans la voie canonique MAP kinase, la forme activée de Ras fixe et active la sérine/thréonine kinase Raf. Raf phosphoryle et active MEK, qui à son à son tour phosphoryle la MAP kinase ERK [158]. Les MAP kinases alternatives p38 et JNK sont également mobilisées suivant l'activation des cellules T [159]. Les substrats des MAP kinases sont des facteurs de transcription qui régulent la différenciation, la prolifération et la sécrétion de cytokines [158, 159].

1.3.2.7 Internalisation des TCRs et extinction de la signalisation

Chez les lymphocytes T au repos, l'expression des TCRs en surface est régulée par une internalisation continue dans les endosomes et un recyclage vers la surface [160]. Suite à l'activation des lymphocytes T, les TCRs phosphorylés et les TCRs non-phosphorylés sont internalisés au cSMAC [102, 161, 162]. L'activation des lymphocytes T diminue le recyclage des

TCRs internalisés vers la surface et induit la dégradation d'une portion des TCRs au lysosome [160, 163]. L'internalisation des TCRs agit également comme mécanisme de prolongation de la signalisation des lymphocytes T. Une portion des TCRs internalisés sont retenus aux endosomes avec la kinase Lck et prolongent la signalisation de la cellule T [163]. En parallèle, les TCRs non-phosphorylés mais co-internalisés au cSMAC suite à une stimulation robuste sont redirigés vers la synapse immunologique où ils sont réexprimés en surface [111, 164, 165]. De plus, des TCRs non-activés internalisés hors de la synapse immunologique y sont redirigés par recyclage endosomal afin de maintenir l'activation de la cellule T en surface [166]. La rétention des TCRs phosphorylés aux endosomes et la réexpression de TCRs non-activés contrôle la quantité de TCRs qui seront phosphorylés pour une réponse robuste de la cellule T. En effet, l'activation robuste de la cellule T entraîne l'internalisation de la majorité des TCRs [111]. La quantité de TCRs internalisés augmente avec la dose ou l'affinité des peptides, indiquant que l'internalisation des TCRs prévient la stimulation excessive des cellules T [111, 167, 168].

L'extinction de la signalisation du TCR est également achevée par différentes phosphatases. La phosphatase SHP-1 est recrutée au signalosome LAT et déphosphoryle Lck et ZAP-70. Ces kinases sont également déphosphorylées par la phosphatase PTPN22 [54]. Les récepteurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4 sont exprimés dans les 24 heures suivant la stimulation des lymphocytes T [169]. Les ligands de PD-1 (PD-L1 et PD-L2) sont exprimés sur une variété de cellules immunitaires et non immunitaires, incluant certaines cellules tumorales [170]. PD-1 possède un domaine ITSM et un domaine ITIM dans sa chaîne cytoplasmique. Ces domaines sont phosphorylés par des kinases Src suivant l'engagement de PD-1 avec ses ligands. La phosphatase SHP-2 est recrutée par son domaine SH2 aux tyrosines phosphorylées des domaines ITSM et ITIM de PD-1 [171]. SHP-2 déphosphoryle le TCR ainsi que plusieurs molécules de signalisation TCR-proximales [172]. CTLA-4 réduit la signalisation par CD28 en compétitionnant pour les ligands CD80 et CD86 [170]. Les récepteurs inhibiteurs réduisent la prolifération, la sécrétion de cytokines et la survie des lymphocytes T activés [170].

Enfin, la modulation de DAG à la MP de la synapse immunologique entraîne l'extinction de cascades de signalisation TCR-dépendantes. Lors de la maturation de la synapse immunologique, l'activité de PI3K au pSMAC recrute des diacylglycérol kinases (DGKs) à la MP par

leurs domaines C1 en tandem [173, 174]. Le messenger secondaire lipidique DAG, généré par l'hydrolyse de PI(4,5)P₂ par les PLCs, est phosphorylé par les DGKs afin de produire l'acide phosphatidique (PA) [175]. La conversion de DAG en PA entraîne la translocation de RasGRP de la MP vers le cytosol, et ainsi atténue la signalisation par Ras et la voie MAP kinase [176-178].

1.3.3 Expansion des lymphocytes T

La convergence des voies de signalisation NFAT, NF-κB et MAP kinase entraînent la transcription de plusieurs gènes de cytokines au noyau. Le gène de la cytokine IL-2 est une cible commune de ces trois voies de signalisation, menant à la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T activés. Les lymphocytes T au repos expriment les chaînes β et γ du récepteur à l'IL-2 (IL-2R), qui possèdent une affinité modérée pour l'IL-2 [179]. La chaîne γ de l'IL-2R, nommée la chaîne γ commune, forme également une sous-unité des récepteurs des interleukines IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 [180]. L'activation des lymphocytes T induit l'expression de la chaîne α de l'IL-2R, qui forme le récepteur à haute affinité pour l'IL-2 en s'associant aux chaînes β et γ. La synergie entre la sécrétion de l'IL-2 et l'expression du récepteur à haute affinité mène à la prolifération robuste et à l'expansion clonale des lymphocytes T activés [179]. Dans les 3-4 jours suivant l'interaction initiale avec la CPA, les cellules T activées se divisent chaque 4-8 heures pour environ 7-8 divisions [181]. Le niveau d'expansion des lymphocytes T activés est proportionnel à l'affinité du peptide, aux signaux de co-stimulation et aux cytokines sécrétées par la CPA [182]. À l'achèvement de la phase d'expansion, plus de 10⁷ lymphocytes T effecteurs sont générés [183]. L'expansion clonale des lymphocytes T spécifiques au pathogène est essentielle pour une réponse immunitaire adaptative efficace.

1.3.4 Différenciation des lymphocytes T CD4+

Le type de pathogène reconnu par les CPAs ainsi que l'environnement inflammatoire induisent une sécrétion de cytokines menant à une polarisation différentielle des lymphocytes T CD4+. Les cytokines produites par les CPAs lors de la stimulation des lymphocytes T CD4+ régulent l'expression de facteurs de transcription spécifiques qui influencent différents programmes transcriptionnels (**Figure 5**) [184]. La différenciation des lymphocytes T CD4+ en sous-types

distincts de cellules auxiliaires résulte en une réponse immunitaire spécifique et efficace contre le pathogène rencontré.

La reconnaissance d'un pathogène intracellulaire par les PRRs des CPAs mène à la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-12 [185]. Les voies de signalisation activées par l'IL-12 induiront l'activité du facteur de transcription T-bet, qui régule l'expression de gènes polarisant les lymphocytes T CD4+ naïfs vers un phénotype T auxiliaire 1 (T_H1) [186]. Les T_H1 sécrètent les cytokines pro-inflammatoires IL-2, interféron- γ (IFN- γ) et facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et activent les DCs, les macrophages et les lymphocytes T CD8+ vers une réponse immunitaire cellulaire [186-188]. En contraste, un pathogène extracellulaire induit la sécrétion de l'IL-4 par les cellules du système immunitaire inné [189]. L'IL-4 régule le facteur de transcription GATA-3 qui polarise le lymphocyte T CD4+ en lymphocyte T_H2. Les lymphocytes auxiliaires T_H2 supportent l'activation des lymphocytes B et des éosinophiles [190, 191]. Le programme de différenciation vers le phénotype T_H1 antagonise la polarisation vers le phénotype T_H2, et vice-versa [186].

D'autres cytokines activent l'expression de facteurs de transcription qui régulent la différenciation de lymphocytes T CD4+ en sous-types additionnels de cellules auxiliaires (**Figure 5**). Les lymphocytes auxiliaires folliculaires T_{FH} résident aux organes lymphoïdes secondaires. Les T_{FH} apportent de l'aide aux lymphocytes B pour la sécrétion et le changement de classe d'anticorps [184]. Les T_H17 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires contrôlant la défense contre les pathogènes. Les T_H17 sont souvent impliquées dans les maladies auto-immunes et l'inflammation chronique [192]. En contraste, les lymphocytes T CD4+ différenciés en cellules auxiliaires T_{reg} induites (iT_{regs}) exercent la tolérance en périphérie en inhibant les réponses immunitaires et en diminuant l'inflammation [34].

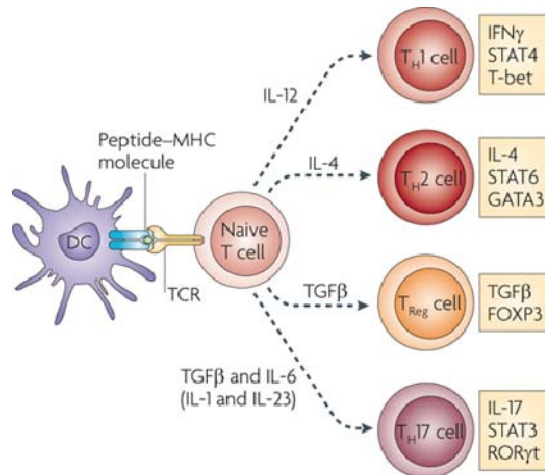


Figure 5. – Différenciation des lymphocytes T CD4+ auxiliaires

Image reproduite avec la permission de Springer Nature (Nature Reviews Immunology, Vol. 10, Weiping Zou *et al*, "T_H17 cells in tumour immunity and immunotherapy", p.248-256, © 2010) [193]

1.3.5 Différenciation des lymphocytes T CD8+

La CPA n'est pas initialement apte à donner tous les signaux nécessaires aux lymphocytes T CD8+ afin qu'ils acquièrent une capacité cytotoxique. La CPA doit être éduquée par un lymphocyte T CD4+ auxiliaire polarisé en T_H1 ou T_H17. La CPA exprime le CD40 qui interagit avec son ligand (CD40L) sur la cellule T auxiliaire. La stimulation de CD40 augmente l'expression des molécules de co-stimulation CD80/CD86 sur la CPA. L'activation des CPAs est essentielle à la différenciation des lymphocytes T CD8+ naïfs en lymphocytes effecteurs.

La polarisation des lymphocytes T CD4+ est conférée par le type de pathogène, l'environnement inflammatoire et les cytokines sécrétées par les CPAs. Chez les lymphocytes T CD8+ activés, l'hétérogénéité est conférée par une intégration de différents signaux, menant à leur programmation soit vers un phénotype effecteur terminalement différencié, T_{EFF}, ou soit précurseur de cellules mémoires (T_{MP}). La différenciation en T_{EFF} est dominante puisque seulement 10% des lymphocytes T CD8+ se différencient en T_{MP} [194]. Les T_{EFF} possèdent une capacité proliférative robuste, mais démontrent une capacité cytotoxique similaire aux T_{MP} [195].

Lors de la contraction de la réponse immunitaire, les T_{MP} sont maintenues afin de générer des cellules mémoires tandis que les T_{EFF} sont éliminées [194, 196]. L'identification de ces phénotypes est basée sur l'expression différentielle de la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (IL-7 α) et de la lectine de type C KLRG1. L'expression élevée d'IL-7 α chez les lymphocytes T CD8 $^{+}$ est essentielle à la persistance des T_{MP} à la fin de la réponse immunitaire et à leur différenciation en lymphocytes T mémoires [194]. En contraste, l'expression élevée de KLRG1 engage les lymphocytes T CD8 $^{+}$ vers le phénotype effecteur T_{EFF} qui ne persiste pas suivant la contraction de l'infection [194, 196]. L'expression du marqueur KLRG1 associée au phénotype des T_{EFF} n'a pas de fonction identifiée, contrairement à l'expression d'IL-7 α chez les T_{MP} [196].

Des facteurs intrinsèques et extrinsèques polarisent différenciellement les lymphocytes T CD8 $^{+}$ vers un phénotype T_{EFF} ou T_{MP} . Les lymphocytes T CD8 $^{+}$ recevant une stimulation plus robuste par le TCR et qui expriment plus fortement le récepteur de l'IL-2 à haute affinité se différencieront préférentiellement en T_{EFF} [195, 197, 198]. De plus, le facteur de transcription IRF4 est exprimé plus fortement chez les lymphocytes T ayant reçu une stimulation robuste [199]. IRF4 régule négativement l'expression des facteurs de transcriptions TCF-1 et Eomes, qui sont requis pour la maintenance des T_{MP} [199, 200]. Comme chez les lymphocytes T CD4 $^{+}$, la combinaison de cytokines pro-inflammatoires influence les facteurs de transcription exprimés. À l'instar des cellules auxiliaires T_H1 , un environnement riche en IL-12 régule l'expression de T-bet, qui polarise les lymphocytes T CD8 $^{+}$ vers le phénotype T_{EFF} [196]. De plus, l'IL-2 régule l'expression des facteurs de transcription Id2 et Blimp-1, qui promeut la génération des T_{EFF} [201]. Blimp-1 réprime l'expression des facteurs de transcription Id3, Bcl6 et TCF-1, qui régulent un programme transcriptionnel requis à la génération et la maintenance des T_{MP} [202-204]. Enfin, différents facteurs cellulaires, comme des molécules de signalisation ou des facteurs de transcriptions, se partitionnent de manière asymétrique lors de la division cellulaire afin de générer une progéniture préférentiellement polarisée vers soit les phénotypes T_{EFF} ou T_{MP} [198, 205].

Toutefois, la différenciation des lymphocytes T CD8 $^{+}$ effecteurs démontre une grande plasticité au cours de l'infection. Une seule cellule T CD8 $^{+}$ naïve génère une population hétérogène de cellules effectrices [206]. Les cellules effectrices précoces (EECs) sont générées dans les trois jours suivant l'infection. Les EECs n'expriment pas encore IL-7 α ou KLRG1 et

démontrent une propension intrinsèque à se différencier soit en T_{EFF} ou T_{MP} . Toutefois, l'altération des signaux inflammatoires peut moduler le destin de différenciation des EECs [207, 208]. De plus, des lymphocytes T CD8+ effecteurs exprimant KLRG1 en début d'infection peuvent se différencier en cellules mémoires persistantes après avoir réprimé KLRG1 et exprimé IL-7R α [209]. Une exposition prolongée aux antigènes et à la stimulation polarise les cellules effectrices vers un phénotype T_{EFF} , tandis qu'une restriction de l'infection favorise le développement des T_{MP} [195]. Ainsi, malgré que le développement des lymphocytes T effecteurs semble destiné vers une population T_{EFF} ou T_{MP} tôt durant l'infection, les lymphocytes T s'adaptent à l'environnement inflammatoire et au niveau d'exposition à l'antigène afin de contrôler efficacement l'infection.

1.3.6 Sortie des ganglions et migration vers le site de l'infection

Afin d'accomplir leurs fonctions effectrices, les lymphocytes T CD8+ activés et différenciés quittent les ganglions et migrent vers le site de l'infection. La migration des lymphocytes T activés est gouvernée par l'expression de molécules d'adhésion et par les chimiokines produites au site de l'infection. Un des premiers marqueurs de surface identifiant les lymphocytes T activés est la lectine de type C CD69. CD69 antagonise S1P₁ afin de retenir les lymphocytes T aux organes lymphoïdes secondaires dans les trois jours suivant la stimulation. La rétention des lymphocytes T permet leur maturation et leur prolifération [47, 210]. L'expression de CD69 diminue chez les lymphocytes T effecteurs, réduisant la fonction inhibitrice de CD69 sur S1P₁ et permettant aux lymphocytes de migrer vers le site de l'infection [47]. En parallèle, les lymphocytes T effecteurs perdent l'expression de la sélectine CD62L et du récepteur CCR7, ce qui empêche leur recirculation aux organes lymphoïdes secondaires [211].

Les lymphocytes T effecteurs migrent au site de l'infection selon le niveau d'inflammation et les chimiokines qui y sont sécrétées [212]. Les lymphocytes T activés expriment CD44, une lectine de type C, qui se lie à l'acide hyaluronique situé à la surface de la matrice extracellulaire des cellules endothéliales vasculaires [213]. L'inflammation augmente l'expression de l'acide hyaluronique sur l'endothélium du tissu infecté, permettant l'adhésion par CD44 et l'extravasation des lymphocytes T activés au site de l'infection [213, 214]. Une fois au site de l'infection, les lymphocytes T CD8+ accomplissent leur fonction effectrice.

1.3.7 Réponse effectrice des lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ effecteurs, aussi appelés les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs), tuent efficacement des cellules infectées par un pathogène intracellulaire afin de limiter la propagation de l'infection. De plus, les CTLs sécrètent une quantité élevée de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et le TNF- α [188, 215]. L'IFN- γ polarise la réponse immunitaire vers un phénotype T_H1, ce qui augmente l'expression des CMHs et active les CPAs afin d'amplifier la réponse immunitaire [215]. TNF- α synergise avec l'IFN- γ afin d'amplifier la maturation des DCs pour le maintien de la réponse immunitaire [188].

Au site de l'infection, le TCR des CTLs reconnaît son peptide agoniste présenté sur un CMH de classe I à la surface d'une cellule infectée. Les CTLs sont remarquablement sensibles, puisque l'expression d'un seul pCMH agoniste à la surface de la cellule cible est suffisante pour la réponse cytolytique [216]. L'interaction entre la CTL et la cellule cible mène à la formation d'une synapse immunologique complexe. Des vésicules de granules cytotoxiques, composées de perforine et de sérines protéases (granzymes), sont polarisées vers le cSMAC pour une sécrétion dirigée vers la cellule cible [6]. La perforine se polymérise afin de former un pore à la MP de la cellule cible [217]. Les pores de perforine détruisent l'intégrité de la membrane et induisent la lyse de la cellule cible [6].

Les CTLs induisent également l'élimination d'une cellule cible par l'engagement de récepteurs de la mort à la synapse immunologique. La liaison entre le ligand Fas (FasL) exprimé sur la CTL et le récepteur Fas exprimé sur la cellule cible induit l'initiation de la voie extrinsèque d'apoptose [218, 219]. L'engagement de Fas et l'activité protéolytique des granzymes initient l'activation de caspases chez la cellule cible [6]. En conditions homéostatiques, les caspases sont exprimées sous forme inactive. Le clivage protéolytique des caspases active leur activité de cystéines protéases. Il s'induit par la suite l'enclenchement du processus d'apoptose résultant en la mort de la cellule cible. [30]. Une fois la cellule cible tuée, la CTL continue sa migration à la recherche de cellules infectées pour l'élimination de l'infection.

1.3.8 Contraction de la réponse immunitaire

La majorité des lymphocytes T effecteurs générés lors de la réponse immunitaire sont éliminés par apoptose, tandis que certains lymphocytes T persistent comme cellules mémoires. La perte de l'antigène suite à l'élimination du pathogène par le système immunitaire réduit la stimulation reçue par les lymphocytes T et la quantité de cytokines environnantes [220, 221]. La perte de signaux de stimulation induit la voie d'apoptose intrinsèque chez les lymphocytes T en basculant la balance des molécules anti- et pro-apoptotiques [222].

De plus, afin d'éviter une activation excessive des cellules T, la persistance de l'antigène élimine les lymphocytes T par la voie extrinsèque d'apoptose. La restimulation du TCR induit l'expression de surface de FasL, entraînant la mort des cellules T par suicide ou fratricide par interaction avec le récepteur Fas [221, 222]. Chez les lymphocytes T effecteurs, l'expression des récepteurs inhibiteurs permet également de moduler l'activation afin de prévenir la cytotoxicité excessive [169]. Toutefois, l'expression soutenue des récepteurs inhibiteurs comme PD-1 et CTLA-4 est associée à l'épuisement des lymphocytes T suivant une stimulation prolongée avec l'antigène. Les lymphocytes T épuisés exprimant des niveaux élevés de PD-1 et CTLA-4 sont communs durant une infection virale chronique ou à l'intérieur d'une tumeur. L'épuisement des lymphocytes T est associé à la diminution de la sécrétion de cytokines, de la prolifération et à une réduction de la fonction cytotoxique. Le rôle physiologique de l'épuisement des lymphocytes T serait de prévenir les dommages aux tissus suivant leur activation continue par l'antigène. Le blocage de PD-1 et CTLA-4 par des anticorps renverse le phénotype d'épuisement des cellules T et induit l'expansion des lymphocytes infiltrant les tumeurs [223]. Ainsi, le blocage de PD-1 et CTLA-4, seul ou en combinaison, est utilisé en clinique avec succès en tant qu'immunothérapie dans plusieurs types de cancer [170].

1.3.9 Développement de la mémoire des lymphocytes T

Environ 90-95% des lymphocytes T effecteurs générés lors de la réponse immunitaire sont éliminés suivant la résolution de l'infection [194]. Les lymphocytes B et T qui persistent génèrent une population hétérogène de cellules mémoires. Les lymphocytes mémoires produisent une réponse immunitaire rapide et robuste suivant une réinfection avec un pathogène

précédemment rencontré. Les lymphocytes B mémoires sécrètent des anticorps à haute affinité lors d'une réponse immunitaire secondaire [224]. En parallèle, différentes cellules T mémoires sont caractérisées par un phénotype, une localisation, une capacité proliférative et une fonctionnalité spécifique. Au moins quatre grandes populations distinctes de lymphocytes T mémoires ont été identifiées, soit les cellules centrales mémoire (T_{CM}), les effecteurs mémoire (T_{EM}), les résidentes mémoires (T_{RM}) et les périphérales mémoires (T_{PM}).

La localisation des différents sous-types de cellules mémoires est dépendante à l'expression de récepteur de chimiokines et de molécules d'adhésion. L'expression élevée d'IL-7R α dans la population précurseur mémoire augmente les probabilités de survie à la fin d'une infection et la différenciation en cellule mémoire à long terme [38, 194]. À l'instar des lymphocytes T naïfs, l'IL-7 et l'IL-15 sont essentiels à la prolifération homéostatique des lymphocytes T mémoires en absence d'antigène [38, 225]. Comme les lymphocytes T naïfs, les T_{CM} migrent aux organes lymphoïdes secondaires par l'expression de CCR7 et CD62L. En parallèle, les T_{EM} n'expriment pas CCR7 et CD62L et circulent dans le sang [211]. Lors d'une réinfection, les T_{EM} génèrent une réponse effectrice robuste et rapide. En contraste, les T_{CM} possèdent un potentiel prolifératif élevé et activent les DCs et les lymphocytes B aux organes lymphoïdes secondaires [211]. Les T_{PM} sont un sous-type de lymphocytes T mémoires caractérisées par leur expression intermédiaire du récepteur de chimiokine CX3CR1 [226]. Le ligand CX3CL1 est exprimé par les cellules endothéliales permettant la circulation des T_{PM} dans les organes périphériques [226, 227]. Enfin, les T_{RM} ne sont pas présentes dans la circulation et résident dans les tissus précédemment infectés [228]. Les T_{RM} expriment CD69 et l'intégrine CD103, qui s'associe à l'E-cadhérine présente à la surface des cellules épithéliales, permettant la migration et la rétention des T_{RM} dans les tissus [228, 229]. Par leur localisation privilégiée aux tissus, les T_{RM} agissent en tant que première ligne de défense lors d'une réinfection. Ainsi, la génération de la mémoire immunitaire par les cellules du système immunitaire adaptatif permet d'engendrer une réponse efficace lors d'une réinfection. La persistance à long terme de la mémoire immunitaire est exploitée dans l'administration de vaccins contre les infections graves afin de générer des lymphocytes mémoires protecteurs.

1.4 Mécanismes de régulation du TCR chez les lymphocytes T au repos

L'activation des lymphocytes T par leur TCR est contrôlée de manière spatio-temporelle par différents mécanismes de régulation comme la déphosphorylation par les phosphatases et la dégradation de protéines. Les lymphocytes T sont activés de manière robuste suivant l'interaction avec des pCMHs agonistes présentés par une CPA. Par leur fonction auxiliaire ou cytotoxique, les lymphocytes T contrôlent efficacement les infections. Toutefois, il est essentiel de maintenir le TCR dans un état inactif en absence de stimulation afin d'éviter des pathologies auto-immunes. En conditions homéostatiques, les ITAMs des chaînes CD3 du TCR ne sont pas phosphorylées, ou très faiblement [230]. Dans ce sous-chapitre, nous allons étudier les mécanismes qui régulent le maintien de l'état inactif du TCR chez les lymphocytes T au repos.

1.4.1 Régulation kinase-phosphatase

La phosphorylation des ITAMs du TCR par la kinase Lck est la première étape de signalisation de l'activation des cellules T. Le statut d'activation et la localisation de la kinase Lck sont contrôlés chez les cellules T au repos afin d'éviter l'activation du TCR en absence de stimulation.

L'activation de Lck est régulée par la phosphorylation ou la déphosphorylation des tyrosines Y505 et Y394. La phosphorylation de Y505 par la kinase Csk maintient Lck dans un état catalytiquement inactif [7]. L'activation de Lck nécessite la déphosphorylation de Y505 par la phosphatase CD45 et la phosphorylation de la tyrosine Y394. L'autophosphorylation de Lck au résidu Y394 stabilise et active le domaine catalytique de Lck. La tyrosine Y394 est déphosphorylée par plusieurs phosphatases comme CD45, PTPN22 et SHP1 [7]. Ainsi, la phosphatase CD45 a un rôle complexe dans l'activité de Lck puisqu'elle déphosphoryle à la fois la tyrosine inhibitrice et la tyrosine activatrice. CD45 contient également l'activité de Lck déphosphorylant les ITAMs des chaînes CD3 [231].

Lck est ciblée à la MP par modification hydrophobique de myristoylation et de palmitoylation [58, 59]. Une portion des molécules de Lck sont constitutivement associées au domaine cytoplasmique du co-récepteur CD4 ou CD8 [56, 57]. Un bassin de Lck en conformation activée, qui est déphosphorylée à la tyrosine Y505 et phosphorylée sur Y394, se trouve chez les

lymphocytes T au repos [60]. En absence de stimulation, les TCRs sont ségrégés des molécules de signalisation [97]. Les kinases Lck préactivées et les co-récepteurs CD4/CD8 sont exclus des TCRs chez les cellules T au repos [232]. Ainsi, malgré son état activé, la ségrégation spatiale de Lck prévient la phosphorylation des ITAMs en absence de stimulation. La régulation stricte du statut d'activation de Lck par les phosphatases et par sa localisation permet de contrôler la phosphorylation du TCR chez les lymphocytes T au repos.

1.4.2 Régulation électrostatique avec la MP

Un mécanisme de régulation décrit récemment est l'association membranaire des chaînes cytoplasmiques de CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR par interaction électrostatique avec la MP chez les cellules T au repos. Les protéines se compartementalisent dans différentes organelles d'une cellule selon les propriétés associées à leur séquence en acides aminés ainsi que l'environnement biochimique spécifique à l'organelle. Le feuillet interne de la MP possède une composition lipidique unique à l'intérieur de la cellule, permettant le ciblage spécifique de certaines protéines à la MP.

La MP est la barrière physique entre le milieu extracellulaire et l'intérieur de la cellule. Les membranes biologiques sont composées en grande majorité des lipides amphiphiles appelés glycérophospholipides. Les glycérophospholipides sont constitués d'une tête hydrophile et de deux queues d'acide gras hydrophobes. La tête hydrophile est dotée d'un résidu polaire relié à une molécule de glycérol par un groupement phosphate. Les résidus polaires retrouvés chez les glycérophospholipides sont la choline, l'éthanolamine, l'inositol, le glycérol, ainsi que l'acide aminé sérine. Les queues hydrophobes sont associées à la tête hydrophile du phospholipide par le glycérol. Les acides gras composant les phospholipides sont de longueur variable et peuvent être saturés ou insaturés. En solution, les phospholipides s'assemblent spontanément une bicouche lipidique, où les acides gras forment un cœur hydrophobe et les têtes hydrophiles forment la couche externe en contact avec le milieu aqueux. Chez les mammifères, les glycérophospholipides majeurs qui composent les membranes cellulaires sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidylethanolamine (PE). Les

membranes cellulaires sont également composées de concentrations élevées d'autres types de lipides tels que le cholestérol et la sphingomyéline [233].

L'hydrophobicité de certains acides aminés permet leur insertion à l'intérieur d'un feuillet double de phospholipide. De plus, l'ajout de modifications lipidiques sur certains acides aminés, comme la palmitoylation, la prénylation (farnesylation ou geranylgeranylation) et la myristoylation, augmente l'hydrophobicité des protéines pour un ciblage membranaire. La modification hydrophobique seule de farnesylation ou de myristoylation d'une protéine n'est pas suffisante pour un ciblage membranaire. Ces modifications nécessitent un deuxième 'signal' afin d'être ciblée à une membrane, comme une deuxième modification hydrophobique, un domaine polycationique ou un domaine transmembranaire [234].

La composition en phospholipide des différentes membranes sous-cellulaires impose un potentiel électrostatique variable à l'intérieur de la cellule. Les protéines possédant des domaines polycationiques sont préférentiellement ciblées aux membranes chargées négativement [235]. Des sondes de microscopie polycationique démontrent un ciblage préférentiel au feuillet interne de la MP par rapport aux endomembranes, indiquant que la MP possède la plus forte charge négative à l'intérieur de la cellule [236, 237]. Les phospholipides sont répartis asymétriquement entre les deux feuillet de la bicouche lipidique. Le feuillet externe de la MP est composé principalement de PC et de sphingomyéline tandis que le feuillet interne est composé d'une majorité de PE et de PS [238]. La composition lipidique unique et riche en phospholipides chargés négativement comme la PS et différents phosphoinositides (PIs) à la face cytoplasmique de la MP impose une charge électrostatique négative à cette membrane, en faisant un lieu d'attraction privilégié pour des protéines possédant des domaines chargés positivement [236].

1.4.2.1 Phosphatidylsérine

La MP est composé de 15% de PS, un phospholipide acide possédant une charge négative de -1 au pH physiologique [239]. La PS compose également la membrane des endosomes, du Golgi, de la mitochondrie et du RE [237, 240]. À la MP, la PS est répartie asymétriquement vers la face cytoplasmique de la bicouche lipidique par des flippases. Ces enzymes redistribuent constamment la PS du feuillet externe vers le feuillet interne de la MP de manière ATP-

dépendante [241]. Ainsi, la concentration de PS au versant interne de la MP se situe à 20-30%. Le confinement de la PS au feuillet cytoplasmique de la MP est perturbé lors de différents processus biologiques par l'activation de scramblases. Ces enzymes redistribuent aléatoirement les phospholipides à la MP de manière ATP-indépendante et bidirectionnelle. Les scramblases équilibrent la concentration de PS entre les deux feuillets de la membrane, résultant en une externalisation de la PS [242]. La perte de l'asymétrie de PS agit en tant que signal majeur lors de la cascade de coagulation sanguine, de l'apoptose, la minéralisation osseuse, ainsi que plusieurs autres processus biologiques [243].

1.4.2.1.1 Régulation spatiale et enzymatique de la PS

Les phospholipides sont synthétisés à la face cytoplasmique de la bicouche lipidique du RE [240, 242]. La PS est synthétisée spécifiquement aux membranes associées à la mitochondrie du RE par les PS synthases-1 et -2 [244, 245]. La PS synthase-1 génère la PS par échange du groupement choline de la PC en sérine [246, 247]. Alternativement, la PS est synthétisée par la PS synthase-2 par échange du groupement éthanolamine du PE par une sérine [247, 248]. L'ajout exogène de PS ou la délétion d'une des PS synthases n'influencent pas les niveaux de PS, indiquant une régulation constante de la concentration de PS à l'intérieur de la cellule [249].

La PS synthétisée au RE est transférée aux différentes organelles de la cellule. La PS est dirigée vers la MP par un mécanisme toujours incompris de transfert de vésicules [242]. La PS est également transférée vers la MP aux jonctions RE-MP par les enzymes ORP5 et ORP8. Ces enzymes échangent la PS au RE par le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P) à la MP [250]. Enfin, la PS est transférée du RE à la mitochondrie, où le groupement sérine est décarboxylé par la PS décarboxylase afin de générer le PE mitochondrial [251].

La distribution de la PS au feuillet interne de la MP est constamment régulée et est essentielle aux fonctions biologiques de la cellule. L'asymétrie de la PS à la MP est évolutivement conservée et est observée chez la levure et les nématodes [252, 253]. La PS est transférée contre son gradient de concentration à la bicouche lipidique par des flippases. À la MP, l'asymétrie de la PS est maintenue par les flippases ATP11A et ATP11C et leur protéine de chaperon TMEM30a (protéine transmembranaire 30a) [254-257]. Le maintien de la PS au feuillet interne de la MP est

critique pour le potentiel électrostatique négatif de la MP [236, 237]. La perturbation de l'asymétrie de la PS est un évènement critique lors de la cascade de coagulation et de l'apoptose. La liaison spécifique de protéines à la PS sur la surface des cellules est essentielle au déroulement de ces processus homéostatiques.

1.4.2.1.2 Cascade de coagulation sanguine

Une brèche dans un vaisseau sanguin active la cascade de coagulation sanguine afin de limiter la perte de sang. Une blessure à la matrice extracellulaire d'un vaisseau sanguin mène à la libération de facteurs thrombogéniques comme le collagène [258]. Le collagène exposé active le récepteur de collagène glycoprotéine VI (GPVI) [259]. En parallèle, de la thrombine produite localement lors de l'initiation de la cascade de coagulation clive et active des GPCRs à la surface des plaquettes [260]. La stimulation de ces récepteurs mène à des voies de signalisation activant des PLCs [261, 262]. Similairement aux cellules T, l'hydrolyse de $PI(4,5)P_2$ par les PLCs mène à une déplétion des réserves de calcium du RE puis à un influx robuste de calcium par les canaux CRAC composés de STIM1 et ORAI1 [263]. L'activation de la cascade de coagulation résulte en une externalisation de la PS à la surface des plaquettes.

La PS externalisée à la surface des plaquettes agit en tant que site de liaison pour les facteurs de coagulation Va et Xa [249]. La charge négative de la PS, en présence de calcium, permet l'association du facteur Va à la surface de la plaquette par son domaine C2 [249, 264]. L'association de Va à la PS induit un changement conformationnel dans Va qui augmente son affinité pour le facteur Xa, qui est associé à la PS par son domaine riche en γ -carboxyglutamate [264]. Les facteurs Xa et Va forment ensemble le complexe prothrombinase qui clive enzymatiquement la prothrombine en thrombine [265]. La thrombine est une sérine protéase qui clive le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. La fibrine se polymérise forme un caillot sanguin empêchant la perte de sang au site de la blessure. La PS exposée sur les plaquettes augmente l'efficacité catalytique du complexe prothrombinase par 60 fois [264]. Les plaquettes activées forment également des microvésicules à leur surface, un processus qui est relié à la redistribution calcium-dépendante de la PS à la MP. Les microvésicules exposent la PS à leur surface et agissent en tant que plateforme supplémentaire pour la formation de thrombine [266].

L'élévation de calcium intracellulaire par les canaux CRAC inhibe les flippases ATP11A et ATP11C [254, 267, 268]. L'inhibition des flippases est insuffisante pour induire la redistribution de la PS à la MP puisque le transfert spontané de phospholipides entre deux feuilletts d'une bicouche lipidique est énergétiquement défavorable [242, 269]. La redistribution rapide de la PS chez les plaquettes activées requiert l'activation d'une scramblase calcium-dépendante [243]. Le syndrome de Scott est une maladie rare caractérisée par des hémorragies résultant d'un défaut de coagulation sanguine [270, 271]. Les plaquettes sanguines et les lymphocytes issus des patients atteints du syndrome de Scott présentent une incapacité à redistribuer la PS à la MP suite à une stimulation avec un ionophore de calcium [267, 272]. Les plaquettes isolées des patients présentent également un défaut dans la formation de microvésicules [273, 274]. Le syndrome de Scott est une maladie héréditaire autosomique récessive causée par des mutations variables dans la scramblase TMEM16F (protéine transmembranaire 16F) [275, 276]. Ces mutations résultent en l'expression d'une version tronquée et non-fonctionnelle de TMEM16F [276-278]. L'activité scramblase calcium-dépendante de TMEM16F est nécessaire à la redistribution de la PS et à la formation de microvésicules chez les plaquettes sanguines [276, 279].

1.4.2.1.3 La scramblase TMEM16F

Les dix membres de la famille de protéines TMEM16 sont des protéines calcium-dépendante possédant dix domaines transmembranaires et qui s'assemblent en dimère [280, 281]. Chez les mammifères, les protéines TMEM16A et TMEM16B ont des fonctions de canaux ioniques tandis que TMEM16C, -16D, -16E, -16F, -16G, -16J et -16K sont des scramblases lipidique [282, 283]. TMEM16F est exprimée de manière ubiquitaire à la MP tandis que les autres scramblases ont une expression intracellulaire et/ou tissu-spécifique [282]. TMEM16F possède une double fonction de scramblase et de canal ionique [284]. TMEM16F redistribue non spécifiquement les phospholipides à la surface de la cellule de manière réversible suite à un influx de calcium intracellulaire [276, 285].

L'association directe de TMEM16F à deux ions de calcium résulte en un changement conformationnel qui stabilise ses domaines transmembranaires [286-288]. Le calcium se lie sur les résidus N620 et E624 du domaine transmembranaire 6, E667 et E670 sur le domaine

transmembranaire 7, et E699 et D703 sur le domaine transmembranaire 8 [279]. Le changement conformationnel induit par le calcium ouvre une cavité hydrophile entre les domaines transmembranaires 3 à 7 qui permet le passage de phospholipides [283, 284, 289]. En absence de calcium, la cavité hydrophile de TMEM16F est bloquée par des résidus hydrophobes qui empêchent le passage de phospholipides. La mutation de ces résidus en lysine, un acide aminé hydrophile, entraîne la redistribution spontanée de phospholipides par TMEM16F. De plus, la mutation d'un résidu équivalent dans la cavité du canal ionique de TMEM16A lui confère une activité de scramblase lipidique [290]. Le changement conformationnel causé par l'association de TMEM16F au calcium permet le mouvement des résidus hydrophobes et le passage de phospholipides dans la cavité hydrophile.

La fonction de canal ionique de TMEM16F est controversée et toujours incomprise. L'activité scramblase de TMEM16F est insensible à l'inhibition du canal ionique [291]. De plus, un mutant de TMEM16F, dont la fonction de canal ionique a été abrogée, redistribue la PS suivant une stimulation avec l'ionomycine [292]. Le canal ionique formé par TMEM16F est non sélectif, mais possède une préférence pour le passage d'ions de chlorure [285, 293, 294]. Il est proposé que le transport d'ion par TMEM16F est une conséquence de transfert de phospholipide entre les feuillettes de la bicouche lipidique [284]. La fonction de canal ionique de TMEM16F n'est pas requise pour la formation de microvésicules. De plus, des cellules exprimant TMEM16A ne forment pas de microvésicules à moins de permuter TMEM16A avec le domaine scramblase de TMEM16F [279]. Le passage d'ions par TMEM16F semble être une fonction à part entière, mais qui nécessite des recherches additionnelles afin d'élucider le mécanisme et l'impact physiologique du canal TMEM16F dans cascade de coagulation sanguine.

1.4.2.1.4 Apoptose

L'externalisation de la PS à la surface des cellules est l'un des premiers événements du processus d'apoptose [295]. Les lymphocytes issus des patients atteints du syndrome de Scott redistribuent efficacement la PS suite à une stimulation apoptotique [296]. Ainsi, la redistribution apoptotique de PS n'implique pas TMEM16F et est dictée par un mécanisme alternatif à la cascade de coagulation sanguine. Il a été démontré que l'activation des caspases lors de l'apoptose mène au clivage et à l'activation de la scramblase Xkr8 [297]. En parallèle, les flippases

ATP11A et ATP11C sont inactivées par clivage, empêchant le transfert interne de la PS externalisée [254, 255]. L'exposition irréversible de la PS en surface agit en tant que signal essentiel pour la phagocytose de la cellule apoptotique [295, 298]. Les phagocytes reconnaissent les cellules apoptotiques par différents récepteurs liant la PS, soit directement ou par l'intermédiaire d'une molécule soluble. La signalisation résultant de l'engagement des récepteurs de PS des phagocytes initie la phagocytose de la cellule apoptotique [299].

1.4.2.2 Phosphoinositides

Les PIs sont des glycérophospholipides acides dont la tête hydrophile est composée d'un résidu inositol. Contrairement à la PS, dont la concentration est majoritairement régulée par sa redistribution entre les deux feuilletts de la MP, la concentration des différents PIs est constamment régulée par l'activité de kinases et de phosphatases. Le groupement inositol des PIs peut être phosphorylé à la troisième, quatrième et cinquième position, générant sept sous-types distincts de PIs. Les PIs sont différentiellement localisés dans différents compartiments intracellulaires. Les PIs de la MP sont cruciaux pour la modulation de la localisation de protéines, l'initiation de cascades de signalisation et la fonction de canaux ioniques [300].

1.4.2.2.1 Régulation des PIs

Le PI est synthétisé par la PI synthase au RE, et est acheminé à la MP par transfert de vésicules ou par les jonctions RE-MP [301]. La MP des cellules est une membrane unique par la présence de PI(4,5)P₂ ainsi que de PI(3,4,5)P₃. Malgré que ces phospholipides sont présents en faible quantité à la MP, 0.5-3% pour PI(4,5)P₂ et moins de 1% pour PI(3,4,5)P₃, ils possèdent respectivement une forte charge négative de -4 et de -6 au pH physiologique [302].

L'homéostasie cellulaire des PIs est régulée par 19 kinases et 28 phosphatases [300]. À la MP, le groupement inositol du PI est phosphorylé à sa quatrième position par des kinases de la famille des phosphoinositide-4-kinases (PI4Ks) afin de générer le PI(4)P [303]. Les phosphoinositide 4-phosphate 5-kinases (PIP5Ks) phosphorylent PI(4)P à la cinquième position de l'inositol pour générer PI(4,5)P₂ [303]. Les PIP5Ks sont recrutés à la MP par interactions électrostatiques entre un domaine polybasique et les phospholipides acides [304]. La phosphorylation de PI(4,5)P₂ en PI(3,4,5)P₃ est régulée par différentes phosphoinositide-3-

kinases (PI3Ks) de classe I [300]. PI(3,4,5)P₃ est absent des cellules quiescentes puisque l'activation des PI3Ks de classe I nécessite une stimulation cellulaire [305].

La déphosphorylation des PIs est régulée par trois classes majeures de phosphatases (3-, 4- et 5-phosphatases) afin de balancer l'activité des phosphoinositide kinases. L'activité des PI3Ks est balancée par les inositol polyphosphate-3-phosphatases, qui déphosphorylent le cycle inositol à la troisième position [305]. La phosphatase PTEN est recrutée par interaction électrostatique avec les phospholipides acides de la MP et déphosphoryle PI(3,4,5)P₃ en PI(4,5)P₂ [306, 307]. Les phosphatases SHIP1 et SHIP2 déphosphorylent PI(3,4,5)P₃ en PI(3,4)P₂ à la MP [300]. Puisque PI(3,4)P₂ est généré à partir de la déphosphorylation de PI(3,4,5)P₃, ce phospholipide est absent des cellules quiescentes [305]. Des mutations dans les kinases ou les phosphatases qui régulent l'homéostasie des PIs causent un déséquilibre de plusieurs processus cellulaires [300].

1.4.2.2.2 Hydrolyse

Malgré sa concentration relative faible à la MP, PI(4,5)P₂ agit en tant que messager secondaire majeur de signalisation suite à l'activation de récepteurs de surface comme le TCR. Suite à l'engagement d'un récepteur, PI(4,5)P₂ est hydrolysé par une PLC afin de générer l'IP₃ et le DAG [303]. Quatre classes de PLCs comprenant différentes isoformes se trouvent chez les mammifères. Les PLCs sont recrutées à la MP par un domaine PH. L'hydrolyse de PI(4,5)P₂ entraîne la translocation du rapporteur PH-PLC- δ de la MP au cytoplasme, indiquant une réduction de sa concentration à la MP [303].

1.4.2.3 Autres phospholipides acides

L'acide phosphatidique (PA) et le phosphatidylglycérol (PG) sont des phospholipides acides mineurs composant environ 1% des phospholipides de la cellule [308]. Au pH physiologique, la charge nette de l'acide phosphatidique et du PG est de -1 [233]. Le PG est un phospholipide mineur localisé exclusivement à la mitochondrie [175]. Ainsi, le PG ne contribue pas au potentiel électrostatique négatif de la MP.

Le PA généré par les DGKs est essentiel au réapprovisionnement de PI(4,5)P₂ à la MP puisqu'il agit comme site de liaison aux protéines de transfert de PIs aux jonctions RE-MP [301]. Le PA est également généré à la MP suivant une stimulation cellulaire à partir de l'hydrolyse du

PC par la phospholipase D [175]. Le PA est le glycérophospholipide le plus simple, où le groupement glycérol phosphorylé n'est pas lié à un résidu polaire. Le PA est un important intermédiaire dans la synthétisation des phospholipides [309]. Finalement, le PA peut être reconverti en DAG à la MP par déphosphorylation [175]. Étant donné son métabolisme complexe, la contribution du PA au potentiel électrostatique de la MP n'a pas été élucidée. Toutefois, considérant sa faible charge négative et sa rareté, le PA n'est probablement pas un contributeur majeur à la charge de la MP [308].

1.4.2.4 Modulation du potentiel électrostatique

La forte concentration de phospholipides acides au feuillet interne de la MP crée un gradient électrostatique entre le cytoplasme et la MP. En conditions homéostatiques, la charge négative de la MP est maintenue par la régulation constante de la PS et des PIs. Une perturbation de la concentration de ces phospholipides acides module directement le potentiel électrostatique de la MP.

La charge négative de la MP a été principalement étudiée avec le rapporteur polycationique fluorescent R-pre. R-pre est dérivé de la séquence C-terminale de K-ras, qui est ciblé à la MP par son domaine polycationique ainsi que par une modification prényl hydrophobique [236]. La sonde a permis d'élucider la contribution des principaux phospholipides acides au potentiel électrostatique négatif de la MP. Une induction pharmacologique de l'externalisation de la PS avec du dibucaine induit la dissociation du rapporteur R-pre de la MP [236, 310]. Alternativement, la déplétion de l'ATP cellulaire avec de l'antimycine, qui empêche la génération de $PI(4,5)P_2$ et $PI(3,4,5)P_3$ à la MP, réduit également l'association membranaire de R-pre [237]. L'expression ectopique de l'inositol polyphosphate-5-phosphatase (Inp54p) à la MP, qui déphosphoryle spécifiquement $PI(4,5)P_2$ pour générer $PI(4)P$, mène à une réduction de la charge négative de la MP [235, 310]. La modulation de la concentration de la PS ou de $PI(4,5)P_2$ à la MP mène à une réduction du potentiel électrostatique, indiquant que ces phospholipides sont les contributeurs majeurs à la charge négative de la MP.

En contraste, la déplétion de $PI(3,4,5)P_3$ par traitement à la wortmannine, un inhibiteur des PI3Ks, conduit soit à une absence [310] ou à un faible changement dans le potentiel

électrostatique de la MP [235]. Les traitements pharmacologiques avec l'antimycine et la wortmannine, ainsi que l'expression ectopique d'Inp54p n'ont pas d'impact sur la concentration de PS au feuillet interne de la MP [237]. PI(3,4,5)P₃ est généré suite à l'activation du TCR, mais est présent en absence de stimulation chez certaines lignées de cellules T immortalisées [311]. Ainsi, en condition homéostatique, la contribution de PI(3,4,5)P₃ au potentiel électrostatique négatif de la MP est négligeable.

Enfin, l'influx de calcium intracellulaire robuste induit par une stimulation avec l'ionophore de calcium ionomycine réduit la charge négative de la MP [310]. Une forte concentration d'ions de calcium active également des scramblases qui redistribuent la PS entre les deux feuillets lipidiques de la MP. Il n'est pas connu si la réduction du potentiel électrostatique est induite par les ions de calcium seuls ou par l'activation de scramblases calcium-dépendantes.

1.4.2.5 Association électrostatique de CD3ε et CD3ζ à la MP

La charge négative du feuillet interne de la MP conduit à l'association membranaire de protéines cytoplasmiques possédant des domaines polycationiques. L'association de domaines cytoplasmiques à la MP a été démontrée chez certains récepteurs transmembranaires comme le récepteur au facteur de croissance épidermique. Plusieurs récepteurs immuns possèdent également des domaines riches en résidus basiques, indiquant un potentiel d'association aux phospholipides acides.

Dans la portion N-terminale de leur domaine cytoplasmique, les chaînes CD3ε et CD3ζ du TCR possèdent un domaine pourvu de plusieurs résidus basiques, nommé le BRS. La chaîne CD3ζ possède également deux autres domaines BRS entre ses ITAMs. Au pH physiologique, les résidus cationiques confèrent une charge nette de +11 au domaine cytoplasmique de CD3ε et +5 à CD3ζ (**Tableau 1**). Une étude du groupe de Lawrence Stern en 2000 fut la première à démontrer que le domaine cytoplasmique de la chaîne CD3ζ s'associe à des phospholipides acides in vitro [312]. L'interaction de CD3ζ avec des phospholipides acides, mais pas avec des phospholipides zwitterioniques, prévient la phosphorylation des ITAMs in vitro [312]. Une étude subséquente a démontré que le domaine cytoplasmique de CD3ε s'associe également aux phospholipides acides in vitro [313].

Le niveau d'association aux phospholipides acides est directement corrélé à la charge nette des domaines cytoplasmiques des récepteurs immuns. La mutation des résidus basiques du BRS de CD3ε en résidus neutre comme l'alanine ou la sérine abroge sa liaison aux lipides [230, 314]. En parallèle, les chaînes CD3δ et CD3γ ne sont pas dotées de domaines BRS, leur conférant une charge neutre au pH physiologique et empêchant leur association aux lipides (**Tableau 1**) [313]. La charge nette fortement positive de CD3ε lui confère un niveau d'association global aux phospholipides plus élevé que CD3ζ [313]. De plus, il a été démontré que CD3ε possède un site d'association secondaire aux lipides situé dans la région centrale de son domaine cytoplasmique [314]. Malgré que le domaine BRS juxtamembrane soit le site d'association membranaire majeur, le second domaine, qui est également riche en résidus basiques, permet la stabilisation de l'interaction électrostatique entre CD3ε et la MP [230, 314]. Enfin, il a été démontré que les trois domaines BRS de CD3ζ s'associent différemment aux lipides. Le deuxième BRS, se situant entre le premier et le deuxième ITAM de CD3ζ, s'associe le plus fortement aux phospholipides acides. Le troisième BRS, entre le deuxième et le troisième ITAM, s'associe moins fortement. Finalement, le premier BRS, dans la région proximale à la MP du domaine cytoplasmique de CD3ζ, ne s'associe pas aux lipides puisqu'il est composé de seulement trois résidus basiques [315].

Domaine cytoplasmique	Séquence	Charge
CD3ε	TM' – S K N R K A K A K PVTR R GAGAG G R Q R G Q N K E R PPPVPNPDY E PI R K G Q R D LYSGLN Q R R I – C'	+11
CD3ζ	TM' – R V K F S R SADAPAYQQGQNQLY N E L N L G R R E E D V L D K R R G R D P E M G G K P Q R R R K NPQ E G L N E L Q K D K MAEAYSEIGM K G E R R R G K GHDGLY Q G L S T AT K D T Y D ALHM Q A L P P R – C'	+5
CD3γ	TM' – GQD G V R Q S R A S D K Q T L L P N D Q L Y Q P L K D R E D D Q Y S H L Q G N Q L R R N – C'	0
CD3δ	TM' – GH E T G R L S G A A D T Q A L L R N D Q V Y Q P L R D R D D A Q Y S H L G G N W A R N K – C'	0

Tableau 1. – Charge nette des domaines cytoplasmiques des chaînes CD3 du TCR

La séquence en acide aminés du domaine cytoplasmique des chaînes CD3 du TCR (*Homo sapiens*) ainsi que leur charge nette au pH 7.0. La séquence du domaine cytoplasmique à partir du domaine transmembranaire (TM') jusqu'au C-terminus (C') est montrée. Les résidus basiques sont représentés en bleu, les domaines BRS en jaune et les ITAMs sont surlignés en gris.

En utilisant différents rapporteurs fluorescents, l'association des domaines cytoplasmiques de CD3 ϵ et CD3 ζ à la MP a été confirmée chez les cellules T. Le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) est une technique permettant de mesurer la distance entre deux protéines par l'efficacité de transfert d'énergie d'une molécule fluorescente excitée vers une autre molécule fluorescente. Les molécules fluorescentes utilisées lors des expériences de FRET sont choisies afin que le spectre d'émission du donneur chevauche le spectre d'excitation de l'accepteur. Le donneur et l'accepteur fluorescent doivent se trouver à moins de 10 nm, ou 100 Å, pour observer le transfert d'énergie (**Figure 6**) [316].

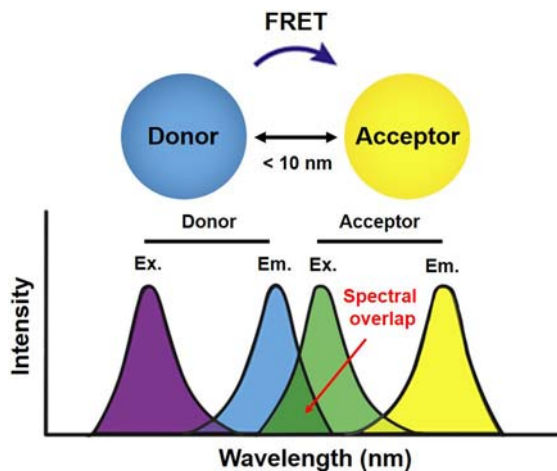


Figure 6. – Chevauchement du spectre d'émission du donneur et l'excitation de l'accepteur lorsque les protéines fluorescentes se trouvent à une distance de moins de 10nm

Image reproduite avec la permission d'Elsevier (Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 143, Chen *et al*, "Application of Förster resonance energy transfer (FRET) technique to elucidate intracellular and in vivo biofate of nanomedicines", p.177-205, © 2019) [317]

La chaîne CD3 ϵ dissociée se trouve à environ 200 Å de la MP, une distance trop longue pour un transfert d'énergie efficace. Chez les lymphocytes T au repos, les études de FRET ont démontré un transfert d'énergie efficace entre le domaine cytoplasmique de CD3 ϵ conjugué à la protéine fluorescente mTFP1 et un marqueur fluorescent de la MP. Ces études ont confirmé que le domaine cytoplasmique de la chaîne CD3 ϵ du TCR est associé à la MP, et que cette association est BRS-dépendante [230, 318]. L'association membranaire du domaine cytoplasmique de CD3 ζ chez les cellules T au repos a été confirmée par une approche FRET similaire [319]. Enfin, il a été confirmé par FRET que les chaînes CD3 γ et CD3 δ ne s'associent pas à la MP [320].

L'interaction entre le domaine cytoplasmique de CD3 ϵ et des phospholipides acides mène à une insertion des résidus hydrophobes des ITAMs au coeur de la bicouche lipidique [230]. Les résidus basiques du BRS de CD3 ϵ mènent l'association aux phospholipides acides tandis que les résidus hydrophobes stabilisent l'interaction. Malgré que ces résidus hydrophobes ne soient pas nécessaires pour l'association aux phospholipides, ils confèrent une structure hélicale à l'ITAM, permettant l'enfouissement des tyrosines à l'intérieur de la bicouche lipidique [230]. L'interaction du domaine cytoplasmique de CD3 ζ avec des phospholipides acides lui confère également une structure partiellement hélicale, particulièrement dans le deuxième et le troisième ITAM [312, 321]. Ainsi, chez les lymphocytes T au repos, l'association membranaire de CD3 ϵ et CD3 ζ permet de diminuer l'accès de la kinase Lck aux ITAMs et de maintenir le TCR dans un état inactif.

1.4.2.6 Autres récepteurs immuns s'associant à la MP

La signature polycationique des domaines cytoplasmiques de CD3 ϵ et CD3 ζ est présente chez plusieurs récepteurs immuns comme les récepteurs co-stimulation de cellules T (CD28, CD2, CD5, ICOS et 4-1BB), l'IgG-BCR et Ig α des cellules B, la chaîne γ du récepteur Fc ϵ , ainsi que les co-récepteurs DAP10 et DAP12 des cellules NKs (**Tableau 2**). L'association du domaine cytoplasmique de ces récepteurs immuns à des phospholipides acides a été confirmée pour CD28, l'IgG-BCR et

FcεR1γ [313]. Il a été démontré que la forte charge négative globale de la chaîne de signalisation Igα du BCR empêche son association aux phospholipides acides malgré son domaine polycationique proximal à la membrane [313].

Le domaine cytoplasmique du récepteur de co-stimulation CD28 s'associe à la MP des lymphocytes T à travers deux domaines riches en résidus basiques. La mutation des résidus basiques conduit à un niveau d'association aux lipides corrélé à la charge nette du CD28 mutant [74]. Des études de NMR ont confirmé que l'association membranaire du domaine cytoplasmique de CD28 mène à l'insertion de ses tyrosines au centre de la bicouche lipidique [322]. Comme pour les chaînes CD3ε et de CD3ζ, l'association membranaire de CD28 réduit l'accès de la kinase Lck à ses domaines de signalisation chez les lymphocytes T au repos [74].

Le domaine cytoplasmique du récepteur IgG-BCR des cellules B est hydrophobe et possède deux résidus basiques près de son domaine transmembranaire. Des études de FRET ont confirmé l'association électrostatique de l'IgG-BCR à la MP des cellules B au repos [323]. Comme pour CD3ε, l'hydrophobicité de l'IgG-BCR permet de stabiliser son association aux lipides [324]. L'IgG-BCR adopte une structure alpha hélicale en présence de lipides, menant à l'insertion de la tyrosine fonctionnelle de son domaine de signalisation à l'intérieur de la bicouche lipidique [323]. Ainsi, l'association membranaire des chaînes cytoplasmiques de récepteurs immuns agit en tant que mécanisme de maintien de leur état inactif en absence de stimulation.

Domaine cytoplasmique	Séquence	Charge
CD28	TM' – RSKRSRL LHSDYMNMT PRRPGPTRK HYQPYAPP R DFAAY RS – C'	+8
CD2	TM' – KRKKQRSRR NDEELET RAHRVATEERGRK PHQIPASTPQNPATSQHPPPPP GH RS QAPSH R PPPPGH R VQHQPQ KR PPAPSGTQVHQ QK GPPL PR PRVQP K PPHG AAENSLSPSS – C'	+13
CD5	TM' – KKLVKKFRQKKQR QWIGPTGMNQNM SFHR NHTATV R SHAENPTASHVDN EYSQPP R NSHLSAYPALEGALH R SSMQPDN SS SDSYDLHGA QRL – C'	+5

ICOS	TM' – T <u>KKKY</u> SSSVHDPNGEYMFMR <u>RAVNTA</u> K <u>KSR</u> LTDVTL – C'	+4
4-IBB	TM' – K <u>RGRKKLLYIF</u> K <u>QPFMR</u> PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL – C'	0
IgG-BCR	TM' – K <u>VKWIF</u> SSVVDL <u>K</u> QTIIPDY <u>R</u> NMTGQGA – C'	+2
FcεR1γ	TM' – R <u>LKIQRK</u> AAITSYE <u>K</u> SDGVYTG <u>L</u> STR <u>N</u> QETYETL <u>K</u> HE <u>K</u> PPQ – C'	+3
Igα	TM' – R <u>KR</u> WQNE <u>K</u> LGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDIS <u>R</u> GLQGTQDVGS LNIGDVQLE <u>K</u> P – C'	-9
DAP10	TM' – LCAR <u>R</u> PRRSPAQEDG <u>K</u> VYINMPGRG – C'	+3
DAP12	TM' – G <u>R</u> LVPR <u>R</u> RGAAEAAT <u>R</u> KQRITETESPYQELQGQ <u>R</u> SDVYSDLNTQR <u>P</u> YY <u>K</u> – C'	+3

Tableau 2. – Charge nette des chaînes cytoplasmiques de différents récepteurs immuns dotés d'un domaine BRS

La séquence en acide aminé des chaînes cytoplasmiques de différents récepteurs immuns (*Homo sapiens*), à partir du domaine transmembranaire (TM') jusqu'au C-terminus (C'), ainsi que leur charge nette au pH 7.0. Les résidus basiques sont soulignés en bleu, les domaines BRS sont en jaune et les ITAMs ou les domaines phospho-tyrosines sont surlignés en gris.

1.5 L'activation initiale du TCR

Chez les cellules T au repos, l'association électrostatique des chaînes CD3ε et CD3ζ du TCR à la MP agit en tant que couche supplémentaire de régulation, empêchant l'accès des kinases aux tyrosines des ITAMs en absence de stimulation. L'absence ou la faible phosphorylation basale du TCR chez les cellules T au repos implique que les chaînes CD3ε et CD3ζ doivent se dissocier de la MP afin de permettre l'accès des kinases au TCR [230]. Nous allons discuter dans ce sous-chapitre des étapes initiales de l'activation du TCR et des mécanismes de dissociation membranaire des chaînes CD3 du TCR.

1.5.1 Interaction TCR-pCMH

Les chaînes TCR $\alpha\beta$ interagissent avec le pCMH afin de transmettre le signal d'activation aux chaînes CD3. Plusieurs études ont démontré que les domaines extracellulaires et transmembranaires du complexe du TCR changent de conformation lors de l'activation.

Des mutations déstabilisant les domaines extracellulaires du TCR diminuent l'activation des cellules T. La mutation d'une cystéine en glycine dans le domaine extracellulaire de CD3 ϵ (C80G) abroge l'adoption d'une conformation active par le TCR [325]. Le résidu C80 est situé dans le domaine CxxC du peptide connectant de CD3 ϵ . Le domaine CxxC est commun aux chaînes CD3 ϵ , γ et δ et forme un pont disulfure intramoléculaire. Le pont disulfure de CxxC permet de rigidifier la structure des dimères CD3 $\epsilon\delta$ et CD3 $\epsilon\gamma$ [326]. Le remplacement d'une cystéine par une glycine dans le mutant C80G abolit le pont disulfure et déstabilise la structure extracellulaire de CD3 ϵ . La mutation dans le domaine rigide extracellulaire de CD3 ϵ empêcherait la transmission du signal d'activation du TCR vers son domaine cytoplasmique. Toutefois, l'impact de la mutation sur la stabilité de la structure du TCR n'a pas été élucidé.

Un domaine se situant entre la chaîne constante et variable du TCR β , nommé la boucle FG, interagit avec le domaine extracellulaire du dimère CD3 $\epsilon\gamma$. Il a été proposé que lorsque le TCR interagit avec un pCMH, la boucle FG agit en tant que piston qui pousserait sur CD3 $\epsilon\gamma$. La force engendrée sur le domaine extracellulaire rigide de CD3 $\epsilon\gamma$ permettrait une transmission du signal d'activation de l'extérieur de la cellule vers les ITAMs des chaînes CD3 [327]. Comme pour la mutation C80G, la mutation de la boucle FG du TCR β diminue la durée de l'interaction avec le pCMH et réduit l'activation des lymphocytes T [327].

Chez les lymphocytes T au repos, il a été démontré que les domaines transmembranaires de l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$ sont séparés à l'intérieur de la bicouche lipidique. Il a été proposé que l'activation du TCR engendre un mouvement dans la portion membrane-proximale des chaînes CD3 ζ qui rapprocherait leurs domaines transmembranaires [328]. Il a également été démontré par NMR que le domaine transmembranaire de TCR α adopte une conformation diagonale à l'intérieur de la bicouche lipidique. La stimulation du TCR induirait un changement conformationnel qui raidit TCR α , résultant en la transmission du changement conformationnel aux chaînes CD3

pour leur phosphorylation [329]. Enfin, il a été proposé que le cholestérol s'associe au domaine transmembranaire de la chaîne TCR β afin de maintenir le TCR inactif. La dissociation spontanée du cholestérol permet l'adoption d'une conformation active par le TCR pour sa phosphorylation suivant sa stimulation [330].

La chaîne CD3 ϵ est dotée d'un domaine riche en proline (PRS) qui est situé entre le BRS et l'ITAM. Le PRS recrute la protéine adaptatrice Nck par son domaine SH3 N-terminal [331]. Nck est impliqué dans la polymérisation d'actine et dans la réponse des lymphocytes T à des antigènes à faible affinité [332]. Le domaine PRS de CD3 ϵ est inaccessible à la protéine adaptatrice Nck chez les cellules T non-stimulées [331, 332]. La stimulation des thymocytes ou des cellules T périphériques avec un pCMH mène à un changement conformationnel dans CD3 ϵ , résultant en l'exposition du domaine PRS et le recrutement de Nck [331, 333]. Le changement conformationnel du PRS de CD3 ϵ est observé exclusivement à la synapse immunologique suite à une interaction avec un pCMH agoniste [334]. Le recrutement de Nck à CD3 ϵ est stabilisé par l'interaction entre son domaine SH2 et le deuxième ITAM phosphorylé de CD3 ϵ , indiquant que le changement conformationnel de CD3 ϵ entraîne sa phosphorylation [335]. L'exposition de la séquence PRS de CD3 ϵ chez les thymocytes ou chez les lymphocytes T périphériques suite à une stimulation pCMH n'est pas bloquée par un traitement avec l'inhibiteur des kinases Src PP2, démontrant que CD3 ϵ subit un changement conformationnel en absence de signalisation [333, 334]. En conclusion, le TCR activé présente des changements conformationnels dans ses domaines extracellulaires, transmembranaires et cytoplasmiques lui permettant de transmettre le signal d'activation aux chaînes CD3.

1.5.2 Dissociation membranaire des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ

Les chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR sont associées à la MP en absence d'activation. Des études de microscopie à temps de vie de fluorescence (FLIM) combinées avec du FRET ont démontré la dissociation spécifique de CD3 ϵ à la synapse immunologique [230]. Le FLIM est une technique de FRET où le temps de vie de fluorescence du donneur est mesuré en présence ou en absence de l'accepteur fluorescent. Le temps de demi-vie du donneur diminue lorsqu'il transfère son énergie à l'accepteur, puisque les longueurs d'onde les plus longues du spectre d'émission du

donneur sont celles qui chevauchent le spectre d'excitation de l'accepteur (**Figure 6**) [316]. Dans l'étude, la chaîne CD3 ϵ conjuguée à son C-terminus à la protéine fluorescente mTFP1 était incorporée dans le TCR endogène. Le niveau d'association membranaire était mesuré par un marqueur de MP qui agissait comme accepteur de FRET. Les mesures de FLIM ont démontré un temps de vie de fluorescence plus élevé pour le donneur à la synapse immunologique en comparaison à une autre section membranaire de la cellule, indiquant une diminution de l'efficacité de FRET. Ainsi, la chaîne CD3 ϵ du TCR se dissocie à la synapse immunologique suivant sa stimulation par un pCMH [318]. Enfin, il a également été confirmé par FRET que la chaîne CD3 ζ du TCR se dissocie exclusivement dans les microagrégats de TCRs et à la synapse immunologique suivant la stimulation des lymphocytes T [319, 336]. Le niveau de dissociation membranaire des chaînes CD3 du TCR est corrélé à l'affinité du peptide, où un peptide agoniste engendre une dissociation plus robuste qu'un peptide partiellement agoniste [314, 336].

En plus du TCR, des études de FRET ont démontré que CD28 se dissocie de la MP suite à sa ligation [74, 322]. De plus, le domaine kinase de Lck est recruté aux domaines polycationiques de CD28. Le recrutement de Lck à CD28 est augmenté suite à la stimulation des lymphocytes T, confirmant sa dissociation de la MP [74]. Enfin, il a été démontré par FRET que le domaine cytoplasmique de l'IgG-BCR se dissocie de la MP suivant une stimulation avec de l'antigène [323].

En conclusion, les chaînes cytoplasmiques de plusieurs récepteurs immuns s'associent à la MP en conditions homéostatiques. L'association membranaire de ces chaînes empêche le recrutement de kinases et prévient la signalisation en absence d'activation. La stimulation entraîne la dissociation membranaire de ces chaînes immunes, permettant l'initiation de la cascade d'activation.

1.5.3 Régulation de la phosphorylation du TCR

L'enfouissement des tyrosines des ITAMs à l'intérieur de la bicouche lipidique indique que ce mécanisme de régulation préviendrait la phosphorylation des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR en absence de stimulation. Les chaînes CD3 du TCR ne sont pas phosphorylées chez les lymphocytes T au repos malgré que Lck soit constitutivement active [60, 230]. L'interaction entre le TCR d'un lymphocyte T et le pCMH d'une CPA entraîne l'exclusion de la phosphatase CD45 de la synapse

immunologique par contraintes stériques [62]. En parallèle, le rapprochement de la kinase Lck au TCR par l'association du co-récepteur CD4 ou CD8 au CMH mène à la phosphorylation du TCR [337]. L'interaction entre le TCR et le pCMH doit être suffisamment longue pour permettre le recrutement d'un co-récepteur lié à un Lck activé [337]. De plus, il a été démontré que le bassin de kinases Lck catalytiquement actives augmente suivant la stimulation des lymphocytes T [338]. Ainsi, la modification du statut d'activation et de la localisation spatiale de Lck favorise la phosphorylation des ITAMs suivant la stimulation des cellules.

Il a été démontré que les résidus basiques du BRS de CD3 ϵ et de CD3 ζ sont requis pour le recrutement de Lck au TCR. Le Domaine Unique de Lck est riche en acides aminés chargés négativement, ce qui recrute Lck aux résidus basiques du BRS par interactions électrostatiques [320]. De plus, il a été récemment démontré que la chaîne cytoplasmique de CD3 ϵ est dotée d'un domaine de liaison SH3 caractérisé par la séquence RKxQRxxY. Lors de la ligation du TCR, ce domaine recrute la kinase Lck, par son domaine SH3, à la chaîne CD3 ϵ non-phosphorylée [339]. Ces mécanismes de régulation du recrutement de Lck ajoutent une couche de régulation à la phosphorylation du TCR. Chez les cellules T au repos, Lck est exclu des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ puisque leurs domaines BRS sont enfouis à l'intérieur de la MP par interactions électrostatiques avec les phospholipides acides [230, 319]. Le domaine de liaison SH3 de CD3 ϵ est également inaccessible à Lck en absence de ligation du TCR [339]. En parallèle, l'absence de BRS chez CD3 δ et CD3 γ empêche le recrutement de Lck et leur phosphorylation en absence de stimulation. Le recrutement de Lck au TCR lors de la stimulation des lymphocytes T nécessite un changement conformationnel activation-dépendant des chaînes CD3 ϵ et de CD3 ζ afin d'exposer le BRS et le domaine de liaison SH3 [320, 339]. Le BRS possède ainsi deux fonctions, soit l'association membranaire chez les lymphocytes T au repos afin de restreindre l'activation en absence de stimulation et le recrutement de Lck au TCR pour l'initiation de l'activation une fois les chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ dissociées.

1.5.4 Mécanismes de dissociation des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR

Le contact initial entre un lymphocyte T et une CPA mène à la formation de microagrégats de TCRs, à la phosphorylation des chaînes CD3 et au recrutement de la kinase ZAP-70 pour

l'initiation de la cascade de signalisation. La dissociation membranaire des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR est la première étape de l'initiation de l'activation des lymphocytes T, puisque l'exposition cytoplasmique de leur BRS est essentielle au recrutement de Lck au TCR et à la phosphorylation des ITAMs. La dissociation initiale des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ est en amont de l'activation de la cascade d'activation des cellules T. L'expression de ZAP-70 n'est pas requise pour la dissociation membranaire de CD3 ζ [137]. De plus, chez les cellules déficientes dans la protéine adaptatrice LAT, où l'influx de calcium est absent suite à la stimulation des lymphocytes T, le recrutement de ZAP-70 aux ITAMs phosphorylés de CD3 ζ est maintenu [340]. Plusieurs mécanismes de dissociation membranaire des chaînes CD3 du TCR lors de l'interaction initiale avec un pCMH agoniste ont été proposés, soit le débalancement kinase-phosphatase, le changement conformationnel du TCR, et la répartition latérale de la PS.

1.5.4.1 Débalancement kinase-phosphatase

Une portion des kinases Lck sont catalytiquement activées chez les lymphocytes T au repos, ce qui permet de phosphoryler rapidement le TCR suivant sa stimulation [60]. L'exclusion de CD45 de la zone de contact entre la cellule T et la CPA entraîne une phosphorylation robuste du TCR par Lck [64]. Il est proposé que le débalancement du ratio kinase et phosphatase favorise la phosphorylation des chaînes CD3 du TCR suivant la stimulation des cellules T, entraînant leur dissociation de la MP.

La phosphorylation de protéines cationiques mène à leur expulsion de la MP. La phosphorylation de K-Ras induit sa translocation de la MP vers les membranaires internes [237]. La neutralisation de la charge nette positive de CD3 ζ par sa phosphorylation empêche sa réassociation aux phospholipides acides [312]. Il a été démontré que la phosphorylation de CD3 ζ est requise pour sa dissociation de la MP. La mutation des tyrosines des ITAMs de CD3 ζ en phénylalanine empêche sa dissociation de la MP suivant la stimulation du TCR. Alternativement, le traitement des cellules T avec l'inhibiteur des kinases Src PP2 prévient la dissociation membranaire de CD3 ζ [319, 336]. De plus, il a été observé que CD3 ζ est phosphorylée de manière basale chez les lymphocytes T au repos [230, 315, 341, 342]. En effet, l'association de CD3 ζ aux phospholipides acides existe en équilibre dynamique entre la conformation associée partiellement associée [343]. L'association partielle de CD3 ζ aux phospholipides acides ainsi que

sa phosphorylation basale chez les lymphocytes T au repos indique que Lck pourrait être recruté rapidement aux domaines BRS de CD3 ζ [320]. Le débalancement kinase-phosphatase lors du contact cellule T-CPA entraînerait la phosphorylation et la dissociation membranaire de CD3 ζ .

Pour la chaîne CD3 ϵ , une étude de NMR a démontré que ses ITAMs sont séquestrés à l'intérieur d'une bicouche lipidique composée de phospholipides acides et zwitterioniques [230]. Il a été démontré que l'association de CD3 ϵ à des phospholipides acides prévient sa phosphorylation [230]. De plus, contrairement à CD3 ζ , la chaîne CD3 ϵ n'est pas phosphorylée de manière basale chez les lymphocytes T au repos [253]. Finalement, la mutation des tyrosines des ITAMs de CD3 ϵ ne prévient pas sa dissociation de la membrane suivant la stimulation des cellules T [318].

Ainsi, l'exclusion de CD45 et le recrutement du complexe CD4/CD8-Lck au TCR pourraient mener à la phosphorylation et la dissociation membranaire des chaînes accessibles du TCR (**Figure 7**). La dissociation initiale de CD3 ζ nécessite des ITAMs intacts et l'activité des kinases Src, indiquant que CD3 ζ doit être phosphorylé afin d'être répulsé de la MP. En contraste, la chaîne CD3 ϵ se dissocie en absence de phosphorylation. Ainsi, un autre mécanisme de dissociation initial est requis pour la chaîne CD3 ϵ .

1.5.4.2 Changement conformationnel du TCR

L'interaction entre un lymphocyte T et une CPA à travers le complexe TCR-pCMH agoniste et les molécules d'adhésion exerce une force sur le TCR. Une CPA présente environ une dizaine à une centaine de pCMHs agonistes à sa surface, une quantité suffisante pour activer les lymphocytes T [109, 110]. La stimulation de lymphocytes T avec une concentration similaire de pCMHs agonistes, mais en absence de force externe, empêche leur activation [344]. L'application continue d'une force de 10 pN sur le TCR en utilisant une bille recouverte d'un seul pCMH agoniste entraîne un influx transitoire de calcium, indiquant que la force peut activer un TCR [344, 345].

Il a été proposé que la force mécanique générée par l'interaction TCR-pCMH induit un mouvement de piston sur les chaînes CD3 du TCR, entraînant leur dissociation et leur phosphorylation [345]. Une étude de FRET a démontré qu'un pCMH fortement agoniste compresse le complexe TCR-pCMH, induisant la dissociation membranaire de la chaîne CD3 ζ

[336]. Les pCMHs partiellement agonistes engendrent une force plus faible et d'une durée plus courte que les pCMHs agonistes [345]. Ainsi, les peptides partiellement agonistes entraînent une plus faible compression du complexe TCR-pCMH et une dissociation inefficace de CD3 ζ [336]. La force engendrée par l'interaction TCR-pCMH permet au TCR de discriminer entre les peptides agonistes, faiblement agonistes ou non-agonistes [345].

Les modèles de changements conformationnels offrent une explication sur la transmission du signal d'activation des chaînes extracellulaires du TCR vers les domaines cytoplasmiques des chaînes CD3. L'interaction TCR-pCMH comprime le TCR et entraîne la phosphorylation et la dissociation membranaire de CD3 ζ . L'impact de la compression du TCR sur la dissociation membranaire de CD3 ϵ n'a pas encore été démontré. Comme nous l'avons décrit plus tôt, des études structurales ont proposé que la stimulation du TCR induit différents changements conformationnels dans les domaines extracellulaires et transmembranaires du TCR, ce qui pourrait promouvoir la dissociation initiale des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ de la MP (**Figure 7**). Toutefois, l'élucidation récente de la structure du TCR par microscopie cryo-électronique démontre une conformation parallèle des domaines transmembranaires des chaînes du TCR. Cette observation est en contraste avec les études proposant une conformation diagonale du TCR α ou la séparation des chaînes transmembranaires de l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$. De plus, la structure du TCR en présence d'un pCMH ou d'un anticorps anti-CD3 ne démontre aucun changement conformationnel en comparaison avec le TCR non-activé [18]. Ainsi, le rôle de la force et des changements conformationnels sur la dissociation membranaire des chaînes CD3 du TCR reste à confirmer.

1.5.4.3 Réarrangement latéral de la PS

Le contact initial entre un lymphocyte T avec une CPA ou une bicouche lipidique chargée avec des pCMH agonistes et la molécule d'adhésion ICAM-1 entraîne la formation de microagrégats de TCRs [85, 88, 318]. Des études réalisées avec la sonde polycationique R-pre ont démontré une réduction de la charge négative de la MP à l'intérieur des microagrégats de TCRs [318]. Un rapporteur fluorescent pour la PS, composé du domaine C2 de la lactadhérine (Lact-C2), démontre une réduction de la PS à l'intérieur des agrégats de TCRs. En parallèle, une sonde de microscopie composée du domaine PH de PLC δ (PH-PLC δ) démontre une co-localisation de

PI(4,5)P₂ avec les TCRs [318]. La réduction de la concentration de PS à la face interne de la MP est suffisante pour réduire le potentiel électrostatique membranaire [236, 310]. Ainsi, l'exclusion de la PS conduirait à la diminution de la charge négative de la MP à l'intérieur des microagrégats de TCRs lors de la stimulation initiale des lymphocytes T.

La réduction du potentiel électrostatique de la MP est suffisante pour induire la dissociation de protéines possédant des domaines riches en acides aminés basiques [236]. La dissociation des chaînes CD3 du TCR à l'intérieur des agrégats de TCRs n'a pas encore été directement démontrée. La chaîne CD3ζ est phosphorylée à l'intérieur des microagrégats denses en TCRs [346]. La kinase ZAP-70 est recrutée aux agrégats de TCRs, indiquant que les chaînes CD3 du TCRs sont dissociées et phosphorylées [85, 86]. Finalement, la réduction du potentiel électrostatique de la MP induit la phosphorylation spontanée de la chaîne CD3ζ chez les cellules T au repos [310]. Il a été proposé que la réduction de la charge négative de la MP causée par l'exclusion de la PS des agrégats de TCRs mène à la diminution des interactions électrostatiques entre les chaînes CD3ε et CD3ζ du TCR avec la MP. La perte de l'affinité entre les domaines BRS de CD3ε et CD3ζ entraînerait leur dissociation de la MP. Les domaines BRS ainsi exposés recruteraient la kinase Lck au TCR par interaction électrostatique, induisant la phosphorylation initiale des ITAMs des chaînes CD3 (**Figure 7**).

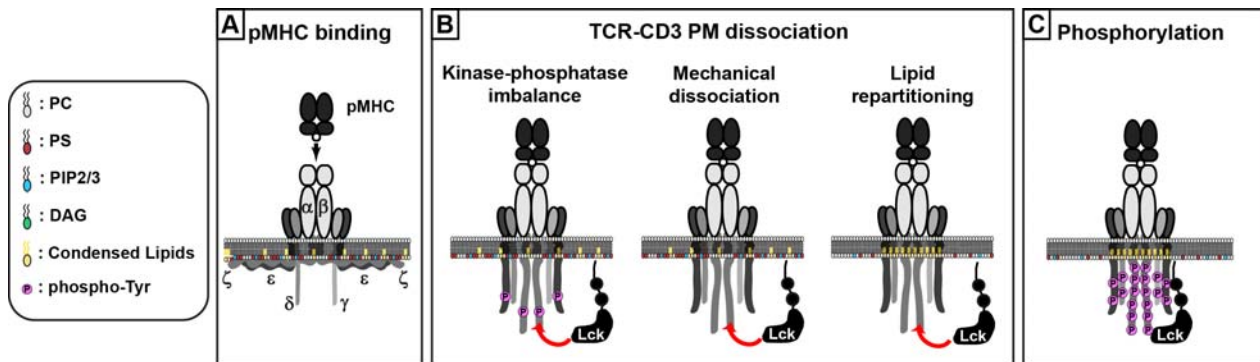


Figure 7. – Mécanismes proposés de dissociation initiale des chaînes CD3ε et CD3ζ du TCR

Image adaptée avec la permission de John Wiley and Sons (Immunological Reviews, Vol. 291, Audrey Connolly et Etienne Gagnon, "Electrostatic interactions : From immune receptor assembly to signaling", p.26-43, © 2019) [347]

1.6 Mécanismes d'amplification de l'activation du TCR

Les premières interactions entre des TCRs et des pCMHs agonistes entraînent une dissociation membranaire initiale des chaînes CD3 du TCR telle que décrite au sous-chapitre précédent. Les chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ dissociées recrutent Lck à leur BRS. La phosphorylation des ITAMs par Lck recrute la kinase ZAP-70 au TCR par son domaine SH2 en tandem. Ces étapes initiales de signalisation mènent à la formation de la synapse immunologique et à l'activation des lymphocytes T. La synapse immunologique amplifie l'activation des cellules T en concentrant les molécules de signalisation avec les TCRs et les pCMHs.

La cascade d'activation des cellules T mène à la phosphorylation de molécules de signalisation, à la translocation de facteurs de transcription au noyau et à la prolifération des cellules T. Il est peu compris comment une CPA qui présente une quantité relativement faible de pCMHs agonistes peut activer une cellule T de manière robuste. Dans ce sous-chapitre, nous allons décrire les mécanismes proposés de l'amplification de l'activation des cellules T. En premier, nous allons décrire les mécanismes d'engagement en série des TCRs et l'amplification par l'interaction avec les pCMHs du soi. Finalement, nous allons décrire les mécanismes de modulation du potentiel électrostatique de la MP, soit par le réarrangement latéral des phosphoinositides ou l'influx de calcium cytoplasmique, qui ont été proposés d'amplifier la dissociation membranaire des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR.

1.6.1 Engagement en série des TCRs

Une CPA ne présente qu'une faible quantité de pCMH agonistes en comparaison avec les pCMH endogènes [109, 110]. La présentation d'une centaine de complexes pCMH agonistes par une CPA entraîne l'internalisation de 60% des TCRs suivant deux heures d'activation [111]. La formation des microagégats de TCRs concentre les pCMHs agonistes avec les TCRs et les molécules de signalisation. Il a été démontré qu'un seul pCMH agoniste peut concentrer des TCRs

afin de former un microagrégat stable [348]. De plus, il a été démontré que les TCRs sont engagés en série dans les microagrégats de TCRs, permettant l'activation de plusieurs TCRs par un même pCMH [111]. Ainsi, chaque pCMH agoniste interagit avec plus d'un TCR, permettant l'amplification de l'activation des cellules T par l'accumulation de signaux d'activation.

Lors de l'activation des lymphocytes T, la cinétique d'internalisation des TCRs est biphasique, où les premières minutes d'activation démontrent une internalisation rapide suivie d'une phase d'internalisation lente [111, 168, 349]. Considérant que l'interaction TCR-pCMH a une durée de quelques secondes, la cinétique d'activation et d'internalisation est initialement trop rapide pour que seuls des TCRs ayant interagi avec un pCMH soient internalisés [113]. L'internalisation initiale robuste des TCRs indique que des TCRs n'ayant pas interagi avec un pCMH agoniste sont activés. Toutefois, l'internalisation lente des TCRs observée après plusieurs minutes d'activation correspond au modèle d'engagement en série, où l'engagement d'un TCR par un pCMH mène à son internalisation [168]. L'engagement en série des TCRs permettrait de soutenir l'activation des cellules T par l'activation de plusieurs TCRs par un seul pCMH à la synapse immunologique, mais n'est pas le seul mécanisme d'amplification de l'activation des cellules T.

1.6.2 Amplification par les peptides du soi

L'activation de TCRs par les pCMH du soi a été proposée comme mécanisme alternatif à l'engagement en série des TCRs pour l'amplification de la signalisation des lymphocytes T. L'interaction initiale de TCRs avec leur pCMH agoniste mène à la formation de la synapse immunologique, ce qui recrute des CMHs présentant des peptides endogènes non-agonistes [107, 350, 351]. L'interaction entre les co-récepteurs CD4 et CD8 avec les CMHs de la CPA stabilise la synapse immunologique [107, 352, 353]. Les co-récepteurs recrutent la kinase Lck au TCR [61]. Il a été démontré que l'accumulation des pCMHs du soi à la synapse immunologique amplifie l'activation des cellules T [350, 351]. Étant donné que les TCRs ne sont pas directement activés par un pCMH du soi, l'amplification de l'activation des cellules T par des pCMHs non-agonistes est due au recrutement de la kinase Lck par son association aux co-récepteurs CD4 ou CD8 [354, 355].

En effet, les pCMHs du soi et les co-récepteurs CD4 et CD8 réduisent le seuil d'activation des cellules T lorsque le nombre de pCMHs agonistes est faible [107, 350, 352-355]. Les co-

récepteurs CD4 et CD8 interagissent avec les pCMHs endogènes par des mécanismes différents. Pour les lymphocytes T CD4+, le co-récepteur CD4 interagit avec un CMH chargé d'un peptide agoniste, mais pas avec un peptide du soi [351]. Les TCRs qui interagissent avec les pCMHs du soi sont activés par le complexe CD4-Lck lié au pCMH agoniste [354]. Ainsi, un modèle de pseudo-dimère a été proposé pour l'amplification de l'activation des lymphocytes T CD4+ par les pCMHs non-agonistes, où le complexe CD4-Lck s'associe au pCMH agoniste et active le TCR qui interagit de manière transitoire avec un pCMH du soi (**Figure 8**) [351]. Les peptides du soi présentés sur les CMHs de classe II sont issus des vésicules intracellulaires de la CPA [65].

Pour les lymphocytes T CD8+, le co-récepteur CD8 interagit avec les CMHs de classe I présentant des peptides agonistes ou non [352, 355]. Contrairement aux lymphocytes T CD4+, les TCRs des lymphocytes T CD8+ n'interagissent pas avec les pCMHs du soi pour être activés [353, 355]. Le modèle proposé pour l'amplification de l'activation des lymphocytes T CD8+ par les pCMHs du soi est la concentration de complexes CD8-Lck à la synapse immunologique par l'interaction entre CD8 et les pCMHs du soi, ce qui permet l'activation de TCRs lié à des pCMHs agonistes (**Figure 8**) [355]. La nécessité d'interaction entre les TCRs et les pCMHs du soi pour les lymphocytes T CD4+ mais pas les lymphocytes T CD8+ est due à la plus faible affinité du co-récepteur CD4 pour les CMHs [61]. En effet, il a été démontré que les TCRs doivent interagir avec le pCMH du soi lorsque l'affinité de CD8 pour le CMH est réduite par mutation [356]. En conclusion, les pCMHs du soi recrutent les co-récepteurs CD4 et CD8 à la synapse immunologique, ce qui amplifie l'activation des cellules T en rapprochant la kinase Lck des TCRs.

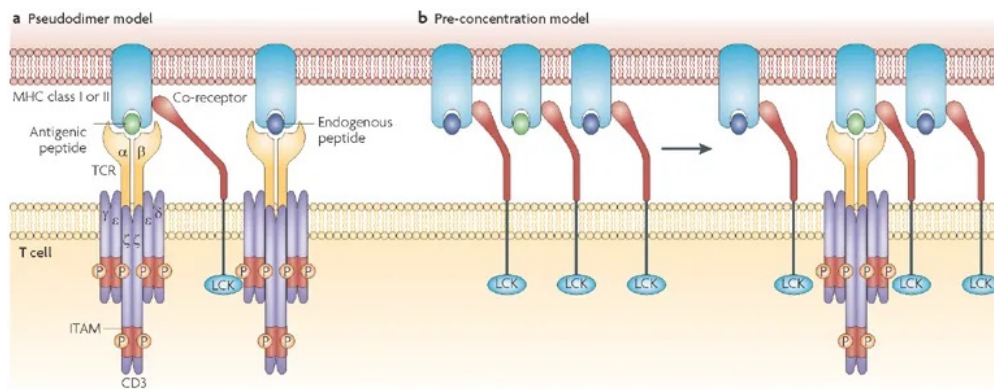


Figure 8. – Modèles d’amplification de l’activation par les peptides non-agonistes pour les co-récepteurs CD4 (pseudodimère) et CD8 (pré-concentration)

Image reproduite avec la permission de Springer Nature (Nature Reviews Immunology, Vol. 8, Nicholas R.J. Gascoigne, “Do T cells need endogenous peptides for activation?”, p.895-900, © 2008) [65]

1.6.3 Modulation des phosphoinositides

La dynamique des différents sous-types de PIs à la synapse immunologique a été étudiée avec des sondes de microscopie composée de domaines PH de protéines liant spécifiquement certains PIs. La localisation de PI(3,4,5)P₃ à la synapse immunologique a été étudiée avec des sondes utilisant le domaine PH de Grp1 [104, 357-359]. PI(3,4,5)P₃ est localisé à travers l’entièreté de la synapse immunologique lors du contact initial entre le lymphocyte T et une cellule présentatrice d’antigène ou une bicouche lipidique planaire chargée avec des pCMHs et ICAM-1 [104, 357-359]. Moins d’une minute suivant la stimulation de la cellule T, PI(3,4,5)P₃ migre vers la périphérie de la synapse immunologique et se déplete au cSMAC [357, 358]. L’activité continue des PI3K de classe I maintient l’accumulation de PI(3,4,5)P₃ à la synapse immunologique dans les secondes allant dans les heures suivant la stimulation du TCR [357, 358]. La localisation périphérique de PI(3,4,5)P₃ est la conséquence de sa déphosphorylation en PI(3,4)P₂ au cSMAC par la phosphatase SHIP1 [360]. La sonde de microscopie composée du domaine PH de la protéine adaptatrice Bam32 démontre une accumulation de PI(3,4)P₂ au cSMAC [360].

Le rapporteur PH-PLCδ montre la co-localisation de PI(4,5)P₂ avec les microagrégats TCR une minute après le contact d’une cellule T avec une bicouche lipidique planaire chargée avec des molécules de pCMH et de ICAM-1 [318]. En parallèle, les isoformes γ87 et α de PIP5K sont recrutés à l’interface d’activation de la cellule T [361]. Le recrutement des PIP5Ks au cSMAC maintiennent les niveaux de PI(4,5)P₂ à la synapse immunologique suivant son hydrolyse par PLCγ1. Malgré son accumulation transitoire à la synapse immunologique, PI(4,5)P₂ disparaît progressivement du cSMAC jusqu’à sa déplétion cinq minutes après le contact cellule T-CPA [360, 362]. La déplétion de PI(4,5)P₂ au cSMAC corrèle avec la relocalisation des PIP5Ks au dSMAC [360, 361]. Les PIP5Ks sont recrutés à la MP par interactions électrostatiques avec les phospholipides acides [304]. La

présence des PIP5Ks au dSMAC et leur déplétion du cSMAC génère un gradient de concentration de PI(4,5)P₂ à la synapse immunologique mature [360, 361].

La localisation des populations de PIs à la synapse immunologique est complexe et régulée de manière spatio-temporelle. Des sondes polycationiques composées de R-pre ou de PIP5K démontrent une réduction du potentiel électrostatique négatif de la MP au cSMAC [310, 360]. L'hydrolyse de PI(4,5)P₂ par PLC γ 1 et la déphosphorylation de PI(3,4,5)P₃ par SHIP1 réduisent la charge négative de la MP à la synapse. Ainsi, la localisation de PI(3,4)P₂ au cSMAC est insuffisante pour maintenir la charge négative nécessaire au recrutement de protéines possédant des domaines polybasiques.

Il a été proposé que la diminution du potentiel électrostatique de la MP causé par la déplétion de PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃ au cSMAC entraîne la dissociation membranaire des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR. L'expression ectopique de la phosphatase Inp54p à la MP diminue le potentiel électrostatique de la MP par la déphosphorylation de PI(4,5)P₂ [310]. La déphosphorylation de PI(4,5)P₂ par Inp54p mène à une dissociation membranaire de CD3 ϵ et augmente la phosphorylation de CD3 ζ après la stimulation du TCR par un pCMH [363]. Sans avoir été directement démontré, la diminution du potentiel électrostatique de la MP par l'exclusion de PI(4,5)P₂ du cSMAC pourrait mener à la dissociation membranaire des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR afin d'amplifier l'activation des cellules T. Considérant l'absence de phospholipides fortement chargés comme PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃ du cSMAC, la perte globale du potentiel électrostatique de la MP pourrait promouvoir la dissociation membranaire massive des chaînes CD3 de TCRs, permettant la phosphorylation des ITAMs et l'amplification de la signalisation de la cellule T.

1.6.4 Élévation du calcium intracellulaire

La stimulation du TCR mène à une cascade d'activation complexe résultant en la translocation de facteurs de transcription au noyau pour l'expression de gènes requis pour la fonction, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. Un important point de contrôle à l'activation des cellules T est un influx de calcium cytosolique robuste. L'entrée de calcium chez les lymphocytes T activés est observée suivant une seule interaction TCR-pCMH avec la présence du co-récepteur CD4. Toutefois, une entrée robuste et soutenue de calcium requiert une dizaine

d'interactions TCR-pCMH avec CD4 [107]. L'activation des lymphocytes T avec un pCMH agoniste induit une réponse robuste de calcium, tandis qu'un peptide partiellement agoniste élicite une réponse transitoire [364]. L'influx de calcium chez les lymphocytes T activés est sensible à la quantité et à l'affinité des peptides présentés par la CPA [107, 364].

La concentration en calcium du milieu extracellulaire est 20,000 fois plus élevée que la concentration cytoplasmique basale des cellules T, qui est située à 100nM [138]. L'activation des canaux CRAC à la synapse immunologique augmente transitoirement la concentration de calcium locale à 2 μ M. Le calcium se dissipe et la concentration cytoplasmique globale s'élève à 600nM [137, 365]. L'activation des CRACs est essentielle à l'activation soutenue des cellules T, car une stimulation en absence de calcium extracellulaire mène à une réduction de la phosphorylation des chaînes CD3 ainsi que des molécules de signalisation proximales du TCR [322, 366].

Les ions de calcium ont été proposés d'agir en tant que compétiteurs pour l'association membranaire des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR à la MP. Des études de FRET ont démontré qu'une stimulation avec l'ionophore de calcium ionomycine induit la dissociation membranaire des chaînes cytoplasmiques de CD3 ϵ , CD28 et de l'IgG-BCR [322, 323, 366]. Des expériences de NMR ont démontré que les ions de calcium déstabilisent l'interaction entre les tyrosines des ITAMs de CD3 ϵ , CD28 et de l'IgG-BCR et des bicelles formées de phospholipides acides [322, 323, 366]. Les ions de calcium neutralisent le groupement phosphate des phospholipides acides comme la PS [366, 367]. Il a été démontré par NMR qu'une concentration physiologique de 1 μ M de calcium induit un faible déplacement du signal phosphate du phospholipide acide PG, indiquant la neutralisation directe de sa charge négative. De plus, une concentration de 2 μ M ou 4 μ M de calcium mène à la dissociation de 20% et 40%, respectivement, des chaînes CD3 ϵ associées à des vésicules composées du phospholipide acide PG [366].

L'augmentation du calcium cytosolique par la déplétion pharmacologique du RE ou l'influx extracellulaire avec l'ionomycine réduit la charge négative de la MP [310]. La dissociation membranaire des chaînes cytoplasmiques de CD3 ϵ et de CD28 a également été induite par l'ion divalent strontium [322, 366]. Il a ainsi été proposé que les ions divalents comme le calcium agissent en tant que compétiteurs des domaines BRS des récepteurs immuns pour les interactions

électrostatiques avec les phospholipides acides. L'influx robuste de calcium par les canaux CRAC est induit en aval d'une phosphorylation initiale des chaînes CD3 et d'une activation de la cascade de signalisation. Ainsi, il a été proposé que la réduction globale du potentiel électrostatique de la MP apporté par le calcium mène à l'amplification du signal d'activation des cellules T par la dissociation des chaînes CD3 provenant de TCRs qui ne sont pas directement engagés par un pCMH agoniste, soit les TCRs non-engagés ou "bystander" [366].

1.7 Objectifs de la thèse

L'activation des lymphocytes T est régulée au niveau du TCR par l'association électrostatique des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ aux phospholipides acides de la MP. Un faible nombre d'interactions TCR-pCMH agoniste active les lymphocytes T de manière robuste. Toutefois, les mécanismes d'amplification de l'activation des lymphocytes T restent peu compris.

Il a été proposé que le calcium régule l'amplification de l'activation des lymphocytes T par la dissociation membranaire et l'activation de TCRs non-engagés par un pCMH agoniste. L'activation des cellules T génère un influx de calcium à la synapse immunologique. Il a été proposé que les ions de calcium compétitionnent avec les chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ pour l'association aux phospholipides de la MP. En effet, l'élévation du calcium intracellulaire entraîne une dissociation massive des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ de la MP [366].

En plus de s'associer directement aux phospholipides acides afin de neutraliser leur charge, le calcium est un co-facteur important dans l'activation de plusieurs enzymes. Le calcium active des scramblases qui redistribuent la PS entre deux feuillettes d'une bicouche lipidique. La concentration de calcium à la synapse immunologique des lymphocytes T activés serait suffisante pour activer la scramblase TMEM16F. L'influx de calcium généré par les canaux CRAC suite à la stimulation des cellules T augmente la concentration cytoplasmique à 2 μ M à la synapse immunologique et 0.6 μ M au restant de la cellule [137, 365]. TMEM16F est la scramblase la plus exprimée chez les lymphocytes T et sa fonction de redistribution de la PS est activée à 1 μ M de calcium [286, 368, 369]. Il a été démontré que la PS est externalisée de manière non apoptotique et réversible suite à l'activation des lymphocytes T et B [139, 370-372]. De plus, la PS externalisée est majoritairement située à la synapse immunologique des lymphocytes T activés [370].

La PS est le phospholipide acide le plus abondant au feuillet interne de la MP et est essentiel au maintien du potentiel électrostatique négatif de la MP [236]. Ainsi, la redistribution de PS par TMEM16F pourrait diminuer les interactions électrostatiques entre les BRS des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ et la MP. Nous émettons l'hypothèse que la modulation de PS à la synapse immunologique par l'activité scramblase calcium-dépendante de TMEM16F entraîne la dissociation membranaire des TCRs non-engagés pour l'amplification de la signalisation des

lymphocytes T. Considérant que la scramblase TMEM16F reste peu étudiée chez les lymphocytes T et que le rôle de la modulation de la PS dans l'association membranaire des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ reste incompris, les objectifs de cette thèse sont :

- 1) Étudier la fonction scramblase et la localisation de TMEM16F chez les lymphocytes T en conditions homéostatiques et lors de la formation de la synapse immunologique.
- 2) Étudier le rôle de l'élévation du calcium cytosolique et de la redistribution de PS par TMEM16F sur le niveau d'association membranaire de la chaîne CD3 ϵ du TCR
- 3) Étudier l'impact de la modulation de la PS par TMEM16F dans l'activation des TCRs non-engagés et dans l'amplification de la signalisation des lymphocytes T
- 4) Étudier le rôle de TMEM16F lors d'une réponse immunitaire protectrice

Chapitre 2 - TMEM16F régule la dissociation membranaire de CD3ε et l'activation des TCRs non-engagés à la synapse immunologique

Audrey Connolly^{1,2}, Rébecca Panes^{1,2}, Margaux Tual^{1,2}, Raphaël Lafortune², Angélique Bellemare-Pelletier¹, and Etienne Gagnon^{1,2}

1. Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie.
2. Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montréal, Québec, CANADA, H3T1J4.

Article en révision à *Science Signaling*

2.1 Mise en contexte du projet

Chez les lymphocytes T au repos, les chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR s'associent à la MP par interactions électrostatiques. Un mécanisme proposé pour la dissociation membranaire des chaînes CD3 du TCR lors de l'amplification de l'activation des cellules T est par l'élévation du calcium intracellulaire. TMEM16F est une scramblase calcium-dépendante qui redistribue la PS vers la surface de la cellule et la diminution de la PS au feuillet cytoplasmique de la MP diminue le potentiel électrostatique de la MP [236, 310]. Nous avons émis l'hypothèse que TMEM16F régule l'association membranaire électrostatique des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR par la modulation calcium-dépendante de la PS à la MP. Dans ce projet, nous avons voulu clarifier le rôle du calcium et de TMEM16F dans l'association membranaire de CD3 ϵ et dans l'activation des cellules T.

Nous avons étudié l'association membranaire de la chaîne cytoplasmique de CD3 ϵ dans la lignée de cellules T Jurkat par FRET-FLIM. Le FRET-FLIM est une méthode établie pour l'étude du niveau d'association de CD3 ϵ à la MP [318]. Afin d'étudier l'impact de la modulation de la PS à la MP sur l'association membranaire de CD3 ϵ , nous avons généré des lignées cellulaires exprimant un ARN interférant contre TMEM16F (shTMEM16F, ou shT). En parallèle, nous avons généré des lignées Jurkat qui surexpriment TMEM16F ou qui expriment un mutant constitutivement actif de TMEM16F [373]. Avec ces outils, nous avons étudié par FRET la dissociation membranaire de CD3 ϵ , soit en présence ou absence de calcium, ainsi qu'à la synapse immunologique. De plus, le ciblage intracellulaire de TMEM16F a été étudié par sa conjugaison à une protéine fluorescente. Enfin, nous avons généré un récepteur chimérique afin d'étudier comment la modulation de PS par TMEM16F régule l'activation des TCRs non-engagés pour l'amplification de l'activation des cellules T.

Notre étude est la première à démontrer que la dissociation membranaire de la chaîne CD3 ϵ du TCR est régulée par la modulation de PS et par TMEM16F lors de l'activation des cellules T. De plus, nous avons démontré que TMEM16F régule l'activation de TCR non-engagés, permettant l'amplification de l'activation des cellules T.

2.2 Contributions des auteurs

AC : Conception du projet, planification, génération des constructions de plasmides et des lignées cellulaires, exécution des expériences, analyse et interprétation des résultats, préparation des figures, écriture du manuscrit.

RP : Conception des expériences en cellules T primaires et exécution du qPCR de cellules primaires transduites (Figure S1B).

MT: Conception et exécution d'expériences de clonage du TCR A6 et du peptide Tax. Génération des lignées cellulaires JY-Tax. Optimisation des expériences d'activation de cellules Jurkat TCR A6 avec les cellules JY-Tax.

RL: Conception et exécution d'expériences de clonage de la chimère DR-CD3 ϵ δ et de la protéine li. Exécution et préparation de la figure d'activation au pervanadate (Figure S4D).

ABP: Maintien des colonies de souris, génération des constructions de plasmides pLKO.1-Ametrine, support à la conception et à l'exécution des expériences.

EG: Conception du projet, analyse et interprétation des résultats, préparation des figures, écriture du manuscrit. Conception, exécution et analyse de l'expérience d'imagerie au Fluo-4 (Figure S2G-H). Génération des constructions de plasmides HA-KIR-mTFP1.

TMEM16F mediates bystander TCR-CD3 membrane dissociation and signaling at the immunological synapse.

Audrey Connolly^{1,2}, Rébecca Panes^{1,2}, Margaux Tual^{1,2}, Raphaël Lafortune², Angélique Bellemare-Pelletier¹, and Etienne Gagnon^{1,2,3}.

1. Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie.
2. Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montréal, Québec, CANADA, H3T1J4.
3. Corresponding author : etienne.gagnon@umontreal.ca

2.3 Abstract

Electrostatic interactions regulate many aspects of TCR activity; they promote receptor assembly, prevent spontaneous phosphorylation by enabling dynamic membrane binding of CD3 ϵ and ζ to anionic lipids at the plasma membrane, and promote efficient recruitment of kinases to initiate signaling. Drastic changes in the electrostatic potential of the plasma membrane have been observed at the immunological synapse. How the electrostatic interactions that promote dynamic membrane binding of the TCR-CD3 cytoplasmic domains are modulated during signaling and affect T cell activation is still unknown. The demonstration that the calcium-sensitive phosphatidylserine scramblase TMEM16F plays a role in regulating T cell activation shed new light on potential underlying mechanisms of TCR triggering and signal amplification. Here we show that calcium-dependent activation of TMEM16F reduces the electrostatic potential of the plasma membrane during immunological synapse formation by locally redistributing phosphatidylserine. This in turn increases bystander TCR-CD3 cytoplasmic domain dissociation from the plasma membrane and enhances TCR-based signaling as well as T cell activation. This study establishes the molecular basis for the role of TMEM16F in bystander TCR-induced signal amplification by reducing the electrostatic interactions between the TCR-CD3 cytoplasmic chains and the plasma membrane at the immunological synapse.

KEY WORDS: T cells, TCR, CD3 epsilon, phosphatidylserine, TMEM16F, cell signaling, electrostatic interactions.

2.4 Introduction

The T cell receptor (TCR) is a multi-subunit complex central to our ability to mount a protective, long lasting immune response. It is composed of the hypervariable α and β chains in addition to three dimers of CD3 chains (CD3 $\zeta\zeta$, CD3 $\epsilon\delta$ and CD3 $\epsilon\gamma$) [1]. The TCR α/β heterodimer typically recognizes a single peptide presented by the major histocompatibility complex (pMHC) of an antigen presenting cell [2]. One of the aspects of TCR signaling that is still unclear is the observation that despite the presence of only a few pMHCs capable of engaging a given TCR, a much larger proportion of TCRs engage in signaling [3, 4]. Two models have been proposed to explain the disproportionate engagement of TCRs relative to cognate pMHCs. The first model, called the serial triggering model, was proposed by the Valitutti group and presents the possibility that the low affinity nature of pMHC-TCR interactions enables the engagement of a first TCR, followed by dissociation and association with a nearby TCR [5, 6]. Serial engagement of TCRs would eventually lead to a sufficient accumulation of signaling in order to fully stimulate T cells and provides an explanation to the disproportionate internalization of TCRs following simulation [7]. Conversely, the coagonism model, hereafter referred to as the bystander TCR model because recognition of peptides within MHCs have been shown to be dispensable, proposes that following the initial engagement and triggering of a small number of TCRs via cognate pMHC, other TCRs become engaged through non-cognate or self-peptide presenting MHCs to significantly enhance T cell responses [8-11]. The Gascoigne group has demonstrated that local accumulation of Lck through the recruitment of CD8 at the cell-cell interface is a critical component for bystander TCR triggering and signaling [12]. However, the molecular basis for the regulation of bystander TCR engagement in signaling has yet to be determined. Indeed, although local accumulation of CD4 and CD8 can be achieved by receptor cross-linking using surface-opsonized antibodies, this fails to trigger TCRs despite local accumulation of Lck, suggesting the requirement of a critical step only engaged following the initial triggering of the pMHC-specific TCRs.

Several groups have shown that the cytoplasmic domains of the CD3 ϵ and ζ chains (CD3 ϵ_{CD} , CD3 ζ_{CD}) dynamically associate with the inner leaflet of the plasma membrane (PM) through electrostatic interactions, thereby protecting the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) tyrosines from spontaneous phosphorylation [13, 14]. This protected state requires

PM-dissociation and/or conformational changes within CD3 ϵ _{CD} and CD3 ζ _{CD} following pMHC recognition in order to render the ITAMs accessible to kinases for phosphorylation [15, 16]. However, the molecular steps required for inducing PM dissociation and/or conformational changes in the cytoplasmic domains of the TCR-CD3 chains upon pMHC recognition are not well understood. It was shown that upon pMHC-induced clustering, the TCR repartitioned within lipid microenvironments poor in anionic lipid content, suggesting PM dissociation of CD3 ϵ _{CD} [14, 17]. Moreover, several groups have shown drastic changes in the electrostatic profile of the PM at the immunological synapse, suggesting another potential mechanism for TCR-CD3 chain dissociation from the PM [14, 18]. From these findings, Shi *et al.* proposed a role for calcium (Ca²⁺) in reducing the binding dynamics of bystander TCRs at the synapse through electrostatic charge competition [19]. Indeed, this study showed that Ca²⁺ mobilized by Ca²⁺ release activated (CRAC) channels within the immunological synapse promoted membrane dissociation of bystander CD3 ϵ chains by competing for the electrostatic interactions with phosphatidylserine (PS) resulting in signal amplification. However, studies have shown that electrostatic interactions also promote TCR signaling and T cell stimulation by enabling Lck recruitment to CD3 ϵ and CD28, which would also be in competition in this model [20-23]. TMEM16F, a Ca²⁺ sensitive PS scramblase, was identified as a crucial component in regulating TCR signaling strength [24]. Although no direct link between TMEM16F activity and TCR-CD3 binding dynamics to the PM were made in this study, these findings provide a new framework to potentially reassess the role of Ca²⁺ in TCR signal amplification.

In this study, we examined the Ca²⁺-dependent role of TMEM16F in regulating bystander receptor binding at the synapse through local redistribution of PS. A reduction in TMEM16F expression led to a complete inhibition of PS redistribution following Ca²⁺ influx and significantly reduced bystander receptor dissociation at the synapse as well as TCR-dependent signaling. Oppositely, expression of a constitutively active mutant form of TMEM16F increased surface exposure of PS, thereby reducing inner leaflet PS content, and significantly increased bystander receptor dissociation from the PM in reduced Ca²⁺ influx conditions. This in turn enabled the engagement of greater numbers of bystander TCR during synapse formation leading to enhanced T cell activation. Taken together our results highlight the role of TMEM16F in regulating bystander

receptor binding to the PM and activation by modulating of electrostatic interactions at the synapse through Ca^{2+} -dependent redistribution of PS.

2.5 Material and Methods

2.5.1 Mice

Mice were bred and maintained in a pathogen-free environment at the Institute for Research in Immunology and Cancer animal care facility under a protocol approved by the University of Montreal Deontology Committee on Animal Experimentation. 6-8 week-old adult OT-I mice (male and female) were sacrificed and spleens and lymph nodes were collected. The organs were mechanically disrupted on a 70µm mesh and cells were collected by washing with cold RPMI (Gibco). The cells were incubated with red blood cell lysis buffer (150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA pH 7.4) for 5 minutes on ice. The cells were washed and the OT-I T cells were purified using the MojoSort Mouse CD8 T Cell Isolation kit (BioLegend). CD8 T cell purity was confirmed by anti-CD8α (BD Biosciences) surface staining for 30 minutes on ice and flow cytometry analysis. Freshly isolated primary OT-I T cells were cultured in RPMI + GlutaMAX supplemented with 10% FBS, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin, 0.005% β-mercaptoethanol, 1mM sodium pyruvate, 20mM HEPES, 25ng/mL IL-7 and 100ng/mL IL-15. IL-2 was added to the culture at a 20ng/mL concentration the day following sacrifice.

2.5.2 Cell lines

All cell lines were purchased from ATCC. All cell lines were maintained at 37°C in presence of 5% CO₂. Jurkat E6.1 T cells (human male) and JY B lymphoblastic cells (human male) were cultured in RPMI + GlutaMAX (Gibco) supplemented with 10% FBS, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 10mM HEPES pH 7.4. Jurkat cells were monitored for surface α/β TCR expression by surface staining with anti-α/β TCR clone IP26 (Thermo Fisher Scientific) and flow cytometry analysis. HEK293T cells (human female) were cultured in DMEM + GlutaMAX (Gibco) supplemented with 10% FBS, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 10mM HEPES pH 7.4. For lentiviral production, the HEK293T cells were cultured in DMEM + GlutaMAX supplemented with 15% FBS, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 10mM HEPES pH 7.4. HEK293T cells were passaged every 2-3 days using a solution of PBS containing 0.5% FBS, 2mM EDTA pH 8.0 and 10mM HEPES pH 7.4.

2.5.3 Plasmids

The li sequence was a kind gift from J. Thibodeau (University of Montreal, Canada) and was subcloned into a pHAGE vector by overlap PCR. The wild-type and mutant TMEM16F sequence were a kind gift from S. Nagata (Kyoto University, Japan). The TMEM16F sequences were subcloned into a pHAGE vector containing a P2A sequence followed by the mAmetrine fluorescent protein. shRNA sequences for human and mouse TMEM16F were obtained from the Mission shRNA Library (Sigma-Aldrich) and the hairpin loop was modified to the TATAACT sequence. The shRNAs were subcloned into a pLKO.1 vector expressing Ametrine under the hPGK promoter using AgeI and EcoRI restriction enzymes (New England Biolabs). All other constructs were generated by overlap PCR and subcloned into a pHAGE vector.

2.5.4 Lentivirus production

For transduction of Jurkat T cells, HEK293T cells were seeded in a tissue culture-treated 6-well plate. The following day, HEK293T cells were transfected with packaging plasmids: 0.625µg VSV-G (pMD2.g), 0.3125µg RRE (pMDLg/pRRE) and 0.3125µg REV (pRSV-REV) and 1.5µg of the plasmid of interest using TransIT-LT1 reagent (Mirus) following the manufacturer's protocol. The packaging plasmids were a kind gift from Didier Trono (Addgene plasmids # 12251, 12253, 12259). After 16 hours incubation, the medium was changed. Supernatants were harvested 36 hours after medium change. For primary T cell transduction, HEK293T cells were seeded in a 10cm tissue culture-treated dish. The following day, the cells were transfected with packaging plasmids (3µg VSV-G, 1.5µg RRE and 1.5µg REV) and 6µg of the plasmid of interest with TransIT-LT1 reagent following the manufacturer's protocol. The medium was changed after 16 hours incubation and replaced with 15% HEK293T medium. Supernatants were harvested 36 hours following medium change. The supernatants were filtered (0.45µm) and the virus was concentrated by ultracentrifugation at 25,000rpm for 90 minutes. 300µL ice-cold PBS was added to the pellet and the virus was allowed to resuspend overnight at 4°C. The virus was snap frozen on dry ice the following day and viral titers were determined in Jurkat T cells.

2.5.5 Lentiviral transduction

1 x 10⁵ Jurkat T cells were transduced at a 1:1 ratio of cells to viral supernatant in 24-well plates with 8µg/mL of polybrene (Sigma-Aldrich). The cells were spin infected at 2,000rpm for one hour at 37°C. The cells were incubated at 37°C for at least one hour before dilution for overnight incubation. The medium was changed the following day and cells were allowed to rest for 48 hours prior to flow cytometry analysis. Primary T cells were transduced 48 hours after isolation with a viral multiplicity of infection of 15 with 5µg/mL protamine sulfate (Sigma-Aldrich). The cells were spin infected at 2,000 rpm for 1.5 hours at 37°C in a 24-well plate previously coated with 20µg/mL retronectin (Takara). IL-2 was added at a final concentration of 20ng/mL before overnight incubation at 37°C. The following day, the cells were washed and cultured for 3 days with 20ng/mL IL-2, 12.5ng/mL IL-7, and 50ng/mL IL-15. The transduction efficiency was determined by flow cytometry analysis and cells were sorted based on intracellular fluorescence with a BD FACSAriaII cell sorter (Becton Dickinson). For cells transduced with pHAGE-HA-KIR or pHAGE-HA-DRαβTM-CD3εδCT constructs, the cells were surface stained with anti-HA antibody (Rockland Immunochemicals) for 30 minutes on ice prior to cell sorting.

2.5.6 Flow cytometry

For the different calcium flux assays, Jurkat T cells and OT-I T cells were loaded for 15 minutes at RT with 0.1µM Fluo-4 AM diluted in PBS. Following a wash step, esterase cleavage was allowed by incubating the cells for 1 hour at RT. Cells were kept on ice until flow cytometry analysis. For analysis, cells were equilibrated at RT for 10 minutes, stained with 1:500 Annexin-V (eBiosciences) and 1:1000 propidium iodide (eBiosciences) for 5 minutes at RT. All Annexin-V stains were performed in Annexin-V binding buffer (eBiosciences) supplemented with 0.5% FBS. For kinetic analysis in Jurkat T cells, fluorescence was recorded for 1 minute, DMSO or the indicated concentration of ionomycin (Sigma-Aldrich) was added and fluorescence was recorded for a further 9 minutes. For Jurkat activation assays, cells were activated with 10µg/mL PHA-L at 37°C and fluorescence was recorded at the indicated time points. For primary T cells, cells were stimulated with either DMSO or 2µM ionomycin at RT, and fluorescence was recorded after 10 minutes. For surface PS flipping assays, cells were treated with 2µM ionomycin for 5 minutes at RT. Cells were washed and stained with Annexin-V for 30 minutes on ice. Cells were washed and

either propidium iodide or 7AAD was added. Cells were kept on ice until flow cytometry analysis. Whole cell phosphatidylserine content was determined by fixing cells with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) for 30 minutes on ice. Cells were washed in Annexin-V binding buffer containing 0.1% digitonin and cells were stained for Annexin-V in this buffer as previously detailed. Intracellular calcium was chelated with 10 μ M BAPTA-AM treatment for 45 minutes at RT, following by an Annexin-V surface stain as previously described. All flow cytometry experiments performed on a Canto II (Becton Dickinson) or ZE5 (Bio-Rad) flow cytometer and analyzed with FACSDiva (Becton Dickinson) and FlowJo (TreeStar). For activation assays, the cells were stained with 1:200 CD69 clone FN50 (Thermo Fisher Scientific), 1:200 anti- $\alpha\beta$ TCR clone IP26 (Thermo Fisher Scientific), 1:500 clone JR2 V β 8-TCR (BioLegend), 1:500 Thy1.1 clone HIS51 (Thermo Fisher Scientific) in FACS buffer for 30 minutes on ice, and Annexin-V as previously described.

2.5.7 Bystander TCR activation assay

2.5.7.1 Cognate pMHC stimulation

For immunological synapse assay of Jurkat cells expressing the A6-TCR, the Jurkat cells transduced with the A6-TCR (GFP+) were mixed at a 1:1:1:1 ratio between the GFP+ WT, TM and Mut populations and the GFP- WT cells. The mixed population of A6 cells were incubated in triplicates at a 1:1 ratio with the JY cells expressing the Tax-mRFP construct in flat-bottom 96-well plates. Cells were activated overnight at 37°C. The cells were surface stained with anti-CD69, anti-V β 8 TCR, anti-Thy1.1 and Annexin-V.

2.5.7.2 Chimeric Immune Receptor Stimulation

For activation of cells expressing the HA-DR $\alpha\beta$ TM-CD3 $\epsilon\delta$ CT chimera, the cells were incubated at 37°C for the indicated time points with the indicated concentration of anti-HLA-DR clone L243 (BioLegend), anti-CD4 clone OKT4 (Tonobo Biosciences), anti-CD3 clone UCHT1 (BioLegend) or PMA/ionomycin. The cells were stained as previously described with anti-CD69, anti-V β 8 TCR, anti-Thy1.1 and Annexin-V. For surface staining of the DR chimera, the cells were either left unstimulated or activated for the indicated time points with 2.5 μ g/mL plate-bound anti-CD4 antibody and biotinylated anti-HLA-DR clone L243 (BioLegend) or anti-CD3 clone UCHT1.

Following activation, the cells were stained with biotinylated anti-HLA-DR followed by Streptavidin-AlexaFluor-647 (Thermo Fisher Scientific) and anti-V β 8.

2.5.8 Western blotting

Cells were activated with 10 μ g/mL PHA-L (Roche) at 37°C for the indicated time points. The activation reaction was stopped by adding ice-cold lysis buffer (150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7.5, 50mM NaF, 1mM NaVO₄, 5mM EDTA, 1% NP-40, 1X protease inhibitor (Roche), 1mM iodoacetamide and 1mM PMSF). Cells were allowed to lyse for 30 minutes at 4°C and proteins were isolated by the methanol-chloroform method. Proteins were resuspended in 1X LDS Sample buffer (Life Technologies) with 10mM DTT and boiled for 10 minutes. Proteins were equally loaded on two separate NuPage 4-12% Bis-Tris gels (Life Technologies) in 1X MES buffer (Life Technologies). Proteins were transferred on PVDF membranes (Roche). Membranes were blocked in TBS buffer containing 0.1% Tween-20 (BioShop) and 3% bovine serum albumin (BioShop), and stained for either phospho-specific signal or total protein. Primary antibodies of phospho-specific or total proteins for LAT and ZAP-70 (T Cell Signaling Sampler kit, Cell Signaling Technologies), CD3 ζ clone 6B10.2 (SantaCruz Biotechnology), phospho-specific CD3 ζ (Y142) clone EP265(2)Y (Abcam), MEK1 (BD Transduction Laboratories), and phospho-specific MEK1/2 (S217/221) clone 41G9 (Cell Signaling Technology), were diluted 1:1000 and added to the membranes for overnight incubation at 4°C. Membranes were washed and 1:10000 diluted HRP-labelled secondary antibodies were added for one hour at RT. Membranes were washed and proteins were detected with the Clarity ECL substrate (Bio-Rad) and ImageQuant LAS 4000 imager (GE Healthcare). Quantification of phosphorylation kinetics, the signal obtained from phospho-specific staining was normalized to that of loading signal and the data was then represented as relative ratios compared to time zero.

2.5.9 Immunoprecipitation assay

8 x 10⁶ cells expressing the HA-DR $\alpha\beta$ TM-CD3 $\epsilon\delta$ CT chimera were activated with 50 μ M pervanadate for 10 minutes at 37°C. The activation reaction was stopped with ice-cold lysis buffer as previously described. Cells were allowed to lyse for 30 minutes at 4°C and the supernatant was collected following centrifugation. For the immunoprecipitation assay, the supernatant was pre-

cleared with Dynabeads Protein G (ThermoFisher Scientific) for 30 minutes at 4°C. The beads were removed by centrifugation and the HA-DR $\alpha\beta$ TM-CD3 $\epsilon\delta$ CT chimera was coupled to 2 μ g anti-HLA-DR clone L243 (BioLegend) for 1 hour at 4°C. The HA-DR $\alpha\beta$ TM-CD3 $\epsilon\delta$ CT chimera was pulled down by incubation for 2 hours at 4°C with 0.45 μ g Dynabeads Protein G. For co-immunoprecipitation of the HA-DR $\alpha\beta$ TM-CD3 $\epsilon\delta$ CT chimera or the TCR, 8 x 10⁶ cells were lysed in ice-cold lysis buffer (150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7.5, 50mM NaF, 1mM NaVO₄, 5mM EDTA, 1X protease inhibitor, 1mM iodoacetamide and 1mM PMSF) containing 1% digitonin. Cells were allowed to lyse for 30 minutes at 4°C and were centrifuged at 10,000rpm for 10 minutes. The supernatant was collected and a small amount was used for protein isolation by the methanol-chloroform method (input). The remaining cell lysate was immunoprecipitated by adding 2 μ g of anti-HLA-DR clone L243 (BioLegend) or anti-CD3 clone UCHT1 (BioLegend). The antibodies were incubated for 1 hour at 4°C. 0.45 μ g of Protein G Dynabeads (Thermo Fischer Scientific) were washed in PBS and added to the cell lysate. The beads were incubated for 2 hours at 4°C. For the immunoprecipitation of activated receptors, 4x10⁶ cells were activated for the indicated time points with 2.5 μ g/mL plate-bound anti-CD4 and biotinylated anti-CD3 clone OKT3 (BioLegend) or biotinylated anti-HLA-DR clone L243 (BioLegend). Cells were lysed in ice-cold lysis buffer containing 1% digitonin as previously detailed. The activated DR chimera was pulled-down with 1 μ g biotinylated anti-HLA-DR antibody and the activated TCR was pulled-down with 1 μ g biotinylated anti-CD3 antibody for 1 hour at 4°C. 0.45 μ g of Streptavidin M-280 Protein G Dynabeads (Thermo Fischer Scientific) were washed in PBS and added to the cell lysate. The beads were incubated for 2 hours at 4°C. Following immunoprecipitation, the beads were washed four times with lysis buffer. Beads were resuspended in 2X LDS Sample buffer (Life Technologies) with 10mM DTT and boiled for 10 minutes. The beads were separated by centrifugation in a filtered centrifuge tube. The volume was adjusted to 20 μ L prior to gel loading. Western blotting was performed as previously described with anti-CD3 δ clone EP4426 (Abcam), anti-CD3 ϵ clone M20 (SantaCruz Biotechnology), anti-CD3 ζ , anti-HA clone HA-7 (Sigma-Aldrich) and anti-phosphotyrosine (Cell Signaling Technologies).

2.5.10 RNA extraction and real-time PCR

RNA was extracted using TRIzol (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. The extracted RNA was reverse transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed on cDNA using the Advanced qPCR MasterMix (Wisent) supplemented with ROX Reference Dye (Life Technologies) and a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosciences). Relative mRNA abundance for mouse and human *TMEM16F* over human *GAPDH* were quantified with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. For mouse and human *TMEM16F*, the forward primer was 5' - CCACCAGAAGCCGCATTGT – 3' and reverse primer 5' - GATAAGATCCAAGGGCTGC – 3'. The primers for rescued *TMEM16F* were forward 5' - CACCAGAAGCCGCATTGTTT – 3' and reverse 5' - TGAGCCCATTCTCTGTACAG – 3'. The primers for *GAPDH* were forward 5' – TTGCCATCAATGACCCCTTCA – 3' and reverse 5' – CGCCCCACTTGATTTTGGGA – 3'. For primary OT-I T cells, RNA was extracted after cell sorting using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The extracted RNA was reverse transcribed and the qPCR were performed as previously described. The primers for mouse *Tmem16f* are forward 5' - GCAGCCCTTGGATCTTATCA – 3' and reverse 5' - TGCTGTAGCTCAACGGTGTC – 3'. The primers for the housekeeping gene *Hprt* are forward 5' - TCCTCCTCAGACCGCTTTT – 3' and reverse 5' - CCTGGTTCATCATCGCTAATC – 3'. Relative mRNA abundance of mouse *Tmem16f* over *Hprt* were determined as previously detailed.

2.5.11 High-resolution confocal imaging

Imaging for membrane targeting of TMEM16F was performed in glass bottom culture dishes (MatTek Corporation). Cells were washed in Ringer's solution and mounted on an LSM880 microscope with a Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27 objective. Images were acquired using the Argon 488nm laser line and fluorescence was detected using the super-resolution Airyscan detector using a 505/30nm BP filter. Images were processed for Airyscan deconvolution with the Zen software (Zeiss Microscopy).

2.5.12 Measurement of relative inner leaflet PS content

Imaging for the relative phosphatidylserine content at the inner leaflet of the plasma membrane was performed as previously described in glass bottom culture dishes. Images were

acquired using the Argon 488nm laser line for eGFP and HeNe 561nm laser line for mRFP1. Fluorescence was detected using the super-resolution Airyscan detector using a 505/30nm bandpass filter for eGFP and a 595/40 bandpass filter for mRFP1. Images were processed for Airyscan deconvolution with the Zen software. Membrane fluorescence of eGFP and mRFP1 was quantified in ImageJ/Fiji by generating ROIs around the plasma membrane of the cells. Three ROIs per cell were generated in order to obtain three measurements per cell. For each ROI, the relative PS abundance was obtained by normalizing the fluorescence intensity of mRFP1 over the fluorescence intensity of eGFP. The mRFP1/eGFP ratios obtained from the three ROIs were averaged for every cell quantified. The procedure was repeated for every cell quantified (>50 cells per cell line per experiment). The relative PS abundance (mRFP1/eGFP ratio) was normalized for each cell line over the relative PS abundance of the Ame cell line.

2.5.13 Fluorescence lifetime imaging and FRET efficiency calculations

Microscopy slides were acid-washed with Piranha solution (70% sulfuric acid, 30% hydrogen peroxide) and were mounted in a flow cell. Cells were washed in PBS and were added drop by drop on the microscopy slides. Cells were allowed to adhere to the slide for 5 minutes at RT and Ringer's solution was injected in the flow cell. The flow cell was mounted on an LSM880 microscope with a 63x Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27 objective. The mTFP1 fluorescence at the plasma membrane was observed by excitation with the Argon 458nm laser line and detection at 465-515nm. The plasma membrane mVenus fluorescence was observed by excitation with the Argon 514nm laser and detection at 523-602nm. Fluorescence lifetime was determined by excitation at 840nm with a Chameleon two-photon laser at 2.5% intensity and pulsed at 80 MHz. Photons were acquired with a Becker & Hickl TCSPC module and detected with a filter cube containing 535/30nm and 480/40nm bandpass filters and a 510nm dichroic mirror (Chroma). The photons were accumulated for 30 seconds with a 0.52 μ sec pixel dwell time.

For calcium flux assays, 0.3 μ M or 2 μ M ionomycin diluted in Ringer's solution was injected into the flow cell and cells were activated at RT for 5 minutes prior to imaging. Confocal and FLIM images were acquired as previously described. Data was exported to SPCImage (Becker and Hickl) for analysis of fluorescence lifetime. A dual exponential decay curve fitting and was used to

calculate the membrane mTFP1 fluorescence lifetime, where the second component was fixed at 2250ps. Plasma membrane sections containing more than 10,000 photons (binning of 5) were used for lifetime and FRET calculations. The corresponding membrane sections were quantified for mVenus mean fluorescence intensity using ImageJ.

To determine the FRET efficiency using FLIM, we first measured the basal fluorescence half-life of mTFP1 in the absence of the acceptor fluorophore for each of the cell lines. We then measured the fluorescence half-life of mTFP1 in the presence of PM-Venus in either control conditions or following the indicated ionomycin treatment.

We determine the FRET efficiency (E) as follows:

$$E = (1 - (X_{n(c)-TFP-Venus} / X_{n(c)-TFP})) * 100$$

Where X is the fluorescence half-life measured in the n cell line in either the FRET ($TFP-Venus$) or basal (TFP) setting in either the control or ionomycin conditions (c).

2.5.14 Calcium flux imaging

Wild-type Jurkat cells were washed twice in PBS and then labelled for 15 minutes with Fluo-4 AM (Invitrogen) according to manufacturer's guidelines. Following labeling, cells were washed in PBS and then put in culture in complete RPMI for a minimum of 30 minutes prior to imaging. Flow cell preparation and cell adherence was done as previously described. Following 5 minutes of incubation to allow for cell adhesion, DMSO or 2 μ M ionomycin was injected into the flow chamber using the injection port. Imaging of Fluo-4 fluorescence began 5 seconds prior to injection. Cells were imaged at 5 seconds intervals for 2 minutes using the 488nm Argon laser and images were acquired using spectral detection GaAsP detectors set at a detection window of 505-545nm.

2.5.15 Conjugate formation

For immunological synapse imaging, silicate beads (Bangs Laboratory) were washed in PBS and incubated overnight at 4°C with 6 μ g/mL Streptavidin conjugated to AlexaFluor-647. The beads were washed and incubated with 2 μ g/mL each of biotinylated anti-CD3 clone OKT3 (BioLegend) and anti-CD28 antibodies (Biolegend) for 30 minutes at 4°C. The beads were washed

in PBS, pelleted and added drop by drop on acid-washed microscopy slides in a flow cell. The beads were allowed to adhere to the slides for 5 minutes. Cells were washed in Ringer's solution and were injected into the flow cell. Confocal images were acquired as previously detailed for either eGFP or mTFP1/mVenus. For TMEM16F-eGFP and TMEM16F-Mut-eGFP, cells were imaged for 10 minutes at 30 seconds intervals. For the mTFP1/mVenus radiometric imaging, cells were left to form synapses for 5 minutes prior to imaging. Cells were imaged up to 10 minutes before discarding the flow cell and repeating the experiment with fresh beads and cells. The silicate beads conjugated with AlexaFluor-647 were excited with the 633nm laser line and detected at 641-735nm. Data was analyzed in ImageJ as previously described.

2.5.16 Donor dequenching measurements and calculations

The mean fluorescence intensity (MFI) of mTFP1 and mVenus fluorescence were analyzed in ImageJ by gating ROIs around the membrane section of the synapse and non-synapse area of the cell. ROIs were chosen as such to avoid the presence of intracellular vesicles or membrane folds, which could provide erroneous measurements. The relative ratiometric changes in mTFP1 fluorescence was analyzed by normalizing the ratio of synapse/non-synapse MFI over the 3TFP cell line ratio taking into account possible changes in mTFP1 and mVenus at the plasma membrane independent of membrane dissociation. The mTFP1 normalized relative fold change (NRFC) was calculated as detailed below:

2.5.16.1 mTFP1 Normalized Relative Fold Change (NRFC)

$$\text{TFP NRFC} = x_{\text{TFP NFC}}/a_{3\text{TFP NFC}}$$

Where x defines the cell line (Src, ShT, 3TFP, Ame, WT, or Mut),

and $\text{NFC} = (s_{\text{TFP}}/p_{\text{TFP}})/(s_{\text{Venus}}/p_{\text{Venus}})$; where s defines the fluorescence of indicated fluorophore at the synapse; p defines the fluorescence at the plasma membrane of the same cell. The mVenus signal ratios ($s_{\text{Venus}}/p_{\text{Venus}}$) are used as denominators to correct for potential changes in the distribution of the fluorescent probes within the PM, which could potentially impact simple TFP ratios independent of membrane dissociation.

α 3TFP-NFC defines the average (α) of mTFP1 NFC calculated in the 3TFP reference cell line and is used as denominator to obtain an NRFC of 1 for the 3TFP cell line, while showcasing data variability. Differences in mTFP1 NRFC across the various cell line is therefore indicative of loss of FRET between mTFP1 and mVenus due to membrane dissociation of the CD3 ϵ _{CD}.

2.5.16.2 mVenus relative fold change (RFC)

$$\text{Venus RFC} = \frac{x\text{Venus FC}}{\alpha\text{3TFP } \nu\text{FC}}$$

Where x the cell line (Src, ShT, 3TFP, Ame, WT, or Mut),

and Venus FC = ($s\text{Ven}/p\text{Ven}$); where $s\text{Ven}$: defines Venus fluorescence at the synapse; and $p\text{Ven}$: defines Venus fluorescence at the plasma membrane of the same cell.

α 3TFP ν FC defines the average (α) of Venus FC (ν FC) in the 3TFP reference cell line and is used as denominator to obtain an average of 1 for the 3TFP cell line, while showcasing data variability. This is used to illustrate that there are no gross differences in PM-Venus distribution at the synapse in the various cell lines, which could account for the TFP NRFC across different cell lines.

2.5.17 Statistical analysis

All data are shown as mean \pm SD or SEM as indicated in the legends. Number of samples and experimental repetitions are shown in each figure as n . Statistical significance was analyzed using Prism 7 (GraphPad) and the type of analysis is indicated in figure legends. Statistical significance was considered when $p < 0.05$. Figure legends include the n and p values.

2.6 Results

2.6.1 TMEM16F regulates Ca²⁺-dependent PS redistribution at the plasma membrane

The Nagata group showed that TMEM16F promotes PS exposure in B cell lines following ionomycin treatment [25]. Recent studies provided evidence into its potential role in T cell activation, although the underlying mechanisms have yet to be defined [24]. In order to study the role of TMEM16F in modulating T cell activation, we first determined whether it was the primary calcium-dependent PS scramblase in the Jurkat T cell line. We generated Jurkat cells that express either TMEM16F-specific (ShT) or scrambled (Scr) shRNAs via lentiviral transduction (**Fig. 1A**). ShT cells displayed a small but significant reduction in steady-state PS exposure, but had no change in cell viability (**Fig. 1, B and C**). Reduction in TMEM16F abundance led to a complete inhibition of PS surface exposure following ionomycin treatment, but had no impact on calcium flux (**Fig. 1, D and E**). Similar observations were made in mouse OT-I cells transduced to target or not TMEM16F using shRNAs validating the role of TMEM16F in Ca²⁺-dependent PS scrambling in T cells (**fig. S1, A to C**).

To validate that lack of PS exposure following ionomycin treatment was specifically linked to reduced TMEM16F expression and not due to a non-specific effect of shRNA activity, we performed a rescue experiment with codon-swapped, GFP-tagged murine TMEM16F. Rescuing TMEM16F expression fully recovered PS exposure upon ionomycin treatment (**Fig. 1D**). Moreover, expression of TMEM16F-GFP did not alter the overall phenotype of Jurkat cells as observed by TCR surface expression (**fig. S1D**). Rescued cells displayed increased amounts of PS redistribution following ionomycin treatment (**Fig. 1D**). To determine whether this was due to an increase in overall TMEM16F expression, we determined the abundance of total TMEM16F mRNAs using qPCR (mouse and human). Our data indicate that the rescue cell line express a ~6-fold increase in total TMEM16F mRNA, linking enhanced PS redistribution following calcium flux to increased TMEM16F expression, although no linear correlation could be made (**fig. S1E**).

Due to discrepancies in subcellular localization of TMEM16F between a study in T cells in comparison to studies performed in other cell types, we next determined the subcellular localization of GFP-tagged TMEM16F using confocal microscopy [24]. Confocal image analyses showed that TMEM16F-GFP was primarily localized at the PM in resting Jurkat cells to the same extent as PM-targeted GFP (consisting of amino acids 1 through 10 of Lck fused to GFP through a GSS linker) as observed in previous non-T cell studies (**Fig. 1F and fig. S1F**) [17, 25, 26]. Due to the rescue ability of the GFP-tagged TMEM16F used in these experiments, we are confident in its PM localization in our model. Next, in order to assess its potential role in mediating TCR signaling, we assessed the subcellular localization of TMEM16F during immunological synapse formation using silicate beads coated with Alexa-647-labeled streptavidin (SA647) and biotinylated anti-CD3 ϵ /CD28. TMEM16F was observed at the immunological synapse (**Fig. 1, G and H, and fig. S1G**). Taken together, our results corroborate previous findings that identify TMEM16F as the major PS scramblase in T cells and suggest that it might play a role in controlling TCR signaling at the immunological synapse.

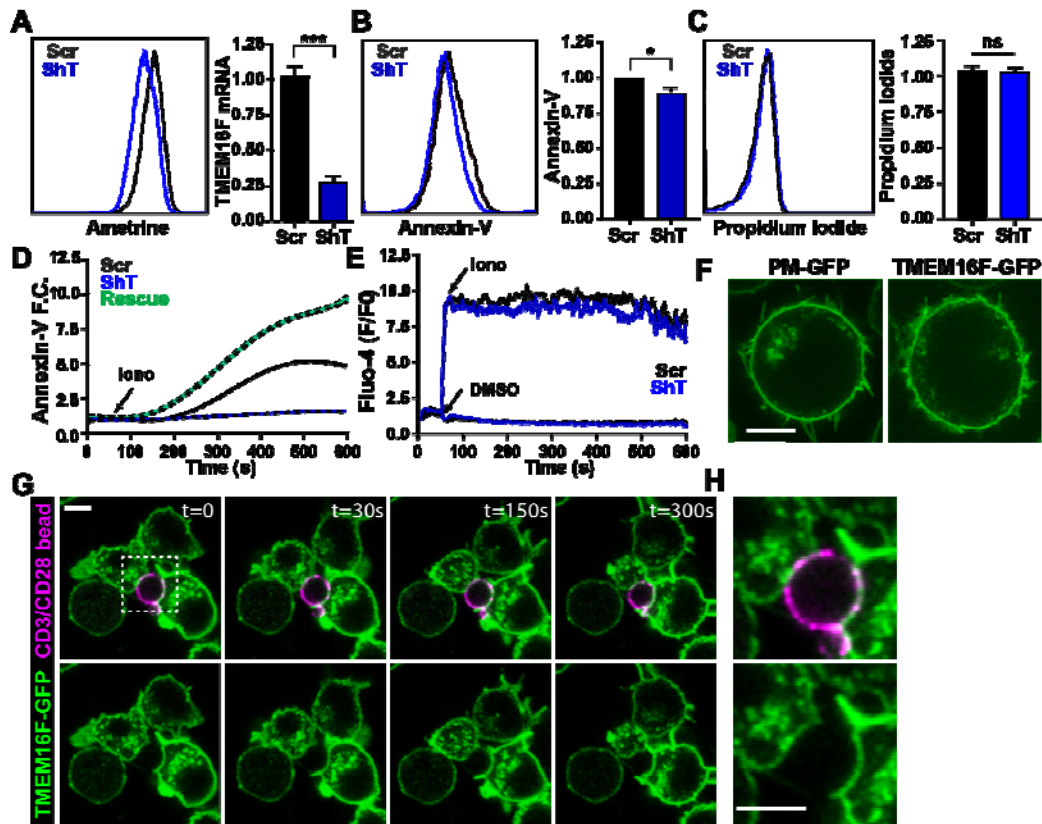


Figure 1. – Knockdown of endogenous TMEM16F in Jurkat T cells abrogates Ca²⁺-dependent phosphatidylserine redistribution at the plasma membrane.

(A) FACS analyses for Ametrine expression and purity of sorted Jurkat cell lines expressing Scrambled (Scr) or TMEM16F-targeting (ShT) shRNAs (left). Relative *TMEM16F* mRNA expression in Scr and ShT cells by qPCR is shown right. **(B)** FACS analyses and quantification (left and right respectively) for surface PS exposure (Annexin-V) of Scr and ShT cell lines. Data presented as relative to Scr cells. **(C)** FACS analyses and quantification (left and right respectively) for cell viability (Propidium iodide) of Scr and ShT cell lines. Data presented as relative to Scr cells. **(D)** Real-time PS exposure following DMSO or 2 μ M ionomycin treatment of Scr, ShT and TMEM16F-GFP rescue (Rescue) cell lines. Results presented as Annexin-V labeling fold change (F.C.) over T=0 seconds and normalized over DMSO stimulation. Dotted lines indicate 95% confidence interval. **(E)** Real-time calcium influx fold change (F/F₀) as measured by Fluo-4 labeling following DMSO or 2 μ M ionomycin stimulation of Scr and ShT cell lines. **(F)** Confocal images of PM-targeted GFP and TMEM16F-GFP (left and right respectively) expressing Jurkat cells. Scale bars represent 5 μ m. **(G)** Real-time confocal imaging of TMEM16F-GFP expressing Jurkat cells during immunological synapse formation using silicate beads coated with biotinylated anti-CD3 ϵ /CD28 and Alexa-647-labeled streptavidin (SA647). Scale bars represent 5 μ m, and time stamps (t) are in seconds. **(H)** High magnification image of ROI depicted in G. Scale bars represent 5 μ m. All experiments are representative of a minimum of three independent experiments. Images are representative of > 30 cells/synapses. Statistical significance was analyzed using unpaired two-tailed Student's t test. All data presented as mean \pm SEM. *P* values: *** *p* < 0.001; * *p* < 0.05; ns.: non-significant.

2.6.2 Ca²⁺-dependent PS redistribution modulates bystander CD3 ϵ _{CD} membrane binding dynamics at the plasma membrane

In previous studies, ORAI1-dependent Ca²⁺ entry into cells following TCR stimulation was shown to occur at the immunological synapse [19, 27]. Because of this, it was proposed that calcium flux from the synapse would lead to a transient but high local concentration of Ca²⁺, which could enable the dissociation of CD3 ϵ _{CD} from the PM by competing for the negatively charged phospholipids [19]. However, with the demonstration that the TMEM16F scramblase activity is stimulated by elevated Ca²⁺, we hypothesized that CD3 ϵ _{CD} dissociation from the PM may require both charge competition and PS redistribution in order to dissociate during immune synapse formation. To test this, we first developed and validated a new Fluorescence resonance energy transfer (FRET) approach, based on our previously published work, which made use of a chimeric KIR2DL3 protein fused to TFP (KIR-TFP) as donor, and the PM labeling dye R18 as the acceptor [13, 21]. Although useful for studying CD3 ϵ _{CD} membrane binding dynamics during TCR triggering and ionomycin treatment, this approach did not easily lend itself to immunological synapse analyses [17, 28]. To overcome this, we setup a new random proximity FRET assay between the KIR-TFP proteins, and a plasma membrane targeted mVenus (PM-Venus) by fusing it to the N-terminal domain of Lck consisting of amino acids 1 through 10 as done previously (**fig. S2A**) [17]. To do so, we first created a clonal cell line expressing PM-Venus. Next, we built a 'membrane association ladder' comprised of a 3 (3-TFP) or a 50 (50-TFP) amino acid long linker between the TM domain of the KIR fusion receptor and the TFP moiety, which mimic the PM-bound and unbound states of CD3 ϵ _{CD} respectively (**fig. S2A**) [13]. We generated KIR-TFP cell lines using a highly restrictive gating strategy so that TFP and Venus expression were identical across cell lines (**fig. S2B**). This is a critical aspect of this approach because random proximity FRET follows a linear correlation between local concentrations of both donor and acceptor molecules for FRET efficiency [29].

To determine the FRET range between the 3-TFP or 50-TFP and PM-mVenus we performed Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) analyses using Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) [30] (**Fig. 2A**). We measured a mean fluorescence half-life of 2.22 (\pm 0.01) nanoseconds (ns) for 3-TFP and 50-TFP in the absence of the acceptor PM-Venus, consistent with

the reported fluorescent half-life of this protein [17]. Co-expression of 3-TFP and PM-Venus (3FRET) reduced TFP half-life significantly (FRET efficiency of $11.71 \pm 1.33\%$) (**Fig. 2, B and C**). Comparatively, co-expression of 50-TFP and PM-Venus (50FRET) resulted in a smaller reduction in fluorescence lifetime indicating a greater distance between the TFP moiety and the PM-targeted Venus (FRET efficiency of $5.3 \pm 1.025\%$). Differences in FRET efficiencies were also visualized by changes in the fluorescent decay profiles due to energy transfer from donor fluorophores with longer half-lives to acceptor fluorophores leading to the generation of multi-component fluorescence decay curves (**Fig. 2D**) [31]. As expected from random proximity FRET assays, FRET efficiencies between TFP and Venus displayed a linear correlation according to fluorescence intensities of plasma membrane-targeted Venus (**fig. S2C**). Together, these results show the sensitivity and robustness of our approach and its ability to measure PM proximity of the C-terminally tagged portion of cytoplasmic domains in live cells.

Next, we analyzed the effects of TMEM16F inhibition on CD3 ϵ_{CD} PM binding dynamics following robust calcium flux. We first generated a FRET cell line expressing TFP-tagged CD3 ϵ_{CD} fused to KIR2DL3 (KCD3E-TFP) and PM-Venus as described above (**fig. S2D**). We subsequently used this cell line (CD3-FRET) to generate two additional cell lines that express (Scr) or not (ShT) TMEM16F (**fig. S2, D and E**) [32]. Stable co-expression of all the components did not change the inhibition of PS redistribution in ShT cells (**fig. S2F**). To monitor CD3 ϵ_{CD} membrane binding to the PM following robust Ca²⁺ flux, we first determined the time at which cells mobilized Ca²⁺ following ionomycin injection into the imaging flow chamber. To do so, we labeled WT Jurkat cells with the calcium indicator Fluo-4 and treated the cells with 2 μ M ionomycin or DMSO control using the injection port in the flow cell, and then monitored Ca²⁺ entry by imaging Fluo-4 fluorescence intensities using confocal microscopy (**fig. S2G**). Using this approach, we determined that maximum Ca²⁺ entry occurred within 50 seconds of ionomycin injection using our microscopy setup (**fig. S2H**). With this, we determined that imaging membrane binding dynamics of the CD3-FRET cell lines should be done at a minimum of 6 minutes following ionomycin injection to enable TMEM16F-dependent PS scrambling. This is based on observations made in our previous FACS analyses where we observed maximal PS redistribution at 5 minutes after ionomycin treatment, but where calcium flux was instantaneous (**Fig. 1, D and E**).

We next measured the effects of TMEM16F inhibition on CD3 ϵ _{CD} electrostatic PM binding following robust Ca²⁺ influx following ionomycin treatment (**Fig. 2E**). In control conditions (ctrl), Scr and ShT cells expressing the FRET reporters displayed similar fluorescence half-life and FRET efficiencies ($E = 11.3 \pm 1.89\%$ and $11.34 \pm 1.72\%$ respectively) as the 3FRET cells indicating efficient PM binding of CD3 ϵ _{CD} (**Fig. 2, F and G**). Ionomycin treatment lead to a significant increase in fluorescence half-life and reduction in FRET efficiency in Scr cells ($E = 5.3, \pm 0.96\%$), but not ShT cells ($E = 11.25 \pm 1.72\%$), indicative of PM dissociation of CD3 ϵ _{CD} only in Scr cells (**Fig. 2, F and G**). Changes in fluorescence lifetime could be observed across all levels of PM-Venus fluorescence intensities at the PM, as expected from such an assay (**Fig. 2H**). Changes in FRET efficiency in the fluorescence photon counting profiles and calculated decay curves of TFP were also observed in Scr, but not ShT cells (**fig. S2I**). As expected, we observed no significant changes in FRET efficiencies for the 3FRET and 50FRET cell lines following ionomycin treatment due to lack of electrostatic interactions of the KIR-3TFP and KIR-50TFP reporters with the PM (**fig. S2, J and K**). These results demonstrate that CD3 ϵ _{CD} dissociation from the plasma membrane is not solely dependent on Ca²⁺ mobilization and/or charge neutralization, but requires the expression and PS scrambling activity of TMEM16F.

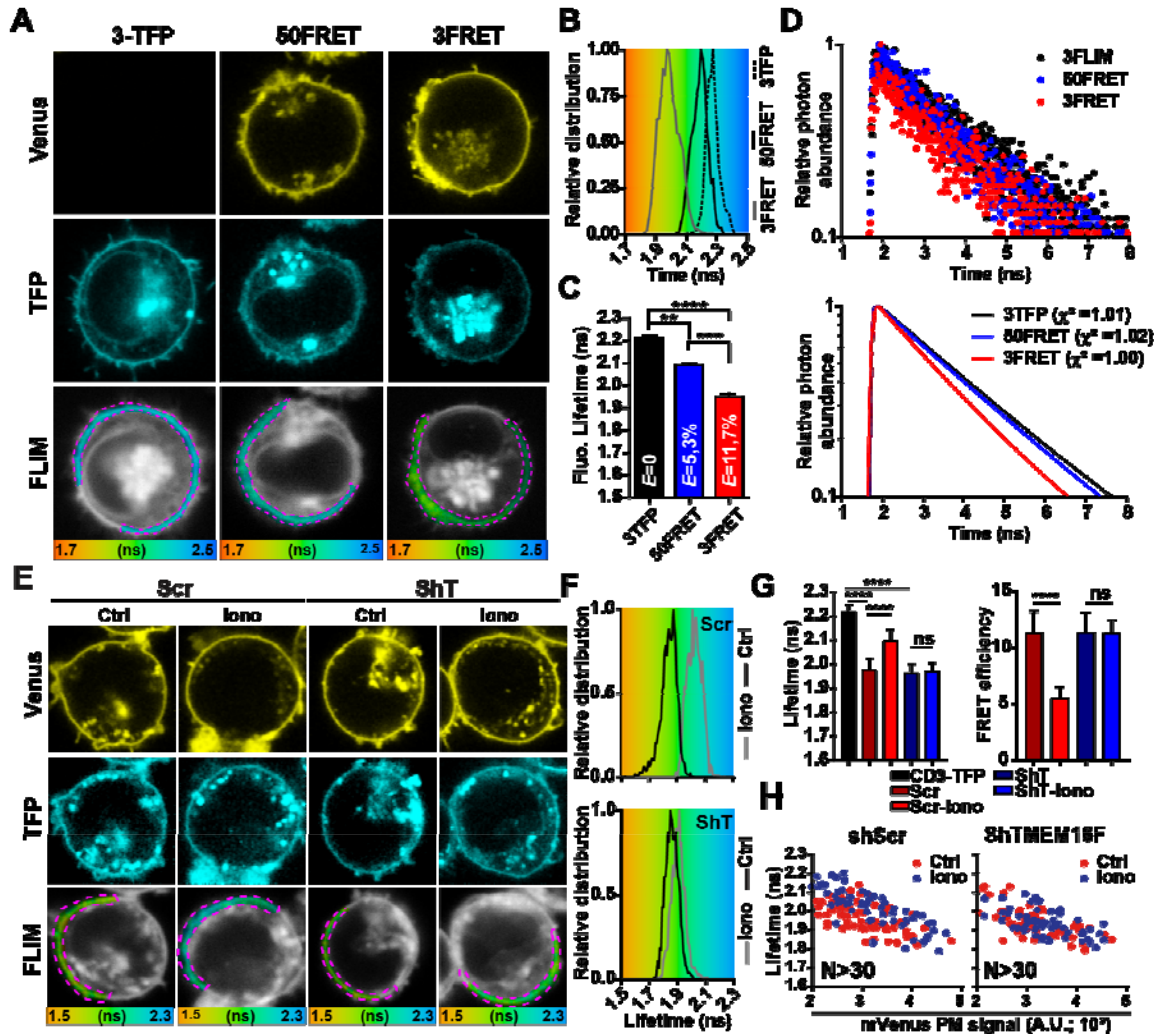


Figure 2. – Elevated intracellular Ca^{2+} is not sufficient to induce CD3 ϵ dissociation from the plasma membrane.

(A) Confocal and FLIM images of Jurkat cells expressing 3TFP only, 3-TFP/PM-Venus (3FRET), or 50-TFP/PM-Venus (50FRET). Scale bars represent 5 μm . FLIM images are presented as color-coded fluorescence lifetime within the ROIs as depicted in B. **(B)** Relative distribution of TFP fluorescence lifetime analyzed at the plasma membrane from ROIs drawn in panel A. **(C)** Mean TFP fluorescence lifetime in picoseconds (ps) quantified at the plasma membrane from populations of cells from the different FRET cell lines. Data presented as mean \pm SEM. **(D)** Time correlated photon counts from pixels at the PM for the different FRET cell lines shown at the top. Fitted fluorescence decays curves for the different FRET cell lines (bottom). Calculated χ^2 values are

shown to illustrate the quality of fitted curves. A minimum of 10,000 photons were cumulated per binned pixel to obtain decay values. **(E)** Confocal and FLIM images of Scr and SHT Jurkat cell lines expressing the KCD3E-TFP/PM-Venus FRET probes untreated (Ctrl) or treated with 2 μ M ionomycin (Untreated: Ctrl, Ionomycin: Iono). Scale bars represent 5 μ m. FLIM images are presented as color-coded fluorescence lifetime within the ROIs. **(F)** Relative distribution of TFP fluorescence lifetime analyzed at the plasma membrane of the Scr and SHT (top and bottom respectively) cell lines according to treatment (control: ctrl; ionomycin: iono) from ROIs drawn in panel F. **(G)** Mean fluorescence half-life and FRET efficiency (left and right respectively) of indicated FRET reporter cell lines with or without ionomycin treatment. Data presented as mean \pm SD. **(H)** Correlation between TFP fluorescence lifetime and PM-Venus fluorescence intensity of cells from the different FRET cells lines and indicated treatment condition (>50 cells per condition). Data presented for each individual cells used to generate graphs in H. All experiments are representative of a minimum of three independent experiments. Images are representative of > 50 cells. Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. *P* vales: **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, ns: non-significant.

2.6.3 Inhibition of PS redistribution hinders bystander CD3 ϵ _{CD}-PM dissociation at the synapse and reduces TCR signaling.

From these results, we hypothesized that high local concentrations of Ca²⁺ at the synapse could engage TMEM16F scrambling activity to promote bystander CD3 ϵ _{CD}-PM dissociation. Indeed, a general reduction in PS content had been observed at the synapse in our previous studies [17]. To test this, we used the aforementioned FRET approach, but mutated the functional tyrosines within the ITAM of the KIR-CD3E-TFP construct to phenylalanines (KCD3FF) in order to monitor PM binding in a phosphorylation-independent manner as addition of phosphates introduces negative charges to the CD3 ϵ _{CD}, which would result in electrostatic repulsion of the PM [17, 19]. Moreover, the use of the KCD3FF construct is an ideal proxy to monitor the PM-binding potential of bystander TCR-CD3 ϵ _{CD}, as triggering of the TCR does not physically engage the reporter. We initiated synapse formation by using anti-CD3/CD28-coated silicate beads, and imaged the cells by confocal microscopy as done previously (**Fig. 3A**). However, rather than using FLIM, which requires 30-40 seconds of acquisition and is therefore not optimal for fast-occurring events such

as immune synapse formation, we monitored donor dequenching as a method to study bystander CD3 ϵ_{CD} binding dynamics [17]. In this approach, the dissociation of CD3 ϵ_{CD} from the PM results in an increase in fluorescence emission of the donor due to a decrease in FRET efficiency between the donor and acceptor (**fig. S3A**) [17]. In order to control for potential changes in local concentration of either fluorophores during synapse formation, which would result in non-dissociation changes in dequenching efficiencies, we included the 3-TFP cell line as reference. To calculate the FRET change due to PM dissociation of bystander CD3 ϵ_{CD} , we measured TFP signals at the synapse and non-synapse portion of the plasma membrane, and normalized these values to changes in Venus expression at the same sites (**Fig. 3A**, red and magenta ROIs respectively). We then compared the dequenching values of the various KCD3FF cell lines (Scr and ShT) to those obtained from the 3TFP cells line to obtain the TFP Normalized Relative Fold Change (NRFC). Using this approach, we observed a significant increase in TFP NRFC in Scr cells when compared to 3-TFP cells indicating PM dissociation of bystander CD3 ϵ_{CD} (**Fig. 3, A and B, and fig S3B**). Strikingly, we did not observe significant changes in TFP NRFC in ShT cells when compared to 3-TFP cells indicating a lack of membrane dissociation of bystander CD3 ϵ_{CD} at the synapse. Expectedly, we observed no differences in PM-Venus relative fold change (RFC) within the different cell lines (**Fig. 3B**, lower panel). These results indicate that even in the presence of high local Ca²⁺ concentration, provided by the physiological setting of the immunological synapse, bystander CD3 ϵ_{CD} dissociation is dependent on the expression and activity of TMEM16F.

Because of this, we then determined the effects of the absence of TMEM16F, and by extension the inability to redistribute PS, on early TCR signaling. We reasoned that reduced PM dissociation of bystander TCR-CD3 ϵ_{CD} by way of TMEM16F absence may ultimately affect TCR-dependent signal amplification similar to that observed by Shi *et al.*, using Ca²⁺-deficient activating conditions [19]. Therefore, we performed a phospho-kinetic study on Scr and ShT cells by stimulating the cells with suboptimal concentrations of plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml) and CD28 (1 μ g/ml) or PHA (10 μ g/ml), where not all TCR are directly triggered within the timeframe of the experiment. To look at early signaling steps, we probed for phosphorylated CD3 ζ , ZAP-70 and LAT by Western blotting (**Fig. 3C, and fig. S3C**). A significant decrease in phosphorylation of all the early components of TCR signaling was observed in ShT cells as compared to Scr cells, and were similar

to those observed in the Shi study [19]. These results indicate that the PS scrambling activity by TMEM16F was involved in TCR signaling by potentially enabling bystander TCRs to participate in signal amplification by reducing the PM binding of CD3 ϵ _{CD} and CD3 ζ _{CD} (Fig. 3D, and fig. S3D).

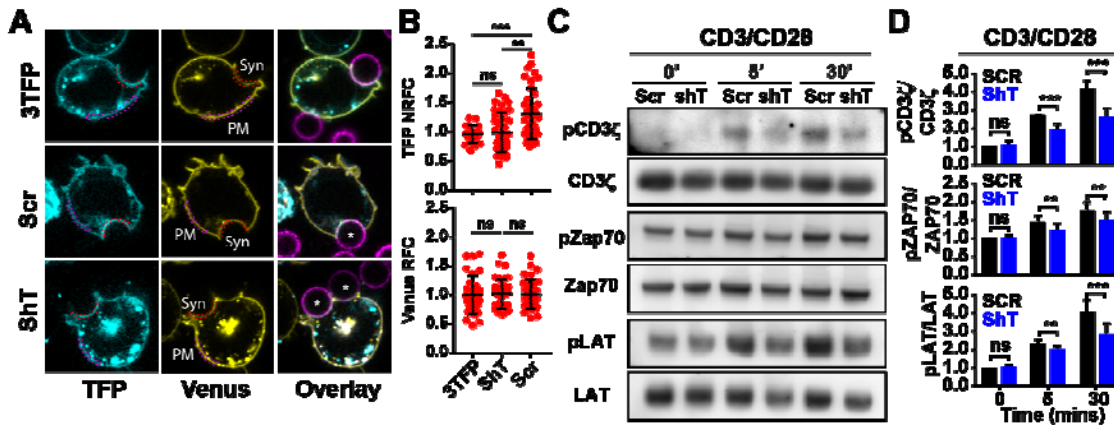


Figure 3. – Bystander CD3 ϵ dissociation and signal amplification following TCR crosslinking is TMEM16F-dependent.

(A) Confocal images of Scr and ShT Jurkat cells expressing the PM-Venus (Venus) and KCD3FF (TFP) FRET probes during immunological synapse formation using silicate beads coated with biotinylated anti-CD3 ϵ /CD28 and Alexa-647-labeled streptavidin (magenta). The synapse (Syn, red ROI) and non-synapse (PM, magenta ROI) sections were used for quantification. **(B)** Normalized relative fluorescence fold change (NRFC) for TFP and relative fluorescence fold change (RFC) of Venus (top and bottom respectively) from cells as displayed in panel A. Data presented as individual quantification and mean \pm SD. Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. **(C)** Western blots of TCR-proximal signaling of Scr and ShT cells following stimulation with 1 μ g/mL plate-bound anti-CD3 ϵ and anti-CD28 for the indicated time points using phospho-specific (p) and loading control antibodies as indicated. Image representative of 4 separate experiments. **(D)** Phospho-kinetic analyses of Scr and ShT cells from Western blots presented in C performed using ImageJ. Data are represented as fold change over the non-activated Scr control (0 min). Data presented as mean \pm SD. Statistical significance was analyzed using two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. All

experiments are representative of a minimum of three separate experiments. Images are representative of > 30 cells. All data presented as mean \pm SEM. *P* values: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, ns: non-significant.

2.6.4 TMEM16F enables bystander TCR engagement in signaling and promotes T cell activation.

To determine whether TMEM16F activity did indeed enable bystander TCR participation in signaling during the early stages of T cell activation, we built a novel hemi-TCR comprised of the HLA-DR2 scaffold and CD3 ϵ and δ cytoplasmic domains (**fig. S4A**). We developed such a construct because the available HA-KIR-CD3 ϵ did not lead to cell activation following receptor cross-linking using anti-HA in the presence or absence of anti-CD4 (**fig. S4, A and B**). This is either due to the nature of this receptor as it is expressed as a single chain, whereas all ITAM-bearing receptors are typically expressed as dimers, or that the positioning of the HA tag did not lead receptor cross-linking [33]. We chose the HLA-DR scaffold because it provided a heterodimeric architecture with which to recapitulate the topology and assembly of the CD3 ϵ/δ heterodimer outside the context of the TCR (**fig. S4A**). The HLA-DR/CD3 ϵ - δ chimeric receptor (DR $\epsilon\delta$) also contained an extracellular HA tag and was co-expressed with the invariant chain (mCherry) to allow proper maturation and surface expression in Jurkat cells (**fig. S4C**) [34]. We validated the phosphorylation potential of both CD3 ϵ and δ cytoplasmic domains by stimulating the cell with 50 μ M pervanadate and immunoprecipitating the assembled DR $\epsilon\delta$ using anti-DR (**fig. S4D**).

We then determined the activating potential of this receptor and its ability to engage bystander TCR. We stimulated the DR $\epsilon\delta$ cells with either plate-bound anti-DR alone or in combination with anti-CD4. We assessed surface CD69 and TCR surface expression as readouts for T cell activation and bystander TCR participation where a reduction in TCR surface expression is indicative of engagement in signaling, thereby causing its internalization. We reasoned that accumulating the CD4-Lck complex at the cell/substrate interface by way of antibody targeting would yield a similar outcome to MHC-directed recruitment of CD4 at the synapse. Indeed, previous work from the Gascoigne group highlighted the necessity of accumulating the CD8-Lck complex at the immunological synapse to properly engage bystander TCRs through non-cognate

pMHCs [12]. As positive control, and in order to assess maximal T cell activation, we included an anti-CD3/CD4 condition. Stimulation with anti-DR (1 μ g/ml) resulted in minimal activation of the DR $\epsilon\delta$ cells and failed to induce bystander TCR engagement as observed by the low frequency in CD69⁺ cells and the lack of TCR internalization (**fig. S4, E and F**). Addition of anti-CD4 (1 μ g/ml) in the stimulating conditions resulted in a significant increase in the frequency of CD69⁺ cells as well as a marked reduction in TCR surface expression suggesting its participation in signaling (**fig. S4, E and F**). As expected, stimulation with anti-CD3/CD4 yielded the highest frequency of CD69⁺ cells and near complete TCR internalization. In contrast, WT Jurkat cells failed to express CD69 and internalize bystander TCRs following stimulation with anti-DR/CD4 validating the specificity of our assay (**fig. S4G**).

Although TCR internalization is a good proxy to assess its participation in signaling, it may also be due to other uncharacterized events occurring during the 16-20hr incubation. Also, the increase in the frequency of CD69⁺ following DR/CD4 stimulation may solely be due to the local accumulation of Lck, which would lead to an increase in DR $\epsilon\delta$ -driven activating signals independent of bystander TCR participation. First, we determined the internalization kinetics of bystander and antibody-targeted receptors by stimulating the DR $\epsilon\delta$ cells with anti-DR/CD4 or anti-CD3/CD4 and probing for surface TCR and DR abundance during the first hour following stimulation (**Fig. 4A**). Following anti-DR/CD4 stimulation, we observed a significant internalization of DR $\epsilon\delta$ within minutes as expected. Remarkably, we also observed an equally rapid and significant internalization of surface TCR resulting in a ~50% reduction within 45 minutes. Stimulation with anti-CD3/CD4 resulted near complete internalization of TCR, while bystander DR internalization also occurred but was transient and greatly reduced as compared to which was observed for bystander TCR. These results showcase the rapid engagement of bystander TCRs in signaling following DR/CD4 stimulation. However, there is a possibility that rapid internalization of bystander TCR following anti-DR/CD4 stimulation is due to the presence of DR $\epsilon\delta$ and TCRs within preformed protein clusters. To test this, we performed co-IP experiments using either the DR $\epsilon\delta$ or TCR as bait and probed for the presence of TCR-CD3 chains. We could not detect the presence of preformed DR/TCR complexes in resting cells, nor after activating the cells with either

anti-DR/CD4 or anti-CD3/CD4 indicating that the internalization of bystander TCR or DR $\epsilon\delta$ receptors was not the result of preformed complexes (**Fig. 4B, and fig. S4H**).

Another possibility to explain rapid bystander TCR internalization is that TCRs are passively co-internalized with DR $\epsilon\delta$ following stimulation due to massive membrane remodeling and vesicle formation. It was shown that TCRs form microclusters and become internalized after receptor cross-linking or pMHC binding in the absence of signaling [35-37]. We reasoned that if bystander TCRs were passively co-internalized with DR $\epsilon\delta$ when stimulated with anti-DR/CD4, then we should observe a reduction in surface abundance of TCR due to co-internalization with DR $\epsilon\delta$ in the absence of signaling. However, TCR internalization following anti-DR/CD4 stimulation was completely abrogated when cells were pre-treated with src-kinase inhibitors PP1 and PP2, while it was not altered when cells were stimulated with anti-CD3/CD4 (**Fig. 4C**). Similarly, bystander DR $\epsilon\delta$ internalization was completely inhibited by PP1 and PP2 treatment following anti-CD3/CD4 stimulation, while it continued to be internalized following anti-DR/CD4 stimulation albeit decreased (**fig. S4I**). These results demonstrate that bystander TCR internalization does not occur through passive co-internalization and requires active signaling, which corroborates previous findings using a comparable model by the Alarcon group [35]. Conversely, similar to previous findings made by the same group, we could not directly measure changes in phosphorylation of bystander TCR-CD3 chains following anti-DR/CD4 stimulation. This, may due to the slow or transient signaling kinetics of bystander TCRs as compared to pMHC- or antibody-triggered TCRs leading to only a minimal fraction of TCRs phosphorylated at any time point (**Fig. 4A, left panel**).

We next addressed whether bystander TCRs do indeed participate in signaling and account for the increase in CD69⁺ DR $\epsilon\delta$ cells when stimulated with anti-DR/CD4. To do so we knocked down TCR expression in the DR $\epsilon\delta$ cells using TRAC-directed shRNAs, which resulted in 83% reduction of TCR surface abundance, while DR $\epsilon\delta$ was unaltered (**Fig. 4D, and fig. S4J**). We then compared CD69 expression in TCR sufficient (Scr) or depleted (ShTCR) DR $\epsilon\delta$ cell lines after stimulation with anti-DR alone or in combination with anti-CD4 (**Fig. 4E**). We confirmed that the ShTCR cell line did not have a general defect in inducing CD69 expression by stimulating the cells with PMA/Ionomycin. TCR depleted cells displayed a significant reduction in the expression of the activation marker

CD69 following anti-DR/CD4 stimulation indicating a role for bystander TCRs in enhancing DR $\epsilon\delta$ -directed signaling, while no differences were observed following PMA stimulation (Fig. 4F).

Finally, we assessed the role of TMEM16F in enabling the engagement of bystander TCR using the DR $\epsilon\delta$ cell line. To do so, we generated stable DR $\epsilon\delta$ cell lines that expressed TMEM16F (Scr) or not (ShT) and monitored CD69 and TCR surface expression following stimulation or left untreated (UT) (Fig. 4G). Following stimulation with either anti-DR alone or anti-DR/CD4, ShT cells displayed a significant decrease in the frequency of CD69⁺ cells as well as bystander TCR internalization illustrating a reduction in T cell activation through bystander TCR engagement as compared to Scr cells (Fig. 4H, and fig. S4K). Remarkably, the reductions in the frequency of CD69⁺ ShT cells were nearly identical to those observed in TCR-depleted cells, illustrating the TMEM16F-dependent participation of bystander TCR in signal amplification. As expected, the strong activating signals provided by anti-CD3/CD4 did not yield any difference between Scr and ShT cells, suggesting that the signal amplification provided by TMEM16F was more readily observable in low-grade stimulation (Fig. 4H).

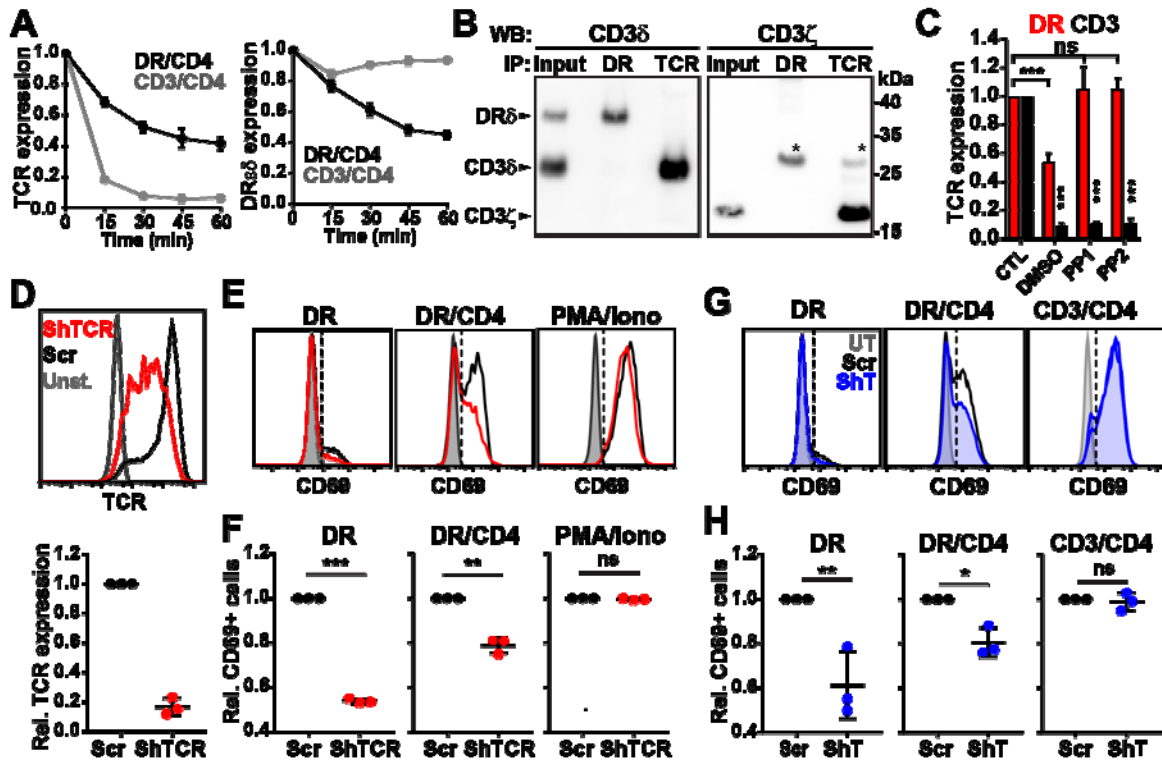


Figure 4. – TMEM16F is required for bystander TCR activation.

(A) DR $\epsilon\delta$ -li expressing Jurkat cells were stimulated with plate-bound anti-DR/CD4 or CD3/CD4 (2.5 μ g/mL) and surface bystander V β 8-TCR and DR (left and right respectively) expression was analyzed at the different indicated time points using flow cytometry. Data presented as relative surface expression compared to unstimulated cells, and are representative of three separate experiments. **(B)** DR $\epsilon\delta$ -li expressing Jurkat cells were lysed and DR $\epsilon\delta$ (DR) or TCR were immunoprecipitated in non-denaturing conditions. Components of DR $\epsilon\delta$ and TCR (CD3 δ and CD3 ζ) were then probed by Western blot. Asterisk identifies non-specific bands related to the antibody light chains used during immunoprecipitation. **(C)** DR $\epsilon\delta$ expressing Jurkats were pre-incubated for 1 hour with either 20 μ M PP1, 20 μ M PP2, or DMSO and then stimulated in these conditions with 2.5 μ g/ml plate-bound anti-CD3/CD4 (CD3), anti-DR/CD4 (DR) or left unstimulated (CTL). Surface TCR expression was measured by flow cytometry 45 minutes after stimulation. Data presented as relative expression compared to DMSO-treated but unstimulated cells (CTL). **(D)** DR $\epsilon\delta$ -li expressing Jurkat cells were transduced at low MOI with a shRNA against TCR α (red) or scrambled shRNA (shown in black) and surface V β 8-TCR expression was analyzed by flow cytometry. TCR expression of shTCR cells relative to Scr cells is shown in the bottom panel. **(E)** Cells were stimulated overnight with 1 μ g/mL plate-bound anti-DR, anti-DR/CD4 or with PMA/ionomycin and surface CD69 expression was analyzed by flow cytometry. Unstimulated cells are shown in gray, Scr in black, and ShTCR in red. **(F)** Relative frequency of CD69-positive ShTCR cells following indicated stimulation conditions relative to Scr cells. **(G)** Scr and ShT cells expressing DR $\epsilon\delta$ -li were stimulated overnight with 1 μ g/mL plate-bound anti-DR, anti-DR/CD4 or anti-CD3/CD4 and surface CD69 expression was analyzed by flow cytometry. Unstimulated cells (UT) are shown in gray, Scr in black and ShT in blue. **(H)** Relative frequency of CD69-positive ShT cells following indicated stimulation conditions relative to Scr cells. All experiments are representative of a minimum of three independent experiments. Statistical significance was analyzed using unpaired two-tailed Student's t test. All data presented as mean \pm SD. *P* values: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; ns: non-significant.

2.6.5 Facilitation of Ca²⁺-dependent PS redistribution enhances CD3ε_{CD} dissociation.

With the finding that inhibiting Ca²⁺-dependent PS redistribution had deleterious effect on T cell activation and bystander TCR engagement in signaling, we then asked whether enhancing TMEM16F activity would have the opposite effect. The Nagata group identified a mutant form of TMEM16F, which causes constitutive surface exposure of PS in a B cell line [38]. To determine the effects of constitutive PS redistribution by the mutant as well as determine the effects of TMEM16F overexpression on T cell activation with regards to spontaneous TCR signaling and signal amplification, we generated Jurkat cell lines that expressed the wild-type long isoform (TM) or mutant (Mut) TMEM16F as P2A fusion proteins with mAmetrine (**fig. S5A**). As control, we used cells expressing mAmetrine only (Ame). There was no difference of surface-exposed PS abundance in Ame and TM cells at resting state indicating that TMEM16F overexpression did not affect homeostatic PS distribution, while Mut cells displayed a significant increase (2.8 fold) (**Fig. 5A**). Taking into consideration that ionomycin treatment scrambles PS evenly across both leaflets (50%) resulting in an 8.9 fold increase in PS exposure, we estimate that expression of mutant TMEM16F constitutively redistributes approximately 15.7% of the inner leaflet PS to the extracellular leaflet. Surprisingly, despite constitutive PS redistribution to the outer leaflet of the PM, Mut cells did not show any changes in TCR and CD69 surface expression suggesting the lack of spontaneous dissociation and signaling of the CD3ε and ζ chains (**fig. S5B**). As described for BaF3 cells, mutant TMEM16F-expressing Jurkat cells shared the same phenotypical traits as Ame and WT cells in regards to cell viability [38].

One possibility is that Mut cells compensate for constitutive PS redistribution by increasing total cellular PS content. To test for this, we performed Annexin-V staining on fixed and permeabilized cells. With this approach, we saw no differences in total PS content in Mut cells when compared to Ame and TM cells suggesting that indeed Mut cells possessed less PS within the inner leaflet of the PM (**Fig. 5B**). We validated this by monitoring inner leaflet PS content using the well-described Lact-C2-mRFP probe [39]. Relative inner leaflet PS content was determined by first normalizing the Lact-C2-RFP signal to that of PM-GFP (expressed as polycistronic mRNA using an IRES) and then comparing these ratios across the various cell lines with Ame cells as reference

(**fig. S5, C to E**). Using this approach we measured an overall decrease of 11.5% in inner leaflet PS content, corroborating with previous estimates (**fig. S5F**). In addition, we determined whether the constitutive ability of mutant TMEM16F to expose PS at the surface was dependent on basal intracellular Ca^{2+} concentrations. Pre-treatment with BAPTA abrogated constitutive PS exposure showing that the mutant retained its Ca^{2+} dependency for PS redistribution, but also suggesting that it was more sensitive to Ca^{2+} for engaging its PS scrambling activity (**Fig. S5G**). Finally, we performed microscopy analyses to determine the subcellular localization of mutant TMEM16F. Similar to WT, GFP-tagged mutant TMEM16F was primarily localized at the plasma membrane in resting cells and during immunological synapse formation indicating that it could indeed affect TCR signaling and/or bystander TCR engagement to the same extent as the WT (**Fig. 5C, and fig. S5, H and I**).

Because there was no change in phenotype in the Mut cell line, suggesting insufficient changes in PS content to cause spontaneous dissociation and signaling of the TCR-CD3 chains, we measured CD3_{ECD} binding to the PM in non-activated cells using FLIM (**Fig. 5D**). We observed no significant differences in TFP fluorescence lifetime and FRET efficiencies across the various cell lines confirming that the overexpression of WT or mutant TMEM16F was insufficient to induce spontaneous CD3_{ECD} dissociation from the plasma membrane in resting Jurkat cells (**Fig. 5, E and F, and fig. S5J**). The level of expression of mutant TMEM16F (Mut) was significantly lower (0.51-fold) than that of WT-TMEM16F (TM) when analyzing the level of Ametrine fluorescence intensities in the cell lines (**fig. S5K**). Reduced mutant TMEM16F expression may explain the modest change of PS redistribution at the PM and lack of spontaneous dissociation in resting Jurkat cells, and may be due to natural selection of low-expressing cells.

These observations lead us to hypothesize that membrane dissociation of CD3_{ECD} required the reduction of inner leaflet electrostatic potential below a threshold that could be more readily achieved in Mut cells due to their reduced inner leaflet PS abundance. To test this, we incubated the Ame, TM and Mut cell lines with decreasing amounts of ionomycin in order to determine the range at which Ca^{2+} mobilization enabled PS flipping within a range required for CD3_{ECD} dissociation (see Fig. 1D). Through these assays, we first made the observation that only Mut cells actively externalized PS in control conditions (DMSO) resulting in a gradual yet significant increase

in Annexin-V labeling over time (**fig. S5L**, left panel). Additionally, we determined that Mut cells were more sensitive to Ca^{2+} mobilization as we observed a significant increase in PS scrambling activity in the presence of as little as $0.3\mu\text{M}$ ionomycin (**fig. S5L**, right panel). It is important to note that Ca^{2+} mobilization following $0.3\mu\text{M}$ ionomycin treatment was transient, and reached more physiological concentrations than those observed with $2\mu\text{M}$ ionomycin (**Fig. 5G**, upper panel). Our results also show that the magnitude of PS redistribution in Mut cells achieved under $0.3\mu\text{M}$ ionomycin was comparable to those observed in previous assays using Scr cells at $2\mu\text{M}$ (**Fig. 5, G** lower panel and 1D). In contrast, Ame and TM cells showed no changes in PS redistribution under these conditions (**Fig. 5G**).

To determine $\text{CD3}\epsilon_{\text{CD}}$ binding dynamics in these conditions, we treated the Ame, WT and Mut FRET cells with $0.3\mu\text{M}$ ionomycin prior to confocal imaging and FLIM acquisitions (**Fig. 5H**). While no significant changes were observed for Ame and WT cells, treatment with $0.3\mu\text{M}$ ionomycin lead to a significant increase in TFP fluorescence lifetime and a marked decrease in FRET efficiency in Mut cells (**Fig. 5, I and J**). Indeed, Mut cells displayed an average FRET efficiency of $6,78 \pm 1.93\%$, which was similar to that observed for the in Scr cells treated with $2\mu\text{M}$ ionomycin; indicative of $\text{CD3}\epsilon_{\text{CD}}$ membrane dissociation (**Fig. 5J**). Together, these results reinforce the link between the regulation of Ca^{2+} -dependent PS redistribution by TMEM16F and the plasma membrane binding of $\text{CD3}\epsilon_{\text{CD}}$.

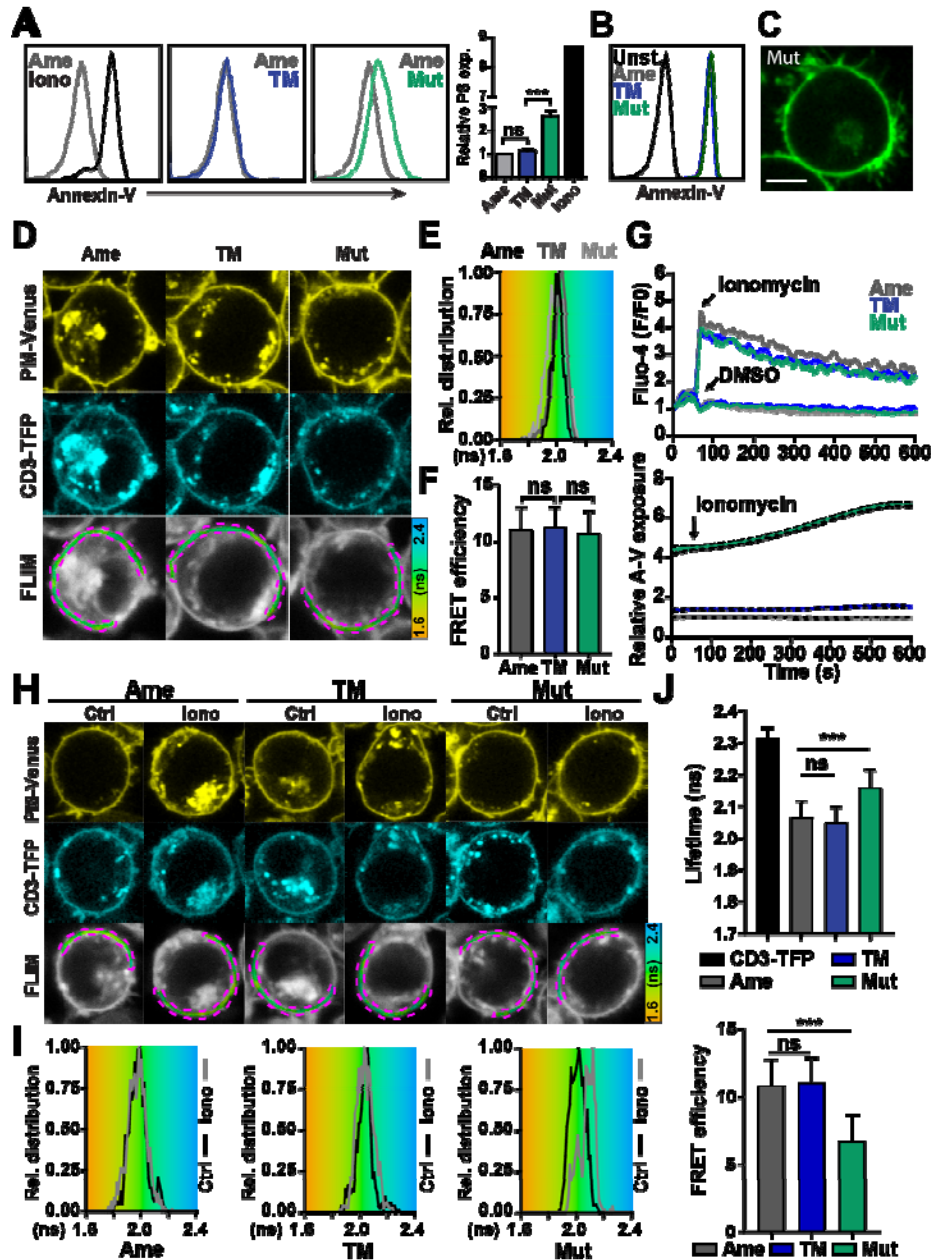


Figure 5. – Mutant TMEM16F constitutively redistributes PS at the plasma membrane and promotes Ca^{2+} -induced CD3 ϵ dissociation.

(A) FACS analyses of surface PS exposure by Annexin-V labeling of Jurkat cells expressing either Ametrine only (Ame), wild-type (TM) or mutant (Mut) TMEM16F (left). Relative PS exposure in TM and Mut cell compared to Ame cells. Ionomycin-treated Ame cells are shown right in black. **(B)** FACS analyses for total PS content in Ame, TM and Mut cell lines using cell fixation and

permeabilization prior to Annexin-V labeling. **(C)** Confocal image of Jurkat cells expressing GFP-tagged TMEM16F mutant. Scale bar: 5 μ m. **(D)** Confocal and FLIM images of Ame, TM, and Mut cell lines expressing the KCD3E-TFP/PM-Venus FRET probes. Scale bars represent 5 μ m. FLIM images are presented as color-coded fluorescence lifetime within the ROIs. **(E)** Relative distribution of TFP fluorescence lifetime quantified at the plasma membrane from ROIs drawn in magenta in panel D for the different FRET cells lines. **(F)** FRET efficiencies for the indicated FRET cells lines. **(G)** Real-time calcium influx fold change (F/F₀) as measured by Fluo-4 labeling and PS exposure fold change over Ame cells (top and bottom respectively) following 0.3 μ M ionomycin stimulation in Ame, TM and Mut cell lines. The magnitude of PS exposure is presented as relative to Ame cells and were corrected to take into account the changes Annexin-V labeling observed in the DMSO conditions (see fig. S5H). Dotted lines indicate 95% confidence interval. **(H)** Confocal and FLIM images of Ame, TM, and Mut cell lines expressing the KCD3E-TFP/PM-Venus FRET probes stimulated with either DMSO or 0.3 μ M ionomycin (DMSO: Ctrl, ionomycin: Iono). Scale bars represent 5 μ m. FLIM images are presented as color-coded fluorescence lifetime within the ROIs. **(I)** Relative distribution of TFP fluorescence lifetime analyzed at the plasma membrane from ROIs drawn in magenta in panel H. **(J)** Population analyses of mean TFP fluorescence lifetime in nanoseconds (ns) and FRET efficiency, top and bottom respectively, measured at the plasma membrane of resting CD3-TFP cells and Ame, TM and Mut FRET cell lines following treatment with ionomycin. All data are representative of a minimum of three independent experiments. Images are representative of > 30 cells. Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Results are shown as mean \pm SD. *P* values: ***: *p* < 0.001; ns: non-significant.

2.6.6 Mutant TMEM16F enhances bystander CD ϵ _{CD} dissociation at the synapse and TCR signaling.

Because of this, we next determined whether bystander receptors may become more readily dissociated from the PM at the immunological synapse in Mut cells due to the increased Ca²⁺ sensitivity of mutant TMEM16F in addition to reduced inner leaflet PS at resting state. To test this, we measured bystander CD3 ϵ _{CD} binding to the PM during synapse formation as done previously (**Fig. 6A**). Ame and TM cell lines displayed similar increases in TFP NRFC at the synapse

when compared to the 3-TFP cells confirming PM dissociation of bystander KIR-CD3 ϵ CD following TCR triggering. Contrastingly, a significantly greater increase was observed in Mut cells indicating greater numbers of bystander KIR-CD3 ϵ CD dissociated from the PM (as reflected with higher TFP NRFC values). Again, PM-Venus RFC levels were identical across all cell lines indicating that differences in TFP NRFC were not due to aberrant changes in acceptor fluorophore distribution at the synapse in the various cell lines (**Fig. 6B, and fig. S6A**). These results suggest that mutant TMEM16F expression should have a significant impact on T cell activation by facilitating greater numbers of bystander receptors to dissociate from the PM and engage in signal amplification. To test this, we stimulated Ame, TM and Mut cell lines as done previously, and analyzed phosphorylation kinetics of key components in early TCR signaling, namely CD3 ζ , ZAP70, LAT, and MEK (**Fig. 6, C and D**). We observed a significant increase in the phosphorylation pattern of all components tested in the early time points following cell activation in Mut cells compared to Ame and TM cells (**Fig. 6, C and D**). Moreover, the phosphorylated status of ZAP70 and LAT were maintained longer in Mut cells.

These results suggested that the expression of mutant TMEM16F enabled greater numbers of bystander receptor phosphorylation through increased PS scrambling due to its enhanced sensitivity to Ca²⁺. We validated this by monitoring PS surface exposure and calcium flux following stimulation (**Fig. 6E**). First, we observed a small but significant increase in surface exposed PS in the Ame cells following stimulation indicating that Ca²⁺-dependent PS redistribution occurred with endogenous TMEM16F expression (**Fig. 6F and fig. S6B**). In correlation with the significant changes in phosphorylation profiles observed in Mut cells, we observed a large and significant increase in PS surface exposure in these cells, while we observed no significant differences in Ca²⁺ mobilization across cell lines (**Fig. 6, E to G, and fig. S6C**). These observations confirmed the notion that enhanced signaling in Mut cells directly correlated with an increase in the Ca²⁺ sensitivity of mutant TMEM16F to induce PS redistribution. To further substantiate the link between TMEM16F-dependent PS exposure and TCR signaling capabilities, we also observed a small but statistically significant increase in LAT and MEK phosphorylation in the TM, which correlated with an increase in PS exposure compared to Ame cells (**Fig. 6, D to G**). Consequently, we

observed a greater sensitivity to Ca^{2+} -dependent PS redistribution in the TM cells compared to Ame cells due to overexpression of TMEM16F (fig. S6D).

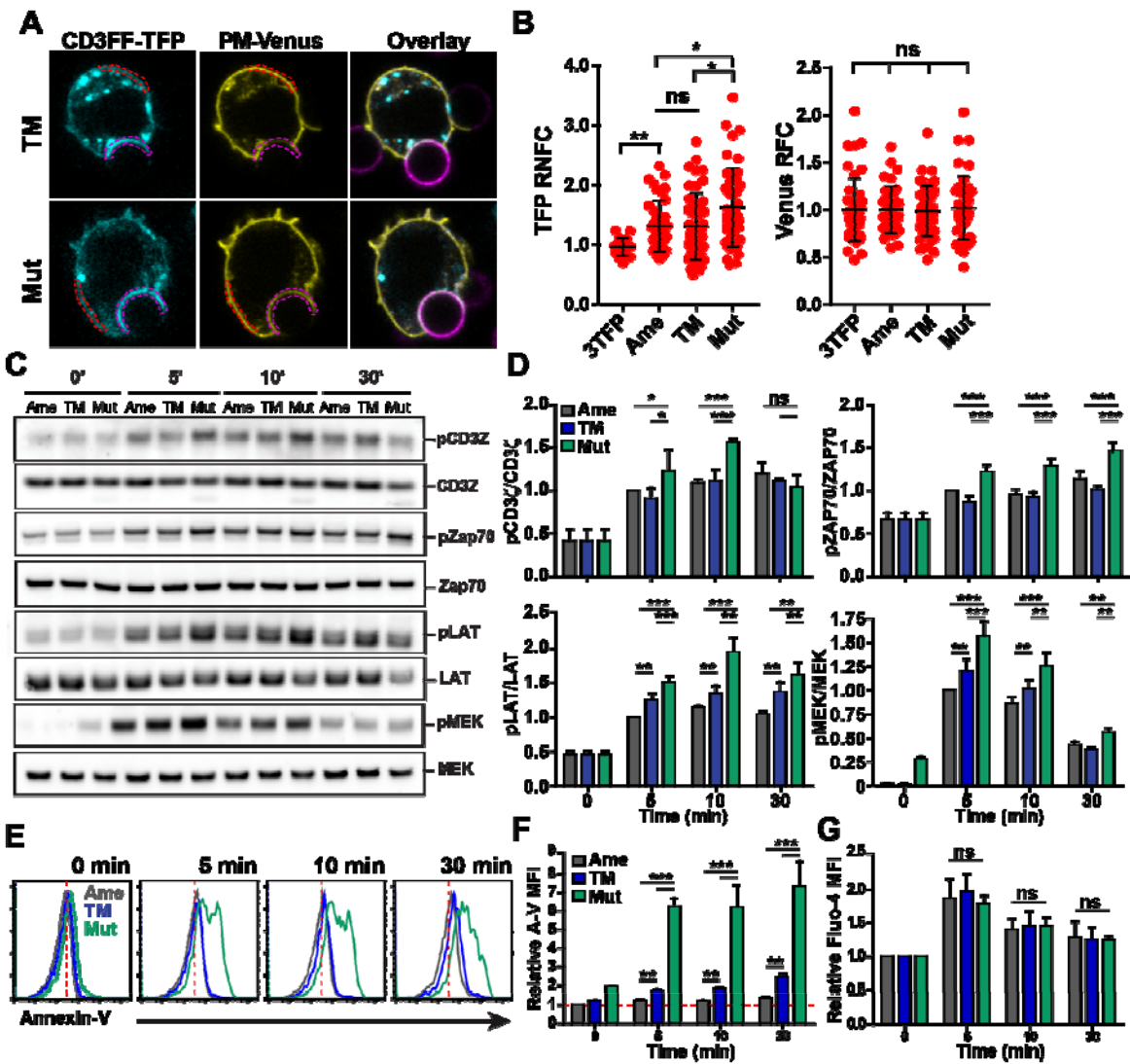


Figure 6. – Mutant TMEM16F expression amplifies bystander CD3ε dissociation and signal amplification following T cell activation.

(A) Confocal images of TM, and Mut cell lines expressing the PM-Venus and KCD3FF FRET probes during immunological synapse formation with silicate beads coated with biotinylated anti-CD3ε/CD28 and Alexa-647-labeled streptavidin (SA647) (magenta). The synapse (Syn, magenta ROI) and non-synapse (PM, red ROI) sections were used for quantification. **(B)** Normalized relative

fluorescence fold change (NRFC) for TFP, left, and relative fluorescence fold change (RNC) of PM-Venus, right, at the synapse over PM values measured from cells as displayed in panel A. Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. **(C)** Western blots of TCR-proximal signaling of Ame, TM, and Mut cell lines following stimulation with 10 μ g/mL PHA-L for the indicated time points using phospho-specific (p) and loading control antibodies as indicated. **(D)** Phospho-kinetic analyses of Ame, TM, and Mut cells from Western blots presented in C performed using ImageJ. Data are represented as fold change over the Ame 5 minutes time point of the phosphorylation signal over loading control. Statistical significance was analyzed using two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. **(E)** FACS analyses for PS exposure in Ame, TM, and Mut cell lines following 10 μ g/mL PHA-L stimulation by Annexin-V labeling. **(F)** Relative PS exposure in Ame, TM, and Mut cell lines following 10 μ g/mL PHA-L stimulation by Annexin-V labeling. Data presented relative to Ame cell line. Statistical significance was analyzed using two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. **(G)** Relative calcium influx in Ame, TM, and Mut cell lines following 10 μ g/mL PHA-L stimulation by Fluo-4 labeling. Data presented relative to Ame cell line. Statistical significance was analyzed using two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. All data are representative of a minimum of three independent experiments. Images are representative of > 30 cells. Results are shown as mean \pm SD. *P* values: ***: $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns: non-significant.

2.6.7 TMEM16F regulates pMHC-stimulated T cell activation through bystander TCR engagement in signaling.

Next, we determined whether a link between the increase in T cell signaling observed in TM and Mut cells was due to changes in bystander TCR engagement using the DR $\epsilon\delta$ chimeric receptor. We transduced Ametrine (Ame), WT (TM) or mutant (Mut) TMEM16F into the DR $\epsilon\delta$ cells lines, stimulated the cells, and probed for CD69 and TCR surface expression as before (**Fig. 7A**). When compared to the control Ame cell line, both the TM and Mut cell lines displayed a significant increase in the frequency of CD69⁺ cells with a marked increase in Mut cells, which correlated with a small but significant increase in bystander TCR internalization in the anti-DR condition (**Fig. 7, A to C**). Conversely, stimulation with either anti-DR/CD4 or anti-CD3/CD4 did

not yield statistical differences between the cell lines in terms in the frequency of CD69⁺ cells and TCR internalization; although a marginal increase in CD69⁺ frequency in Mut cells was observed in both conditions (**Fig. 7B**). These results may be explained by the possibility that stimulation by either anti-DR/CD4 or anti-CD3/CD4 is robust enough to engage the CD69 expression program and effectively engage bystander TCRs, which would mitigate the added benefits of increased TMEM16F activity provided in Mut cells. In contrast, there was a significant increase in surface CD69 abundance in Mut cells across all stimulating conditions, as determined by the geometric mean fluorescence intensity in CD69⁺ cells (**Fig. 7D**). These observations suggest an increase in TCR signaling strength, and is in line with the Western blot analyses presented earlier. Indeed, while it is well established that CD69 expression is digital, typically yielding a bimodal distribution, it also follows an analogous response to TCR signal strength [40-42].

Finally, we sought to validate the role of TMEM16F in enhancing bystander TCR activity in physiological activating conditions using antigen presenting cells. To do so, we opted to create a T cell model where two TCRs are expressed simultaneously, but where only one of the two can recognize the MHC-restricted antigen. We reasoned that by engaging the pMHC-specific TCR we could monitor the internalization of the bystander TCR as shown in previous studies [43, 44]. To this end, we generated a Jurkat cell line (JA6), which already express an endogenous V β 8-arranged TCR, to express the A6 TCR capable of recognizing the Tax peptide from HTLV1 (Human T-cell Leukemia Virus type-1) in the context of HLA-A2 (**fig. S7A**). Transduction with the A6 TCR ultimately resulted in a small but significant increase in total TCR expression due to the presence of two TCRs (**fig. S7B**). To stimulate the JA6 cells, we also created stably expressing Tax-HLA-A2 antigen presenting cells by transducing the EBV-transformed lymphoblastic JY cells line to express a non-functional mutant Tax protein (mTax) (**fig. S7A**) [45, 46]. To monitor cell activation, we assessed CD69 expression, and we used anti-V β 8 to monitor bystander TCR surface expression. We validated the antigen specificity of this approach by incubating WT or A6 Jurkat cells with WT or Tax/HLA-A2 JY cells (**fig. S7C**). As expected, activation of cells and expression of CD69 required both the expression of the A6 TCR and presentation of the Tax peptide in the context of HLA-A2 (**fig. S7D**).

To study the effects of modulating TMEM16F activity and PS redistribution on T cell activation, we transduced the JA6 cell line to express WT or mutant TMEM16F (TM and Mut respectively). While the TM cells also express the Thy1.1 reporter, Mut cells co-express Ametrine enabling us to follow simultaneously the activation profiles of JA6 (WT), TM, Mut and A6-deficient WT Jurkat (GFP⁻) cells (**fig. S7E**). To perform stimulation analyses, we co-incubated Tax-JY and the various Jurkat cell lines at a 1:1 ratio. The T cell mixture approximately contained a 1:1:1:1 ratio between the GFP⁻, WT, TM and Mut cell lines. All cell lines, with the exception of the GFP⁻ cells, were robustly activated in these conditions as observed by the frequency of CD69⁺ cells (**Fig. 7E**). However, both the TM and Mut cells displayed higher a frequency of CD69⁺ cells as well as an increase in surface abundance, with a marked increase in Mut cells, indicating an enhancement in cell activation efficiency and strength (**Fig. 7E, and fig. S7F**). The significant differences in activation profiles in Mut cells correlated with reduced surface abundance of bystander V β 8-specific TCR indicating greater bystander TCR engagement (**Fig. 7F**). We also observed a small yet significant increase in PS exposure in WT and TM cells when compared to unstimulated GFP⁻ cells, while a greater PS surface exposure was observed in Mut cells as expected (**fig. S7G**). Together, these results clearly demonstrate the role of TMEM16F-dependent PS redistribution in engaging bystander TCR in signal amplification and T cell activation.

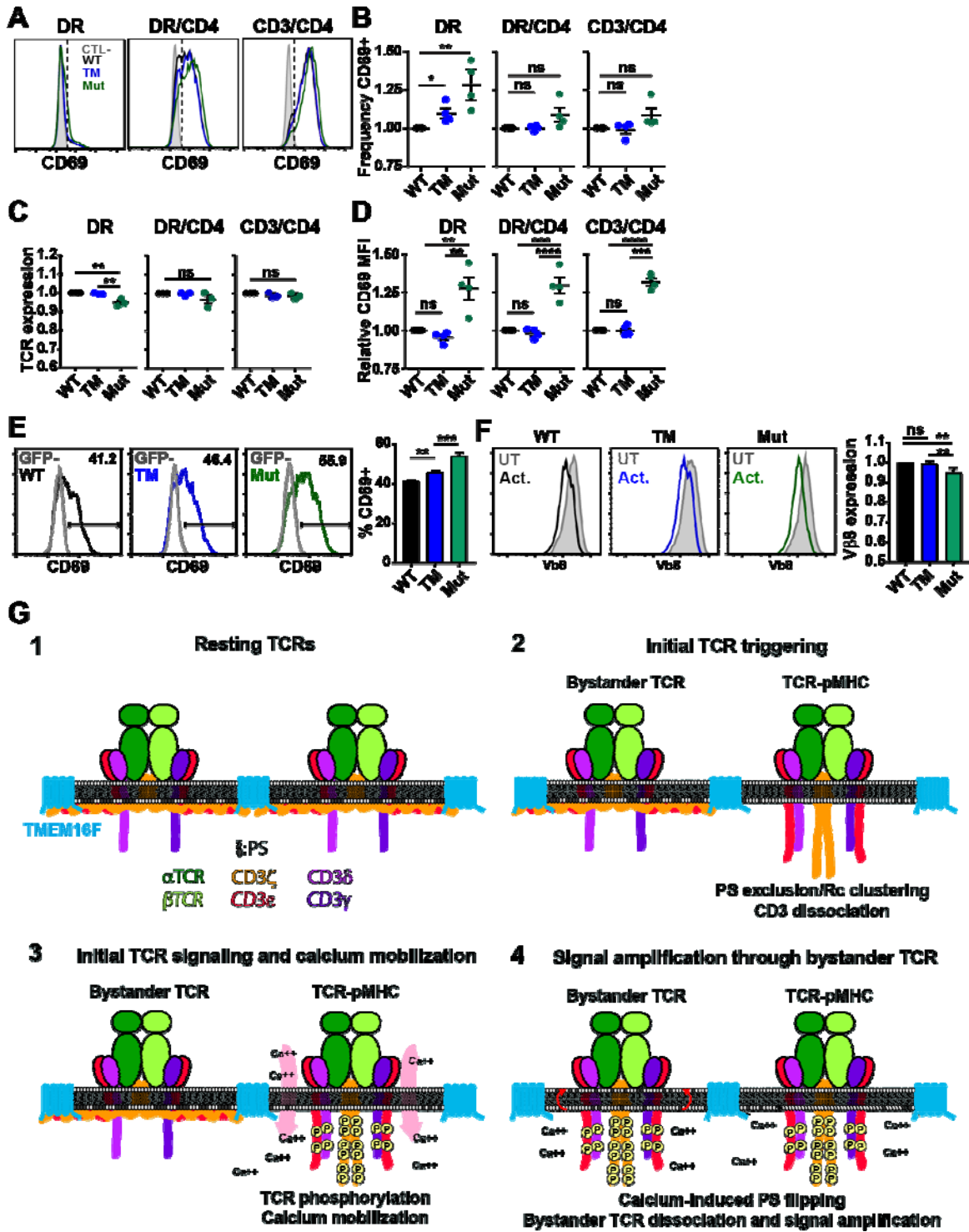


Figure 7. – Mutant TMEM16F expression amplifies T cell signaling through bystander TCR activation.

(A) WT, TM and Mut cells expressing DR $\epsilon\delta$ -li were stimulated overnight with 1 μ g/mL plate-bound anti-DR, anti-DR/CD4 or anti-CD3/CD4 and surface CD69 expression was analyzed by flow cytometry. Unstimulated cells (CTL-) are shown in gray. **(B)** Relative percentage of CD69 positive cells following stimulation relative to WT. **(C)** WT, TM and Mut cells expressing DR $\epsilon\delta$ -li were stimulated for one hour with 2.5 μ g/mL of plate-bound anti-DR/CD4 and surface V β 8-TCR expression was analyzed by flow cytometry. **(D)** MFI of CD69 positive cells stimulation relative to WT. **(E)** Percentage of CD69 positive cells (%CD69+) of WT, TM and Mut A6-TCR cells stimulated with JY-Tax antigen presenting cells. Unstimulated cells (GFP-) are shown in gray. **(F)** Surface expression of V β 8-TCR (bystander) for WT, TM and Mut A6-TCR cells stimulated with JY-Tax antigen presenting cells (Act.). Unstimulated cells are shown in gray (UT). Data presented relative to Ame cell line. **(G)** Schematic representation of a new model for TMEM16F-dependent TCR signal amplification. All data are representative of a minimum of three independent experiments. Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Results are shown as mean \pm SD (panels B, D) and \pm SEM (panels E, F). *P* value: **** $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0,05$; ns: non-significant.

2.7 Discussion

The currently proposed role for Ca^{2+} mobilization in enhancing TCR signal amplification by promoting PM dissociation of the TCR-CD3 chains changed our views on immune receptor activation and signal propagation [14]. Although not universally accepted in the field, the idea that the electrostatic interactions allowing TCR-CD3/PM binding could be outcompeted by robust Ca^{2+} mobilization at the synapse was an elegant proposition [15]. One caveat with this model is that the electrostatic interactions that dictate TCR-CD3 association with the PM, also regulate Lck recruitment and/or activity [33]. Indeed we, and others, have shown that electrostatic interactions enable recruitment of Lck to CD3 ϵ and CD28 and promote efficient phosphorylation [20-22]. In addition, bacterial surface-display studies highlight a specific role for electrostatic interaction-driven preferences for Lck substrates [47]. How Ca^{2+} competes electrostatically for one aspect of TCR signaling (CD3/PM interaction) without the other (CD3/Lck interaction) is unknown and somewhat inconsistent with our understanding of electrostatic interactions. Other caveats in the Ca^{2+} mobilization model is that the surface exposure of PS following ionomycin treatment was never tested in the original study, as well as the fact that it was shown that strontium (Sr^{2+}), a bivalent ion shown to also disengage CD3 ϵ_{CD} from the PM, can also engage mammalian TMEM16F scrambling functions [19, 48].

The findings by the Winau group established a role for TMEM16F in T cell activation and prompted us to rethink the molecular steps towards TCR signal amplification [24]. Stemming from these previous studies, we were first able to uncouple Ca^{2+} mobilization from PS exposure by inhibiting TMEM16F activity through shRNA targeting to show that Ca^{2+} was an indirect component in promoting TCR-CD3 ϵ_{CD} dissociation from the PM. Indeed, using our newly developed FRET assay, we were able to show that robust Ca^{2+} mobilization, by way of ionomycin treatment or immune synapse formation, did not lead to CD3 ϵ_{CD} dissociation from the PM in the absence of TMEM16F in T cells.

Consequently, to perform its role as a potential PS scramblase, previous work had shown that TMEM16F was localized at the plasma membrane in various cell types [26, 38]. However, in the Hu *et al.* study, TMEM16F was observed within endo-vesicles [24]. How TMEM16F mediates PS

exposure at the PM within these compartments was never addressed and remains a puzzle. Conversely, using shRNA rescue experiments, we provide compelling evidence that WT as well as mutant TMEM16F are primarily localized at the PM, where they accomplish their role as a Ca^{2+} -dependent PS scramblase. The reason for subcellular targeting discrepancies are unclear, as both sub-cellular characterization experiments were performed in Jurkat E6 cells, but may have to do with the method by which TMEM16F was expressed in the different studies [24]. The lack of functional rescue experiments in the previous study makes it difficult to assess the validity of the previously observed subcellular localization in T cells. In contrast, expression of TMEM16F-GFP at the PM rescued PS exposure following Ca^{2+} mobilization in TMEM16F-deficient cells, thereby providing validity to our observations.

It is well established that the expression of a few pMHCs at the surface of APCs lead to a drastic drop in TCR surface expression caused by rapid internalization of the receptor [7]. The observations that Ca^{2+} was primarily mobilized through the plasma membrane at the immunological synapse and coincided with a drastic drop in electrostatic potential suggested an additional mechanism by which bystander TCRs could participate in signaling and become internalized [15, 18, 19]. This new model provided a potential explanation to observations made on the role of non-cognate pMHCs in aiding antigen-specific activation of T cells [9, 10]. However, ablating TMEM16F expression lead to a complete inhibition in bystander KIR-CD3 ϵ receptor dissociation from the plasma membrane at the synapse and a significant decrease in TCR signal amplification, despite showing no defect in Ca^{2+} mobilization. Lack of PS scrambling also resulted in a significant reduction in bystander TCR engagement, internalization as well as T cell activation using a novel chimeric activating receptor (DR $\epsilon\delta$) model, which recapitulates the topology of the CD3 ϵ/δ heterodimer outside the context of the TCR, as well as in an HLA-A2 restricted TCR model. Together, these results provide molecular evidence that identifies TMEM16F as a major regulator of the electrostatic potential at the immunological synapse during T cell activation by way of PS scrambling, which mediates bystander TCR engagement and signal amplification.

To further demonstrate this, we characterized the impact of expressing mutant TMEM16F on PS homeostasis at the PM and on T cell activation. The cells expressing mutant TMEM16F not only constitutively redistribute PS to the outer leaflet of the PM, thereby reducing inner leaflet PS

content, but were also more sensitive to reduced Ca^{2+} mobilization for scramblase activity. However, mutant TMEM16F expression and basal PS redistribution did not induce spontaneous dissociation of $\text{CD3}\epsilon_{\text{CD}}$ in resting Jurkat cells, which was most likely due to natural selection of low expressing clones observed in our assays, leading to a modest reduction in inner leaflet PS content in non-activated T cells. However, the cells displayed enhanced bystander KIR- $\text{CD3}\epsilon$ receptor dissociation at the synapse and a significant increase in the phosphorylation kinetics of $\text{CD3}\zeta$ and downstream early effectors following T cell activation. An increase in bystander TCR dissociation due to enhanced PS redistribution may render more ITAMs accessible to Lck for phosphorylation, and explains the overall increase in phosphorylation, T cell activation, and bystander TCR internalization.

TMEM16F expression is highly regulated during thymocyte development with its highest expression observed in DP thymocytes [49]. Moreover, TMEM16F expression follows that of other critical genes in T cell development, namely CD45, Lck and CD3 chains, further suggesting a role during thymocyte selection (Immgen.org). These observations may explain the phenotypes observed in the TMEM16F-deficient T cell study by the Winau group. In their study, contrary to our findings, TMEM16F-KO cells displayed enhanced activation and early exhaustion in a TMEM16F-KO mouse model [24]. Indeed, lack of TMEM16F expression may have a direct impact on the activation potential of peripheral T cells that manage to survive the gauntlet of thymic selection by modulating the expression or activity of other compounding factors such as kinases and phosphatases in order to compensate for its absence. How the absence of TMEM16F impacts T cell development, and how its absence reprograms naive T cell transcriptomes is still largely unknown. TMEM16F-KO mice fail to recover from acute infection, which is in line with the hypothesis that it plays a positive role in the immune response, although its ascribed role in that study did not particularly assess T cell functions [50].

Our results are also in conflict with those presented in Jurkat cells in the Hu study. Where we observe a clear defect in T cell activation and downstream TCR signaling, the previous study suggested an increase in TCR signaling, although the phosphorylated status of the signaling components were not directly assessed [24]. Indeed, the suggested increase in TCR signaling observed in TMEM16F depleted cells was determined by monitoring the recruitment of the tSH2-

mCherry probe and LAT-GFP to the synapse using TIRF microscopy. In this regard, the tSH2-mCherry probe is plagued by significant intracellular vesicle targeting, which is decoupled from surface TCR triggering [51]. This may result in signal accumulation near the synapse interface due to cell spreading and microtubule-organizing center (MTOC) polarity, which repositions intracellular vesicles towards the synapse [52]. In addition, to measure changes in TCR signaling, the tSH2-mCherry probe is typically used in combination with CD3 ζ -GFP, where FRET serves as proxy to establish phosphorylation status [51]. Moreover, the presence of LAT-GFP at the synapse interface is not a direct indication of its phosphorylated status as non-phosphorylated LAT is also found in clusters at the synapse [51, 53]. In contrast, the findings provided here regarding the role of TMEM16F on T cell activation is supported by the inhibition or enhancement of TMEM16F function and its impact on the phosphorylated status of signaling components, activation markers and bystander receptor engagement. In this regard, our findings establish the role of TMEM16F in strengthening TCR-based signaling by engaging bystander receptor dissociation and participation in signal amplification. In this regard, ablation of TMEM16F or TCR yielded nearly identical defects in T cell activation when stimulated through the chimeric DR $\epsilon\delta$ activating receptor.

Finally, our results also provide a molecular basis for observations made concerning the electrostatic potential changes at the synapse and bystander TCR signaling via non-cognate pMHC [17, 18]. We propose a model where [1] the TCR-associated CD3 ϵ and ζ chains are dynamically associated with the PM through electrostatic interactions at resting state. These interactions restrict ITAM accessibility to kinases and reduce the risk of spontaneous phosphorylation. [2] TCR engagement with cognate pMHC initiates the clustering of the receptors and enables the dissociation of the CD3 ϵ and ζ chains from the PM through either exclusion of PS within microclusters or conformational changes of the CD3 cytoplasmic domains [16, 17]. [3] PM-dissociated TCR-CD3 chains are then phosphorylated by Lck and trigger signaling cascades leading to Ca²⁺ mobilization through the CRAC channels at the synapse. [4] Increased local Ca²⁺ concentrations activate the PS scramblase activity of TMEM16F, which redistributes PS towards the outer leaflet of the PM at the synapse. This leads to a general drop of the electrostatic potential at the synapse provided by PS redistribution and local Ca²⁺ leading to an increase in

bystander receptor dissociation from the PM. This may in turn reduce the activating threshold of bystander TCRs and enable them to enhance TCR-dependent signaling by engaging non-cognate pMHC or simply by proximity to locally accumulated Lck through the recruitment of CD4 or CD8 (Fig. 7G).

This model is in line with observations made in this study as well as previously published results. Indeed, it has been shown that following pMHC recognition or antibody-directed cross-linking, TCRs form clusters where PS content is greatly decreased, recruit proteins through newly available binding sites within the CD3 cytoplasmic domains, and become internalized in the absence of signaling [17, 23, 35-37, 43]. In this regard, changes in the PM-associated status of the pMHC-bound TCR-CD3 ϵ and ζ chains may enable the recruitment of internalization factors through changes in the accessibility of the cytoplasmic domains. Contrastingly, internalization of bystander TCRs require signaling, which leads to calcium influx and activation of TMEM16F PS-scrambling functions, in order to dissociate its CD3 ϵ and ζ chains from the PM, participate in signal amplification and ultimately become internalized [35, 43]. The requirement for substantial Ca²⁺ flux, provided through efficient signaling by a limited numbers of cognate pMHC-TCR conjugates, to engage TMEM16F functions and bystander TCR signal amplification may ultimately provide a safeguard against low-grade tonic TCR signaling, which typically yields transient and lower calcium influxes insufficient to activate TMEM16F functions [54, 55]. Finally, in addition to providing signal amplification, internalization of bystander TCRs, which should greatly outnumber pMHC-engaged TCRs, may also provide the T cells with a refractory activation period to limit their rapid reactivation in order to engage in activation derived differentiation/maturation and effector cell functions. In this regard, the absence of TMEM16F and lack of bystander TCR engagement and internalization may ultimately lead to sustained T cell activation and precipitate T cell exhaustion as observed in the Hu *et al.*, study [24].

2.8 Acknowledgements

Acknowledgements: We are grateful for Drs Heather Melichar and Nathalie Labrecque for critical reading of this manuscript. We kindly thank Dr Shigekazu Nagata for the TMEM16F constructs.

We thank the members of the lab and colleagues at IRIC for insightful discussions on the subject.

Funding: A.C. and R.P. were supported by recruitment and PhD fellowships from IRIC. E.G. is supported by a FRQS Junior II salary award. This work was supported by a CFI instrumentation grant (CFI-32762), NSERC discovery grant (436183-2013) and an operating grant from CIHR (MOP-133726).

Author contributions: A.C. and E.G. conceived the experiments and interpreted the results. A.C, R.P., A.B.P. and E.G. performed the experiments and analyzed the results. RL and MT developed the DR $\epsilon\delta$ and JA6 cells lines respectively. A.C. and E.G. prepared the figures and wrote the manuscript. E.G. supervised all aspects of this project.

Competing interests: The authors declare no competing interests. **Data and materials availability:** Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Etienne Gagnon (etienne.gagnon@umontreal.ca).

2.9 References

1. A. H. Courtney, W. L. Lo, A. Weiss, TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends Biochem Sci* **43**, 108-123 (2018).
2. J. Yague *et al.*, The T cell receptor: the alpha and beta chains define idiootype, and antigen and MHC specificity. *Cell* **42**, 81-87 (1985).
3. S. Valitutti, The Serial Engagement Model 17 Years After: From TCR Triggering to Immunotherapy. *Front Immunol* **3**, 272 (2012).
4. N. R. Gascoigne, Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nat Rev Immunol* **8**, 895-900 (2008).
5. S. Valitutti, S. Muller, M. Cella, E. Padovan, A. Lanzavecchia, Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375**, 148-151 (1995).
6. S. Valitutti, A. Lanzavecchia, Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol Today* **18**, 299-304 (1997).
7. C. Utzny, D. Coombs, S. Muller, S. Valitutti, Analysis of peptide/MHC-induced TCR downregulation: deciphering the triggering kinetics. *Cell Biochem Biophys* **46**, 101-111 (2006).
8. M. Krogsgaard, J. Juang, M. M. Davis, A role for "self" in T-cell activation. *Semin Immunol* **19**, 236-244 (2007).
9. M. Krogsgaard *et al.*, Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature* **434**, 238-243 (2005).
10. P. P. Yachi, J. Ampudia, N. R. Gascoigne, T. Zal, Nonstimulatory peptides contribute to antigen-induced CD8-T cell receptor interaction at the immunological synapse. *Nat Immunol* **6**, 785-792 (2005).
11. P. P. Yachi, C. Lotz, J. Ampudia, N. R. Gascoigne, T cell activation enhancement by endogenous pMHC acts for both weak and strong agonists but varies with differentiation state. *J Exp Med* **204**, 2747-2757 (2007).
12. X. Zhao *et al.*, Nonstimulatory peptide-MHC enhances human T-cell antigen-specific responses by amplifying proximal TCR signaling. *Nat Commun* **9**, 2716 (2018).
13. C. Xu *et al.*, Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell* **135**, 702-713 (2008).
14. Y. Ma, K. Poole, J. Goyette, K. Gaus, Introducing Membrane Charge and Membrane Potential to T Cell Signaling. *Front Immunol* **8**, 1513 (2017).

15. L. Li, X. Shi, X. Guo, H. Li, C. Xu, Ionic protein-lipid interaction at the plasma membrane: what can the charge do? *Trends Biochem Sci* **39**, 130-140 (2014).
16. D. Gil, W. W. Schamel, M. Montoya, F. Sanchez-Madrid, B. Alarcon, 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).
17. E. Gagnon, D. A. Schubert, S. Gordo, H. H. Chu, K. W. Wucherpfennig, Local changes in lipid environment of TCR microclusters regulate membrane binding by the CD3epsilon cytoplasmic domain. *J Exp Med* **209**, 2423-2439 (2012).
18. Y. Ma *et al.*, A FRET sensor enables quantitative measurements of membrane charges in live cells. *Nat Biotechnol* **35**, 363-370 (2017).
19. X. Shi *et al.*, Ca²⁺ regulates T-cell receptor activation by modulating the charge property of lipids. *Nature* **493**, 111-115 (2013).
20. L. Li *et al.*, Ionic CD3-Lck interaction regulates the initiation of T-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E5891-E5899 (2017).
21. E. Gagnon *et al.*, Response multilayered control of T cell receptor phosphorylation. *Cell* **142**, 669-671 (2010).
22. J. Dobbins *et al.*, Binding of the cytoplasmic domain of CD28 to the plasma membrane inhibits Lck recruitment and signaling. *Sci Signal* **9**, ra75 (2016).
23. F. A. Hartl *et al.*, Noncanonical binding of Lck to CD3epsilon promotes TCR signaling and CAR function. *Nat Immunol* **21**, 902-913 (2020).
24. Y. Hu *et al.*, Scramblase TMEM16F terminates T cell receptor signaling to restrict T cell exhaustion. *J Exp Med* **213**, 2759-2772 (2016).
25. T. Fujii, A. Sakata, S. Nishimura, K. Eto, S. Nagata, TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 12800-12805 (2015).
26. S. Grubb *et al.*, TMEM16F (Anoctamin 6), an anion channel of delayed Ca²⁺ activation. *J Gen Physiol* **141**, 585-600 (2013).
27. M. I. Liudyno *et al.*, Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2011-2016 (2008).
28. E. Gagnon, A. Connolly, J. Dobbins, K. W. Wucherpfennig, Studying Dynamic Plasma Membrane Binding of TCR-CD3 Chains During Immunological Synapse Formation Using Donor-Quenching FRET and FLIM-FRET. *Methods Mol Biol* **1584**, 259-289 (2017).

29. C. King, S. Sarabipour, P. Byrne, D. J. Leahy, K. Hristova, The FRET signatures of noninteracting proteins in membranes: simulations and experiments. *Biophys J* **106**, 1309-1317 (2014).
30. W. Becker, Fluorescence lifetime imaging--techniques and applications. *J Microsc* **247**, 119-136 (2012).
31. K. Suhling, P. M. French, D. Phillips, Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochem Photobiol Sci* **4**, 13-22 (2005).
32. S. J. Aper *et al.*, Colorful protein-based fluorescent probes for collagen imaging. *PLoS One* **9**, e114983 (2014).
33. A. Connolly, E. Gagnon, Electrostatic interactions: From immune receptor assembly to signaling. *Immunol Rev* **291**, 26-43 (2019).
34. J. S. Fortin, M. Cloutier, J. Thibodeau, Exposing the Specific Roles of the Invariant Chain Isoforms in Shaping the MHC Class II Peptidome. *Front Immunol* **4**, 443 (2013).
35. E. San Jose, A. Borroto, F. Niedergang, A. Alcover, B. Alarcon, Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity* **12**, 161-170 (2000).
36. G. Campi, R. Varma, M. L. Dustin, Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* **202**, 1031-1036 (2005).
37. S. C. Bunnell *et al.*, T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* **158**, 1263-1275 (2002).
38. J. Suzuki, M. Umeda, P. J. Sims, S. Nagata, Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* **468**, 834-838 (2010).
39. T. Yeung *et al.*, Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. *Science* **313**, 347-351 (2006).
40. T. Laguna *et al.*, New insights on the transcriptional regulation of CD69 gene through a potent enhancer located in the conserved non-coding sequence 2. *Mol Immunol* **66**, 171-179 (2015).
41. F. Stelma *et al.*, Human intrahepatic CD69 + CD8+ T cells have a tissue resident memory T cell phenotype with reduced cytolytic capacity. *Sci Rep* **7**, 6172 (2017).
42. K. A. Allison *et al.*, Affinity and dose of TCR engagement yield proportional enhancer and gene activity in CD4+ T cells. *Elife* **5**, (2016).

43. E. Fernandez-Arenas *et al.*, beta-Arrestin-1 mediates the TCR-triggered re-routing of distal receptors to the immunological synapse by a PKC-mediated mechanism. *EMBO J* **33**, 559-577 (2014).
44. C. M. Bonefeld *et al.*, TCR comodulation of nonengaged TCR takes place by a protein kinase C and CD3 gamma di-leucine-based motif-dependent mechanism. *J Immunol* **171**, 3003-3009 (2003).
45. M. Altomonte, C. Pucillo, G. Damante, M. Maio, Cross-linking of HLA class II antigens modulates the release of tumor necrosis factor-alpha by the EBV-B lymphoblastoid cell line JY. *J Immunol* **151**, 5115-5122 (1993).
46. R. Grassmann, M. Aboud, K. T. Jeang, Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* **24**, 5976-5985 (2005).
47. N. H. Shah *et al.*, An electrostatic selection mechanism controls sequential kinase signaling downstream of the T cell receptor. *Elife* **5**, (2016).
48. H. Yang *et al.*, TMEM16F forms a Ca²⁺-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. *Cell* **151**, 111-122 (2012).
49. T. S. Heng, M. W. Painter, C. Immunological Genome Project, The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol* **9**, 1091-1094 (2008).
50. N. Wu *et al.*, Critical Role of Lipid Scramblase TMEM16F in Phosphatidylserine Exposure and Repair of Plasma Membrane after Pore Formation. *Cell Rep* **30**, 1129-1140 e1125 (2020).
51. I. A. Yudushkin, R. D. Vale, Imaging T-cell receptor activation reveals accumulation of tyrosine-phosphorylated CD3zeta in the endosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22128-22133 (2010).
52. K. Choudhuri *et al.*, Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. *Nature* **507**, 118-123 (2014).
53. D. J. Williamson *et al.*, Pre-existing clusters of the adaptor Lat do not participate in early T cell signaling events. *Nat Immunol* **12**, 655-662 (2011).
54. N. Garbi, G. J. Hammerling, H. C. Probst, M. van den Broek, Tonic T cell signalling and T cell tolerance as opposite effects of self-recognition on dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **22**, 601-608 (2010).
55. N. I. Kyratsous *et al.*, Visualizing context-dependent calcium signaling in encephalitogenic T cells in vivo by two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E6381-E6389 (2017).

2.10 Supplemental figures

Figure S1

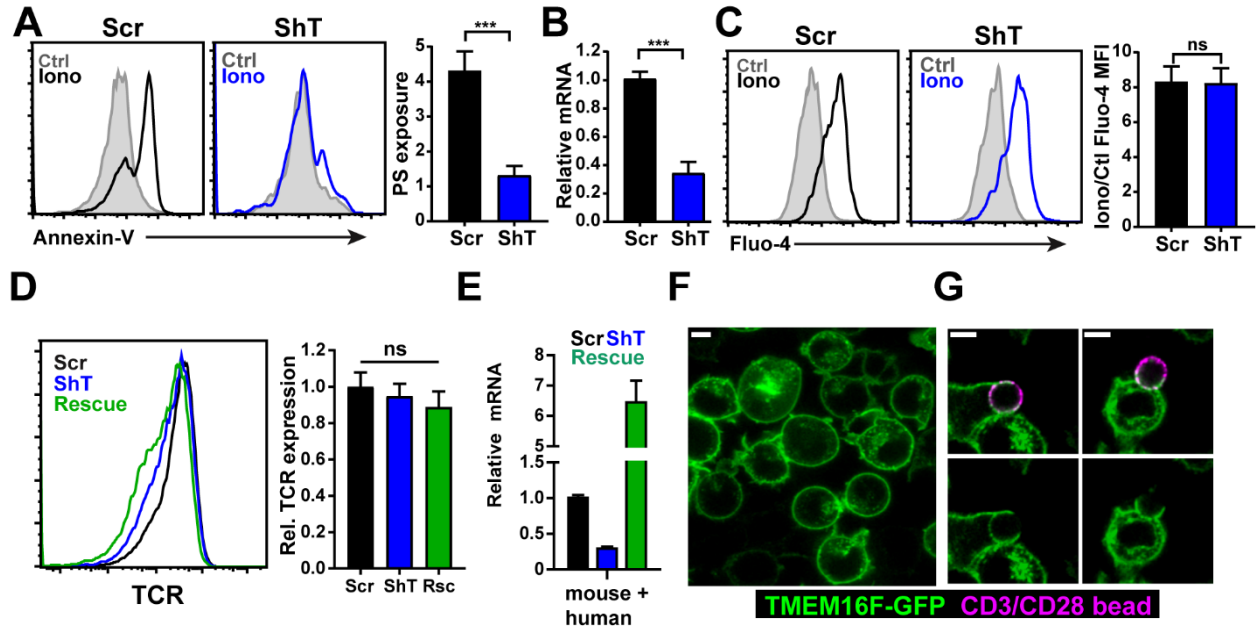


Figure 1. – Figure S1. Knockdown of endogenous TMEM16F in Jurkat T cells abrogates Ca²⁺-dependent phosphatidylserine flipping.

(A) FACS analyses and quantification of PS redistribution measured by Annexin-V labeling of primary OT-I T cells expressing scrambled (Scr) or TMEM16F-targeting (ShT) shRNA following 5 minutes stimulation with 2 μ M ionomycin. **(B)** Relative expression of mouse *Tmem16f* mRNA measured by qPCR for Scr and ShT primary OT-I T cells. Data presented relative to Scr cells. **(C)** FACS analyses and quantification of calcium flux measured by Fluo-4 labeling of Scr and ShT OT-I T cells following 5 minutes stimulation with 2 μ M ionomycin or DMSO (Ctl). **(D)** FACS analyses and quantification of surface expression of $\alpha\beta$ TCR in Scr, ShT and Rescue Jurkat T cell lines. **(E)** Relative expression of total *TMEM16F* mRNA measured by qPCR of Scr, ShT and Rescue Jurkat cell lines. Data presented relative to Scr cells. **(F)** Confocal image of a group of WT TMEM16F-GFP expressing Jurkat cells to highlight uniform PM localization of the fusion protein. **(G)** Confocal image of WT TMEM16F-GFP expressing Jurkat cells during immunological synapse formation with

silicate beads coated with biotinylated anti-CD3 ϵ /CD28 and Alexa-647-labeled streptavidin (SA647).

All experiments are representative of a minimum of three independent experiments. Images are representative of > 20 cells/synapse. Statistical significance was analyzed using unpaired two-tailed Student's t test (panels A, C) or one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (panels D, E). Results are shown as mean \pm SD. *P* values: ***: $p < 0.001$; ns: non-significant.

Figure S2

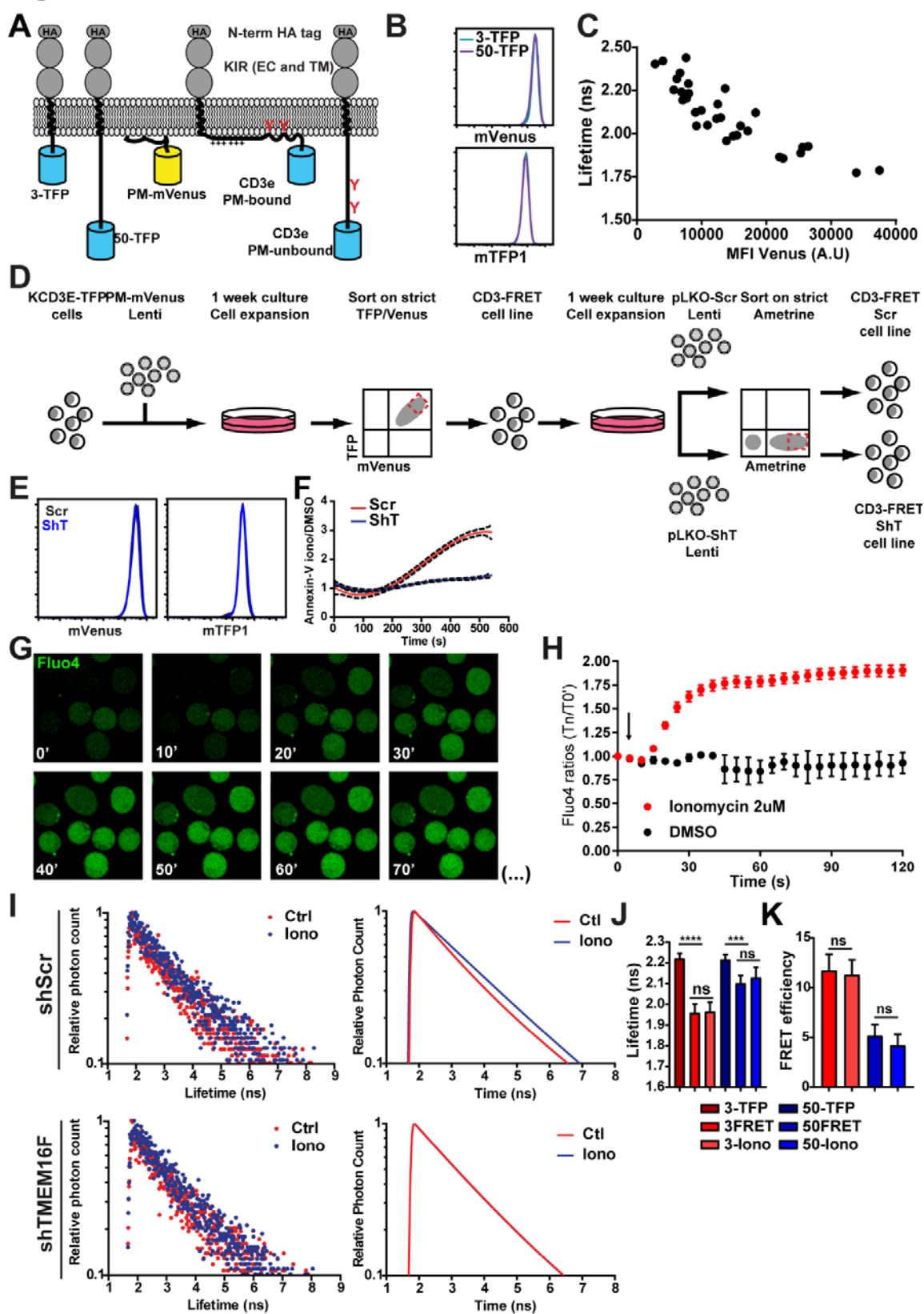


Figure 2. – Figure S2. Elevated intracellular Ca^{2+} is not sufficient to induce CD3 ϵ dissociation from the plasma membrane.

(A) Schematic representation of the newly developed FRET approach used in this study. **(B)** FACS analyses of TFP and Venus expression levels in the 3-TFP/PM-Venus and 50-TFP/PM-Venus stable cell lines. **(C)** Correlation between TFP fluorescence lifetime and mean fluorescence intensity (MFI) of PM-Venus at the plasma membrane. **(D)** Schematic representation of the sorting strategy used to obtain the various KCD3-TFP/PM-Venus FRET cell lines used in this study. **(E)** FACS analyses of the fluorescence intensities of mVenus and TFP in the Scr and ShT Jurkat cell lines expressing KCD3-TFP/PM-Venus. **(F)** Surface PS exposure (Annexin-V) fold change following stimulation with DMSO or 2 μM ionomycin for Scr and ShT KCD3-TFP/PM-Venus FRET cells. Data are normalized over the DMSO control. Dotted lines indicate 95% confidence interval. **(G)** Real-time confocal images of calcium flux by Fluo-4 labeling following injection of 2 μM ionomycin in Jurkat cells. Time stamps are in seconds. **(H)** Relative Fluo-4 fluorescence intensities over time normalized over the baseline measurement (T_n/T_0) following DMSO or 2 μM ionomycin stimulation (arrow). **(I)** Time correlated photon counts from pixels at the PM for the Scr or ShT FRET cell lines either unstimulated or stimulated with 2 μM ionomycin (control: ctrl; ionomycin: iono). **(J)** TFP fluorescence lifetime of the indicated cell lines following stimulation with 2 μM ionomycin. **(K)** FRET efficiency of the 3FRET and 50FRET cell lines before and after stimulation with 2 μM ionomycin.

All experiments are representative of a minimum of three independent experiments. Images are representative of > 30 cells. Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Results are shown as mean \pm SD. *P* values: ****: $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$; ns: non-significant.

Figure S3

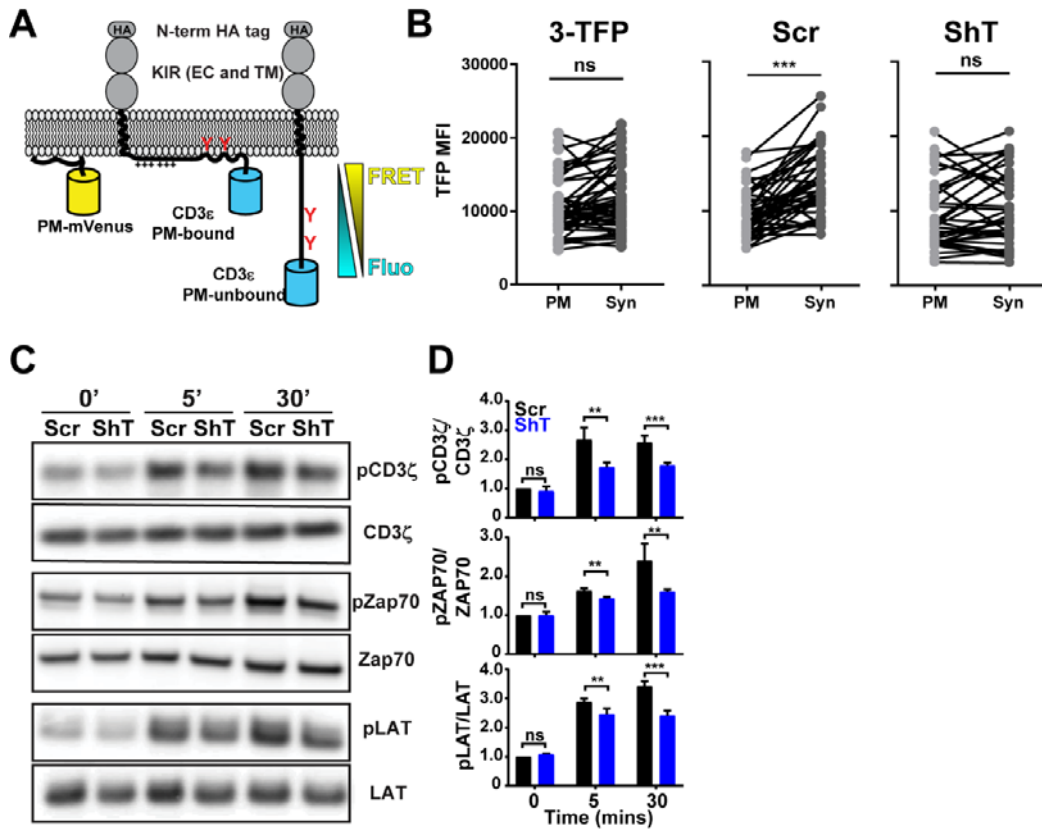


Figure 3. – Figure S3. Bystander CD3 ϵ dissociation and signal amplification following TCR crosslinking is TMEM16F-dependent.

(A) Schematic representation of the FRET approach and effect of membrane dissociation on FRET signals for experiments used to study membrane binding of CD3 ϵ_{CD} during immunological synapse formation. **(B)** Paired analyses of TFP fluorescence intensity at the synapse and non-synapse (synapse: Syn, non-synapse: PM) portion of the plasma membrane in 3-TFP, Scr and ShT cell lines expressing the PM-Venus and KCD3FF FRET probes. Data presented as mean fluorescence intensities (MFI). **(C)** Western blots of TCR-proximal signaling in Scr and ShT cells following stimulation with 10 μ g/mL PHA-L for the indicated time points using phospho-specific (p) and loading control antibodies as indicated. Image shown is representative of four separate experiments. **(D)** Phospho-kinetic analyses of Scr and ShT cells from Western blots presented in C performed using ImageJ. Data are represented as fold change over the non-activated Scr control (0 min) using normalized phospho-specific signals according to loading signals.

All experiments are representative of a minimum of three independent experiments. All data presented as mean \pm SD. Statistical significance was analyzed using paired Student's t test (panel B) or two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (panel D). P values: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; ns: non-significant.

Figure S4

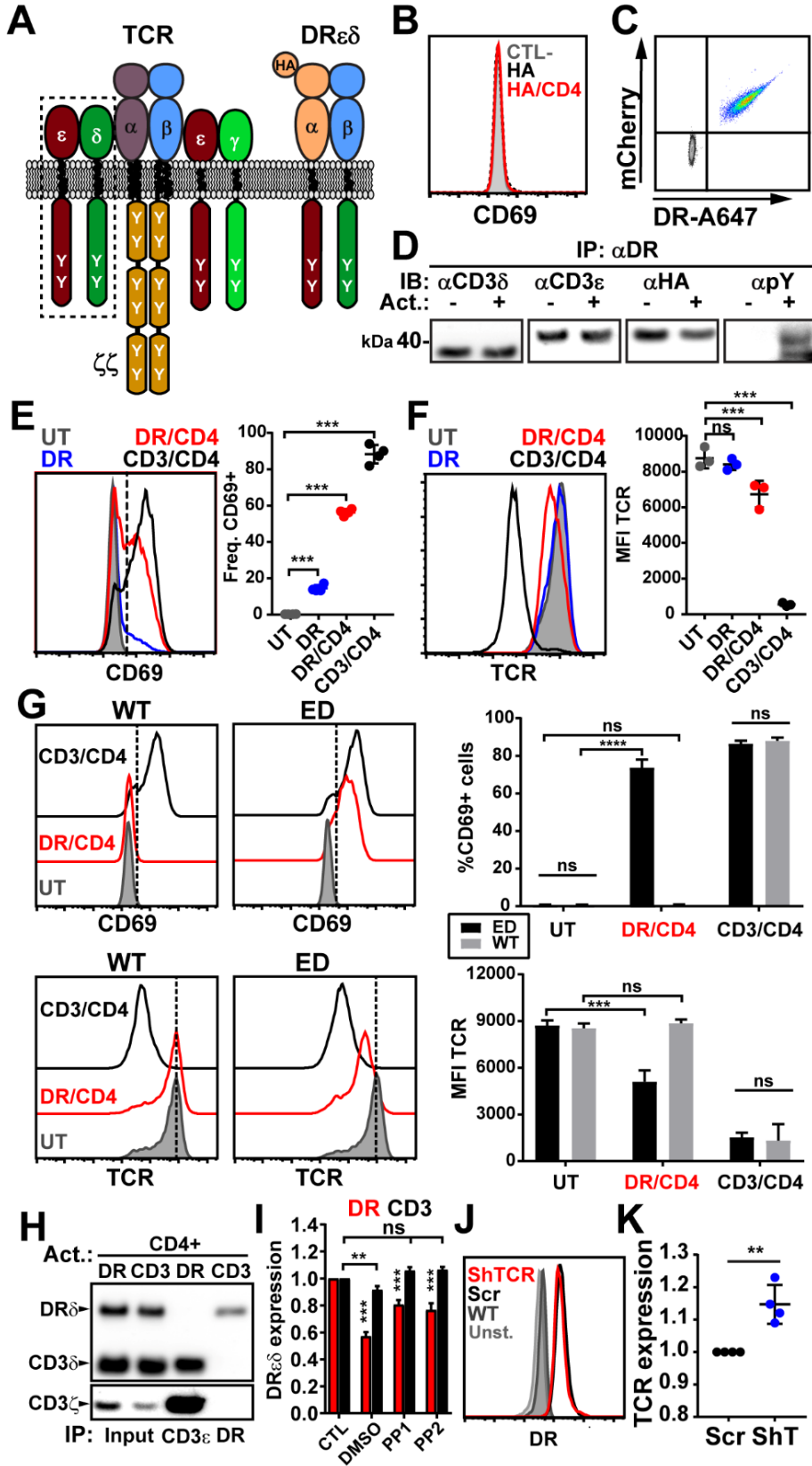


Figure 4. – Figure S4. TMEM16F is required for bystander TCR activation.

(A) Schematic representation of the chimeric DR/CD3 ϵ δ model used to study bystander TCR activation. **(B)** Jurkat cells expressing KCD3-TFP/PM-Venus were stimulated with 1 μ g/mL plate-bound anti-HA alone (shown in black), 1 μ g/mL plate-bound anti-HA and anti-CD4 (red) or unstimulated (gray) and surface CD69 expression was analyzed by flow cytometry. **(C)** Jurkat cells transduced with li-mCherry and DR ϵ δ -IRES-eGFP were analyzed by flow cytometry for surface expression of DR ϵ δ with Alexa-647 labeled anti-DR (DR-A647). **(D)** Jurkat cells expressing li and DR ϵ δ were stimulated with 50 μ M pervanadate for 10 minutes. Cells were lysed and DR ϵ δ was pulled-down using anti-DR and protein G beads. The different components of the DR ϵ δ chimera with (+) or without (-) pervanadate stimulation were probed by Western blot with the indicated antibody (CD3 δ , CD3 ϵ , HA) and phosphorylation was determined with an anti-phosphotyrosine antibody. **(E)** DR ϵ δ -li expressing Jurkat cells were stimulated overnight with 1 μ g/mL plate-bound anti-DR (blue), anti-DR/CD4 (red), anti-CD3/CD4 (gray) or left unstimulated (UT; black) and surface CD69 expression was analyzed by flow cytometry (left). Frequency of CD69 expressing DR ϵ δ -li Jurkat cells following indicated stimulation is shown right. **(F)** DR ϵ δ -li expressing Jurkat cells were stimulated overnight with 1 μ g/mL plate-bound anti-DR (blue), anti-DR/CD4 (red), anti-CD3/CD4 (gray) or left unstimulated (UT; black) and surface TCR expression was analyzed by flow cytometry (left). MFI of surface TCR expression of DR ϵ δ -li Jurkat cells following indicated stimulation is shown right. **(G)** DR ϵ δ expressing Jurkats (ED) or WT Jurkats (WT) were stimulated with 1 μ g/ml plate-bound anti-CD3/CD4, anti-DR/CD4 or left untreated (UT) and then analyzed the next day for surface CD69 and TCR expression by flow cytometry. Relative frequency in % of CD69+ cells and geometric mean fluorescence intensity of surface TCR expression were measured. **(H)** DR ϵ δ -li expressing Jurkat cells were stimulated with plate-bound anti-DR/CD4 for 15 minutes or anti-CD3/CD4 for 7.5 minutes and then DR ϵ δ (DR) or TCR were immunoprecipitated in non-denaturing conditions. Components of DR ϵ δ and TCR (CD3 δ and CD3 ζ) were then probed by Western blot. **(I)** DR ϵ δ expressing Jurkats were pre-incubated for 1 hour with either 20 μ M PP1, 20 μ M PP2, or DMSO and then stimulated in these conditions with 2.5 μ g/ml plate-bound anti-CD3/CD4 (CD3), anti-DR/CD4 (DR) or left unstimulated (CTL). Surface DR ϵ δ expression was probed 45 minutes after stimulation. Data presented as relative expression compared to DMSO-treated

but unstimulated cells (CTL). **(J)** DR $\epsilon\delta$ -li expressing Jurkat cells were transduced at low MOI with a shRNA against TCR α (red) or scrambled shRNA (shown in black) and surface DR $\epsilon\delta$ expression was analyzed by flow cytometry. Unstained cells (Unst.) and WT Jurkats (WT) were used as controls. **(K)** Scr and ShT cells expressing DR $\epsilon\delta$ -li were stimulated overnight with 1 μ g/mL plate-bound anti-DR/CD4 and surface TCR expression was analyzed by flow cytometry. Data presented as relative surface TCR expression in ShT cells compared to Scr cells.

All experiments are representative of a minimum of three separate experiments. Statistical significance was analyzed using one-way (panels E, F) or two-way (panels G-I) ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, or unpaired Student's t test (panel K). All data presented as mean \pm SD. *P* values: ****: $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; ns: non-significant.

Figure S5

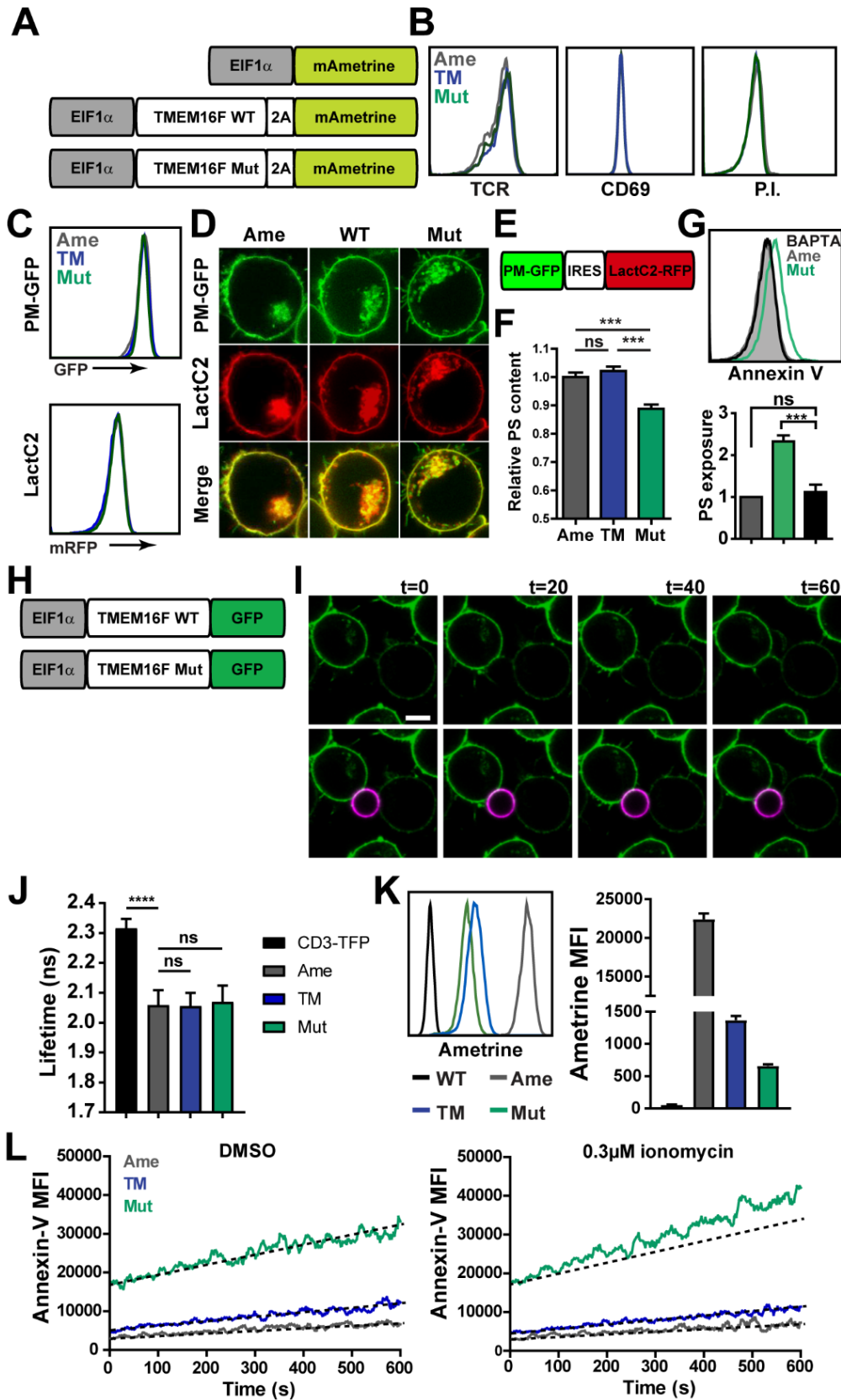


Figure 5. – Figure S5. Mutant TMEM16F constitutively redistributes PS at the plasma membrane and promotes Ca²⁺-induced CD3ε dissociation.

(A) Schematic representation of the different TMEM16F constructs used in this study. The promoter EIF1α is shown in gray. **(B)** FACS analyses of surface αβTCR expression, CD69 expression and of cell viability using Propidium iodide labeling for the Ame, TM and Mut cell lines. **(C)** FACS analyses of eGFP and mRFP fluorescence in sorted Ame, TM and Mut cells transduced with the PM-GFP-IRES-LactC2-mRFP construct. **(D)** Confocal imaging of Ame, TM and Mut cells expressing the PM-GFP-IRES-LactC2-mRFP construct. Images are representative of > 50 cells per cell line. **(E)** Schematic representation of the PM-GFP-IRES-LactC2-mRFP construct used in this study to quantify inner leaflet PS content. **(F)** Quantification of the relative phosphatidylserine (PS) content in Ame, TM and Mut cell lines. Plasma membrane fluorescence intensities of eGFP and mRFP were quantified in ImageJ and the relative PS content in each cell was obtained by dividing the mRFP fluorescence intensity over eGFP. Data were normalized over the mRFP/eGFP ratio of Ame cells. **(G)** FACS analyses for calcium sensitivity of Mut cell line for constitutive PS exposure using the intracellular calcium chelating agent BAPTA-AM prior to surface Annexin-V staining. Relative PS exposure normalized to Ame cells for Mut cells treated or not with BAPTA-AM (bottom). **(H)** Schematic representation of the different eGFP-tagged TMEM16F constructs used in this study. The promoter EIF1α is shown in gray. **(I)** Confocal image of Jurkat cells expressing mutant TMEM16F-GFP during immunological synapse formation with silicate beads coated with biotinylated anti-CD3ε/CD28 and Alexa-647-labeled streptavidin (SA647). Time stamps (t) are shown in seconds. White scale bar represents 5µm. **(J)** TFP fluorescence lifetime of the CD3-TFP cell line in comparison to Ame, TM and Mut FRET cell lines. **(K)** Ametrine expression and MFI of untransduced Jurkats (JKT), Ame, TM, and Mut cells. **(L)** Real-time PS exposure using fluorescent Annexin-V staining following DMSO or 0.3µM ionomycin treatment in Ame, TM and Mut cell lines. Experiment shown is representative of three separate experiments.

All experiments are representative of a minimum of three independent experiments. Images are representative of > 20 cells. Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Data presented as mean ± SEM (panels F, G) or ± SD (panels J, K). *P* values: *** *p* < 0.001; ns: non-significant.

Figure S6

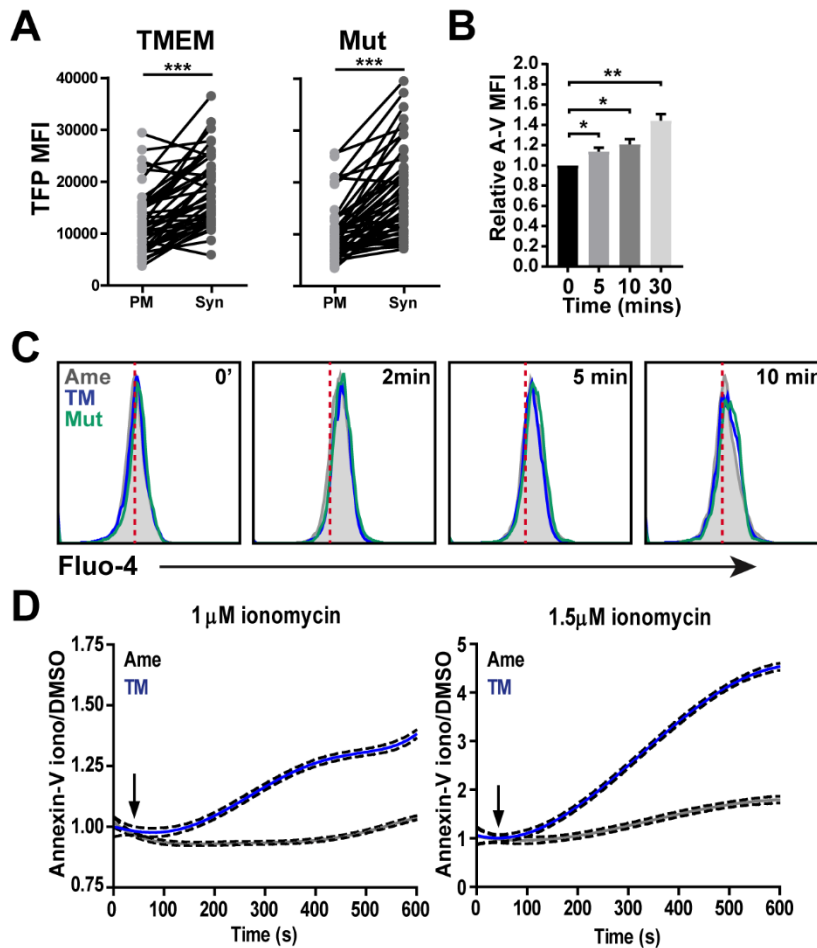


Figure 6. – Figure S6. Mutant TMEM16F expression amplifies bystander TCR activation and signal amplification following T cell activation.

(A) Paired analyses of TFP fluorescence intensity at the synapse and non-synapse portion of the plasma membrane (synapse: Syn, non-synapse: PM) in TM and Mut cell lines expressing the PM-Venus and KCD3FF FRET probes. Data presented as mean fluorescence intensities (MFI). **(B)** Relative PS exposure as determined by Annexin-V (A-V) labeling in Ame cells following stimulation with PHA (10 μg/ml). Data presented is relative to A-V staining at time zero (0). **(C)** Typical results monitoring activation-induced calcium flux as measured by Fluo-4 used for the quantification in Fig. 6G. **(D)** Surface PS exposure (Annexin-V) fold change of Ame and TM cells following

stimulation with DMSO, 1 μ M or 1.5 μ M ionomycin. Ionomycin injection is indicated with an arrow. Data are normalized over the DMSO control. Dotted lines indicate 95% confidence interval.

All data are representative of a minimum of three independent experiments. Statistical significance was analyzed using paired t test (A) or one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (B). Results are shown as mean \pm SD, **** $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0,05$; ns: non-significant.

Figure S7

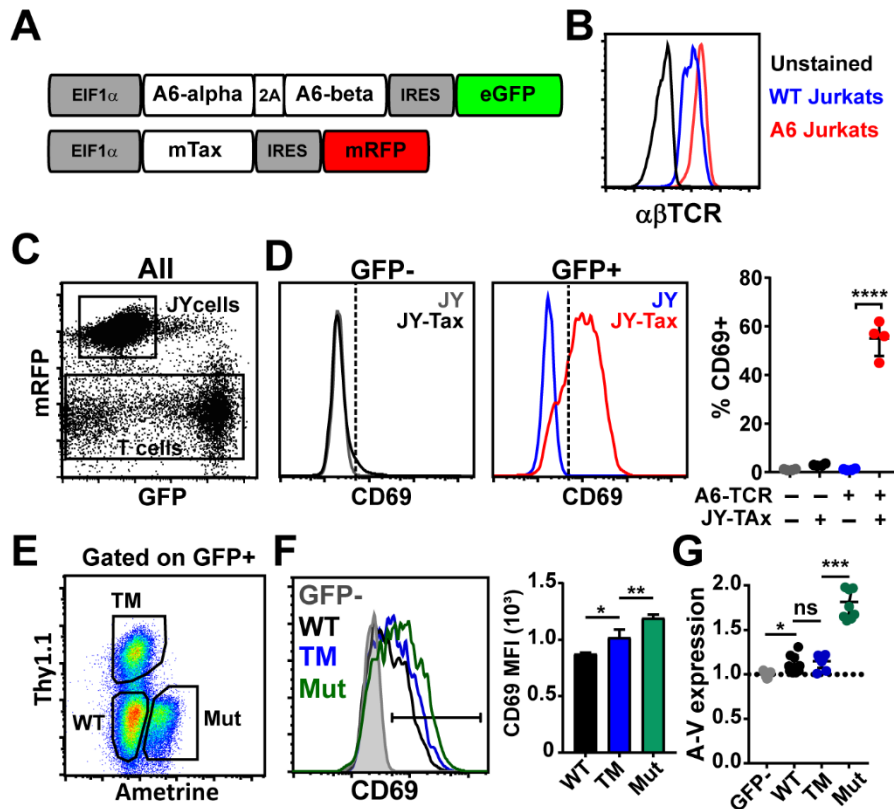


Figure 7. – Figure S7: Mutant TMEM16F expression amplifies T cell signaling through bystander TCR activation.

(A) Schematic representation of the A6-TCR and Tax peptide constructs used in this study. **(B)** Surface $\alpha\beta$ TCR expression of WT Jurkat and A6-TCR expressing Jurkat cell lines. Unstained cells are shown in black. **(C)** Gating strategy to study CD69 expression of Jurkat T cells expressing the A6-TCR (eGFP+) following co-culture with mRFP-Tax peptide expressing JY cells. **(D)** CD69 expression of GFP- (left) or GFP+ (middle) cells following stimulation with JY-Tax expressing cells. Frequency of CD69 positive cells for the different cells following stimulation with JY-Tax cells is shown right. **(E)** Gating strategy to study CD69 expression of WT TMEM16F-Thy1.1 (TM), Mut TMEM16F-Ametrine (Mut), and WT Jurkats (WT) cells transduced with the A6-TCR following co-culture with Tax peptide expressing JY cells. **(F)** FACS plot displaying relative distribution of CD69+ cells following stimulation with JY-Tax cells. Gating used to identify CD69+ cells is shown (left). CD69 MFI of positive cells relative to WT following stimulation with JY-Tax cells is shown right. **(G)**

A6-TCR expressing WT, TM and Mut cells were stimulated overnight with JY-Tax cells and surface PS was analyzed by flow cytometry with Annexin-V staining. Annexin-V expression relative to A6-TCR negative (GFP-) cells.

All data are representative of a minimum of three independent experiments. Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Results are shown as mean \pm SD, **** $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0,05$; ns: non-significant.

Chapitre 3 – TMEM16F régule l'activation et la différenciation des lymphocytes T

Audrey Connolly^{1,3} *, Rébecca Panès^{1,3} *, Jean-François Daudelin², Angélique Bellemare-Pelletier¹, Nathalie Labrecque^{2,3} et Etienne Gagnon^{1,3}

1. Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie.
2. Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont
3. Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montréal, Québec, CANADA, H3T1J4.

*Les auteures ont contribué de manière égale au projet

3.1 Contributions des auteurs

AC : Génération des constructions de plasmides. Conception, exécution et analyse des expériences de marquage à l'Annexin V. Conception, planification, exécution et analyse des expériences de qPCR (Figure 2) et d'activation in vitro. Planification, exécution et analyse des expériences de transduction lentivirale. Préparation des figures (Figures 1 à 9). Interprétation des données Immgen (Figures 1 et 2) et des résultats.

RP : Conception, planification, exécution et analyse des expériences de transductions lentivirales, de qPCR (Figure 3D) et d'activation in vitro. Optimisation des conditions de transduction lentivirales et d'activation des cellules primaires in vitro. Conception, planification, exécution et analyse des expériences in vivo. Réalisations des illustrations (Figures 2, 3 et 8). Préparation des figures 3D, 4A et 5.

JFD: Conception, planification et exécution des expériences in vivo

ABP: Maintien des colonies de souris, génération de la construction pLKO.1-shScr-Ametrine.

NL: Conception des expériences in vivo

EG: Conception des expériences de transductions lentivirales et d'activation in vitro et in vivo. Préparation des figures 4A et 5. Interprétation des données Immgen (Figure 1).

3.2 Mise en contexte du projet

Nos résultats démontrent que la redistribution de PS par TMEM16F, une scramblase calcium-dépendante, régule le niveau d'association de la chaîne CD3 ϵ du TCR à la MP. Nos résultats obtenus dans la lignée cellulaire humaine T Jurkat démontrent que la réduction de l'expression de TMEM16F diminue l'activation des TCRs non-engagés. De plus, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de molécules de signalisation et de l'expression du marqueur d'activation CD69. En contraste, nous avons démontré que l'expression d'un mutant constitutivement actif de TMEM16F augmente la dissociation de TCRs non-engagés, la phosphorylation des molécules de signalisation TCR-proximale et l'expression du marqueur d'activation CD69. Ainsi, nos résultats démontrent que la redistribution de PS par TMEM16F régule positivement l'activation des lymphocytes T.

Nos résultats obtenus dans lignée Jurkat sont en contraste avec l'étude de Hu *et al* publiée en 2016, où il est démontré qu'une augmentation de la phosphorylation des molécules de signalisation TCR-proximales chez les lymphocytes T isolés de souris *Tmem16f*^{-/-}. De plus, dans cette étude, il a été démontré que l'absence de TMEM16F promeut l'activation robuste puis l'épuisement des lymphocytes T dans un modèle d'infection chronique au virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) clone 13 [368].

Afin d'exclure le rôle potentiel de TMEM16F dans le développement des lymphocytes T, nous avons voulu étudier le rôle de TMEM16F dans l'activation de lymphocytes T périphériques naïfs. Nous avons utilisé le modèle de souris *Rag1*^{-/-} OT-I, où le TCR est restreint au peptide OVA (SIINFEKL) présenté par H2-K^b. Ce modèle permet l'isolation d'un grand nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au peptide OVA afin d'étudier leur activation suivant leur stimulation. Ce modèle permet également d'exclure l'influence de TMEM16F sur le développement des thymocytes puisque l'ARN interférant contre TMEM16F est transduit dans les lymphocytes T périphériques matures. Considérant nos résultats obtenus au Chapitre 2, nous émettons l'hypothèse que TMEM16F régule positivement la réponse immunitaire des lymphocytes T primaires murins.

3.3 Méthodologie

3.3.1 Souris

Les souris *Rag1*^{-/-} OT-I (CD45.2) ont été élevées dans un environnement exempt d'agents pathogènes à l'animalerie de l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie selon un protocole approuvé par le Comité de déontologie de l'Université de Montréal sur l'expérimentation animale. Les souris C57BL/6.SJL (CD45.1) ont été achetées au Laboratoire Jackson et ont été logées à l'animalerie du Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont dans un environnement exempt d'agents pathogènes selon les Lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux.

3.3.2 Lignées cellulaires

Toutes les lignées cellulaires ont été achetées auprès d'ATCC. Les lignées cellulaires sont maintenues à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les cellules T Jurkat E6.1 ont été maintenues dans RPMI + GlutaMAX (Gibco) supplémenté avec 10% de FBS (sérum bovin fétal), 100U/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine et 10mM HEPES pH 7.4. Les cellules HEK293T ont été cultivées dans du DMEM + GlutaMAX (Gibco) supplémenté avec 10% de FBS, 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 10mM d'HEPES pH 7.4. Pour la production lentivirale, les cellules HEK293T ont été cultivées dans du DMEM + GlutaMAX supplémenté avec 15% de FBS, 100U/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine et 10mM HEPES pH 7.4. Les cellules HEK293T ont été soumises à un passage tous les 2 à 3 jours en utilisant une solution de PBS contenant 0.5% de FBS, 2mM d'EDTA pH 8.0 et 10mM d'HEPES pH 7.4. La lignée de macrophage RAW267.4 a été maintenue dans du DMEM + GlutaMAX supplémenté avec 10% de FBS, 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine.

3.3.3 Plasmides

Les séquences d'ARN interférant pour le *Tmem16f* murin ont été obtenues à partir de la bibliothèque Mission shRNA (Sigma-Aldrich). La boucle de l'ARN interférant a été modifiée pour la séquence TATAACT. Les séquences des ARNs interférant ont été clonées dans un vecteur

pLKO.1 exprimant l'Ametrine ou Thy1.1 sous le promoteur hPGK en utilisant des enzymes de restriction AgeI et EcoRI (New England Biolabs).

3.3.4 Production lentivirale

Pour la production lentivirale, les cellules HEK293T ont étéensemencées dans une boîte traitée à la culture tissulaire de 10 cm. Le jour suivant, des cellules HEK293T ont été transfectées avec des plasmides d'emballage: 3µg VSV-G (pMD2.g), 1.5µg RRE (pMDLg / pRRE) et 1.5µg REV (pRSV-REV) et 6µg du plasmide d'intérêt en utilisant le réactif TransIT-LT1 (Mirus) en suivant le protocole du fabricant. Les plasmides d'emballage proviennent de Didier Trono (plasmides Addgene # 12251, 12253, 12259). Le milieu des cellules a été remplacé après 16 heures d'incubation par du milieu HEK293T à 15% de FBS. Les surnageants ont été récoltés 36 heures après le changement de milieu. Les surnageants ont été filtrés (0,45µm) et le virus a été concentré par ultracentrifugation à 25 000 rotations/min pendant 90 minutes à 37°. 300 µl de PBS froid ont été ajoutés au culot et le virus a été remis en suspension pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, le virus a été congelé sur de la glace sèche et les titres viraux ont été déterminés dans les cellules Jurkat.

3.3.5 Isolation des lymphocytes T CD8+

Des souris *Rag1*^{-/-} OT-I adultes de 6 à 8 semaines (mâles et femelles) ont été sacrifiées et des rates et des ganglions lymphatiques ont été prélevés. Les organes ont été mécaniquement perturbés sur un filtre de 70 µm et les cellules ont été récupérées par lavage avec du RPMI froid (Gibco). Les cellules ont été incubées avec un tampon de lyse de globules rouges (150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM EDTA pH 7.4) pendant 5 minutes sur de la glace afin de purifier les cellules T. Les cellules ont été lavées et les cellules T OT-I ont été purifiées avec le kit d'isolement des cellules T CD8+ MojoSort Mouse CD8+ (BioLegend). La pureté des lymphocytes T CD8+ a été confirmée par marquage de surface anti-CD8α clone 53-6.7 (BioLegend) pendant 30 minutes sur glace puis par analyse par cytométrie en flux. Des cellules T OT-I primaires fraîchement isolées ont été maintenues dans RPMI + GlutaMAX supplémenté avec 10% de FBS, 100U/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine, 0.005% de β-mercaptoéthanol, 1mM de pyruvate de sodium, 10mM HEPES pH 7.4, 25ng/mL IL-7 et 100ng/mL IL-15. L'IL-2 a été ajoutée à la culture à

une concentration de 20ng/ml le jour suivant le sacrifice. Les interleukines recombinantes proviennent de BioLegend.

3.3.6 Transduction lentivirale

Pour déterminer la multiplicité d'infection du virus, 50,000 cellules Jurkats ont étéensemencées dans une plaque à 96 puits à fond rond. Le virus a été dilué à des concentrations finales de 1:40 à 1:2000 avec 5µg/mL de protamine sulfate (Sigma-Aldrich) pendant une nuit à 37°C. Le milieu a été changé le lendemain et les cellules ont été laissées au repos pendant 48 heures avant l'analyse par cytométrie en flux. La multiplicité de l'infection a été déterminée par une courbe calculée à partir du pourcentage d'expression d'Ametrine à chaque dilution de virus.

2×10^6 cellules OT-I ont été transduites 48 heures après l'isolement avec une multiplicité virale d'infection de 15 avec 5 µg/mL de protamine sulfate. Les cellules ont été infectées par centrifugation à 2000 rotations/min pendant 90 minutes à 37°C dans une plaque à 24 puits préalablement recouverte de 20µg/mL de rétronectine (Takara). L'IL-2 a été ajouté à une concentration finale de 20ng/ml avant incubation pendant une nuit à 37°C. Le lendemain, les cellules ont été lavées et cultivées pendant 3 jours avec 20ng/ml d'IL-2, 12,5ng/ml d'IL-7 et 50ng/ml d'IL-15. L'efficacité de transduction a été déterminée par analyse de la fluorescence d'Ametrine par cytométrie en flux.

3.3.7 Essais de prolifération cellulaire

Trois jours après la transduction, les cellules T OT-I ont été marquées avec 3µM de CFSE dilué dans du PBS supplémenté avec 5% de FBS, puis ont été incubées pendant 20 minutes à température ambiante. Après l'incubation, les cellules ont été lavées dans du PBS froid contenant 5% de FBS puis incubées à 37°C pendant 15 minutes afin de favoriser le clivage du CFSE par les estérases intracellulaires. Les cellules marquées au CFSE ont ensuite été stimulées en utilisant des cellules présentatrice d'antigène. Pour nos analyses, nous avons produit une lignée cellulaire RAW267.4 qui présente de manière constitutive le peptide SIINFEKL restreint à H2-K^b. Les cellules RAW expriment également mCherry, ce qui nous permet de les exclure dans nos analyses. Les RAW sont légèrement fixés dans 1% de PFA pendant 10 minutes avant la co-culture avec les cellules T OT-I pour inhiber la croissance cellulaire pendant le test de prolifération. Les cellules

OT-I et les RAW ont été co-cultivés à un ratio de 3:1 respectivement, à une densité de 50 000 cellules T par puits dans une plaque à 96 puits à fond rond.

La co-culture est réalisée dans des milieux de culture de cellules T (RPMI, 10% FBS, 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine, 1mM de pyruvate de sodium, 0.01 mM β-mercaptoéthanol, 10mM HEPES pH 7.4 et 2ng/ml d'IL-2). Pour mesurer la prolifération cellulaire, nous avons analysé le pourcentage de cellules positives pour l'Ametrine à chaque jour d'activation. Nous avons normalisé les données en fonction du pourcentage de cellules shScr positives à l'Ametrine à chaque jour d'analyse. Pour déterminer le niveau de prolifération cellulaire par marquage CFSE, nous avons multiplié le pourcentage de cellules pour chaque division cellulaire par 2^n (où n définit le nombre de divisions cellulaires) pour obtenir le nombre de cellules totales relatives par nombre de divisions cellulaires. Nous additionnons ensuite toutes les cellules de chaque division cellulaire pour obtenir le nombre total de cellules divisées. Enfin, nous avons obtenu le facteur de prolifération en normalisant les données à la condition shScr.

3.3.8 Essais d'influx de calcium

Les cellules T OT-I ont été marquées pendant 15 minutes à température ambiante avec 0.1 µM de Fluo-4 AM (ThermoFisher Scientific) dilué dans du PBS. Après une étape de lavage, les cellules ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante pour le clivage du Fluo-4 AM par les estérases intracellulaires. Les cellules ont été lavées et ont été maintenues sur glace jusqu'à l'analyse. Les cellules ont été équilibrées à température ambiante pendant 10 minutes, puis ont été marquées avec 1:500 d'Annexine-V et 1:1000 Propidium Iodide (eBiosciences) pendant 5 minutes à température ambiante. Tous les marquages avec l'Annexine-V ont été effectués dans un tampon de liaison à l'Annexine-V (eBiosciences) supplémenté avec 0.5% de FBS. Les cellules ont été stimulées avec du DMSO ou 2µM d'ionomycine à température ambiante, et la fluorescence a été enregistrée après 10 minutes de stimulation.

3.3.9 Isolation des ARNs et qPCR

Les cellules primaires transduites ont été triées sur l'expression du marqueur fluorescent Ametrine avec un trieur de cellules BD FACSAriaII (Becton Dickinson). L'ARN a été extrait après le tri cellulaire avec le kit RNeasy Mini (Qiagen) selon le protocole du fabricant. L'ARN extrait a été

transcrit de manière inverse avec le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Le PCR en temps réel a été réalisé sur l'ADN complémentaire en utilisant le Advanced qPCR MasterMix (Wisent) supplémenté avec le marqueur de référence ROX (Life Technologies) et un système de PCR en temps réel StepOne Plus (Applied Biosciences). Les amorces pour *Tmem16f* sont 5' - GCAGCCCTTGGATCTTATCA - 3' pour sens et 5' - TGCTGTAGCTCAACGGTGTC - 3' pour antisens. Les amorces pour le gène de référence *Hprt* sont 5' - TCCTCCTCAGACCGCTTTT - 3' pour sens et 5' - CCTGGTTCATCATCGCTAATC - 3' pour antisens. Les niveaux d'ARN messagers relatifs de *Tmem16f* sur *Hprt* ont été déterminés par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.3.10 Infection au *Listeria monocytogenes*

1×10^6 total de cellules OT-I isolées de souris CD45.2 et transduites avec shScr-Ametrine et shTMEM16F-Thy1.1 ont été co-injectées dans des souris C57BL/6.SJL CD45.1. 24 heures suivant le transfert adoptif des cellules T, une dose sub létale de 2×10^3 unités de formation de colonies (UFC) de *Listeria monocytogenes* exprimant OVA (Lm-OVA) a été injectée de manière intraveineuse pour l'analyse de la réponse des lymphocytes T primaires. Cinq jours suivant l'infection, les rates ont été isolées. Les lymphocytes T CD8+ ont été isolés avec le kit d'isolement des cellules T MojoSort Mouse CD8+ tel que décrit précédemment.

3.3.11 Cytométrie en flux

Les cellules OT-I transduites ont été analysées à chaque jour suivant l'activation in vitro avec les anticorps Thy1.1 clone OX-7 (BioLegend), CD44 clone IM7 (BioLegend), CD62L clone MIL-14 (BioLegend), CD69 clone H1.2F3 (BioLegend). La moyenne géométrique de fluorescence du marquage a été normalisée sur les cellules non-transduites. Pour les expériences d'infection au Lm-OVA, les cellules infectées ont été identifiées par marquage de surface avec CD45.2 clone 104 (BioLegend), CD8 α clone 5.3-6.7 (BioLegend). Les cellules ont été marquées avec les marqueurs d'activation ou de différenciation CD127 clone A7R34 (BioLegend), KLRG1 clone 2F1 (eBioscience), CD44 clone IM7 (BioLegend), CD62L clone MIL-14 (BioLegend), CD69 clone H1.2F3 (BioLegend) et Ly6C clone HK1.4 (BioLegend). Les marquages de surface ont été réalisés dans une solution FACS (PBS, 2mM EDTA, 10mM HEPES pH 7.4, 0.5% FBS) pendant 30 minutes à 4°C.

Pour le marquage anti-caspase-3 activée, les cellules ont été préalablement marquées avec l'anti-Thy1.1 pendant 30 minutes sur glace puis ont été lavées. Les cellules ont été fixées avec le Cytofix (BD Biosciences) pendant 20 minutes sur glace. Les cellules ont été lavées deux fois avec de la solution Perm/Wash (BD Biosciences). Les cellules ont été marquées pendant 30 minutes sur glace avec l'anti-caspase-3 activée clone C92-605 (BD Biosciences) dilué dans la solution Perm Wash. Les cellules ont été lavées deux fois et maintenues dans la solution Perm/Wash sur glace jusqu'à l'analyse par cytométrie en flux. Toutes les expériences de cytométrie en flux réalisées sur un cytomètre en flux ZE-5 (BioRad) ou LSR Fortessa (Becton Dickinson), et analysées avec FACSDiva (Becton Dickinson) et FlowJo (TreeStar).

3.3.12 Analyses statistiques

Toutes les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. Le nombre d'échantillons et de répétitions expérimentales est indiqué dans la légende des figures par n. La signifiante statistique a été analysée avec Prism 7 (GraphPad) et le test utilisé est indiqué dans chaque figure. La signifiante statistique a été considérée lorsque $p < 0.05$. Les légendes des figures incluent les valeurs p.

3.4 Résultats

3.4.1 L'expression de TMEM16F est régulée lors du développement des thymocytes

Des études préalables ont démontré que le développement des lymphocytes T issus des souris *Tmem16f*^{-/-} est normal. Le marquage des thymocytes avec CD4 et CD8 démontre que la fréquence et le nombre absolu de chaque population de cellules sont identiques aux souris sauvages [368, 374]. Nos résultats démontrent que TMEM16F régule l'amplification de l'activation des cellules T. La signalisation du TCR résultant de l'interaction des thymocytes avec les pCMHs du soi présentés par les cellules épithéliales du thymus permet de sélectionner les thymocytes exprimant les TCRs tolérants au soi. Toutefois, à ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur l'efficacité de la sélection positive ou négative dans les thymocytes issus des souris *Tmem16f*^{-/-}.

Nous avons vérifié le niveau d'expression d'ARN messagers de *Tmem16f* à différents stades de développement des lymphocytes T à partir des données de la banque Immgen [375]. Les données d'Immgen ont été initialement obtenues par Mingueneau *et al*, 2013, chez des thymocytes isolés de souris sauvages C57BL/6J [376]. L'expression de *Tmem16f* augmente graduellement du stade DN1 jusqu'à atteindre un maximum d'expression au stade DN4 et DP. L'expression de *Tmem16f* chez les thymocytes DN4 et DP est six fois plus élevée que l'expression chez les DN1. CD69 est un marqueur de cellules activées chez les thymocytes et les lymphocytes T matures. L'expression de CD69 augmente de manière graduelle lors de la sélection positive [377]. La transition du stage DP au stage DP CD69+ est associée à des changements transcriptionnels majeurs reliés à la signalisation du TCR [376]. L'expression de *Tmem16f* diminue au cours de la sélection positive et s'établit à un niveau similaire aux thymocytes DN2 chez les cellules SP et naïves (**Figure 1A**).

La régulation dynamique de l'expression de *Tmem16f* lors du développement des thymocytes ainsi que son importance dans l'amplification de la signalisation du TCR suggère que TMEM16F serait requis durant le développement et la sélection des thymocytes.

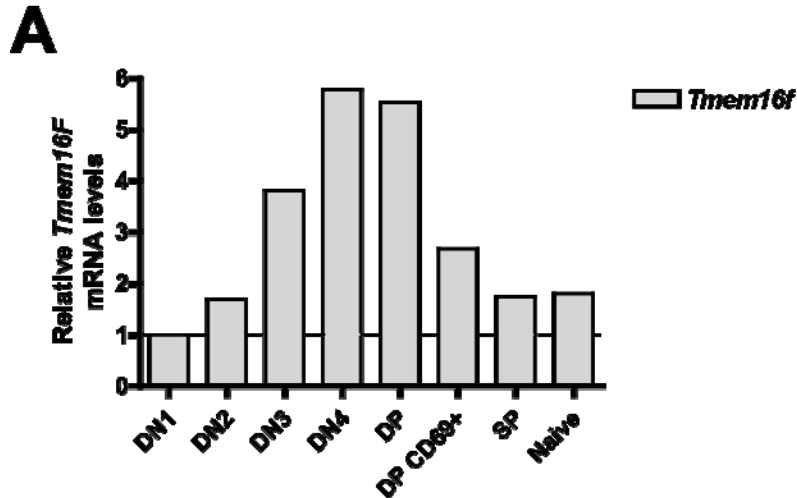


Figure 1. – Modulation de l’expression de *Tmem16F* durant le développement des lymphocytes T

(A) Le niveau d’expression de *Tmem16f* dans les thymocytes issus de souris sauvages (C57BL/6J) obtenu de la banque de données Immgen à partir des données de Mingueneau *et al*, 2013. Le niveau d’ARN messagers exprimant *Tmem16f* a été déterminé par microarray avec la sonde 10426479 [375, 376].

3.4.2 Modulation de l’expression de TMEM16F lors de l’activation des lymphocytes T

Nous avons démontré que TMEM16F régule l’amplification de l’activation des cellules T au niveau de l’activation des TCRs. Afin de déterminer si TMEM16F est requis tout au long de la réponse immunitaire, nous avons étudié les niveaux d’expression de *Tmem16f* suivant l’activation de lymphocytes T murins primaires. Le modèle de souris *Rag1*^{-/-} OT-I est un modèle murin établi où les lymphocytes T expriment un TCR transgénique restreint au peptide Ovalbumine, OVA₂₅₇₋₂₆₄ ou SIINFEKL, présenté par H2-K^b. L’absence de RAG1 prévient le réarrangement des gènes du TCR endogène et permet l’expression du TCR OT-I transgénique sur toutes les cellules T de la souris. Par la restriction du TCR OT-I au H2-K^b, seuls des lymphocytes T CD8⁺ se développent chez les souris *Rag1*^{-/-} OT-I.

Les lymphocytes T CD8⁺ isolés des souris *Rag1*^{-/-} OT-I ont été placés en culture avec des cytokines afin de maintenir leurs signaux de survie. Il a été démontré que la culture de lymphocytes T primaires naïfs avec les cytokines homéostatiques IL-7 et IL-15 facilite leur transduction [378]. Les cellules T primaires ont été également maintenues en culture en présence d'IL-2 afin de promouvoir leur prolifération lors de la stimulation [379]. Les cellules OT-I ont été stimulées in vitro avec la lignée de macrophages RAW exprimant le peptide OVA sur H2-K^b. Nous avons isolé l'ARN des cellules T chaque jour suivant l'activation pour des expériences de qPCR (**Figure 2A**). Les niveaux d'expression d'ARN messagers de *Tmem16f* indiquent une diminution importante de son expression dans les 24 premières heures d'activation in vitro. Puis, la diminution de l'expression est maintenue tout au long de l'expérience d'activation (**Figure 2B**).

Les données d'Immgen, initialement publiées par Best *et al* en 2013, démontrent une perte d'expression de *Tmem16f* chez des lymphocytes T OT-I effecteurs isolés de la rate de souris infectées avec le pathogène intracellulaire *Listeria monocytogenes* exprimant le peptide OVA (Lm-OVA) [375, 380]. Six jours suivant l'infection, l'expression de *Tmem16f* se rétablit au niveau des lymphocytes T OT-I naïfs (**Figure 2C**). Nos résultats et ceux de la banque de données Immgen indiquent que l'expression de *Tmem16f* est modulée suivant l'activation des lymphocytes T primaires périphériques. De plus, ces résultats suggèrent que la redistribution de PS par TMEM16F pourrait être essentielle à la stimulation des lymphocytes T, mais dispensable une fois les cellules T activées.

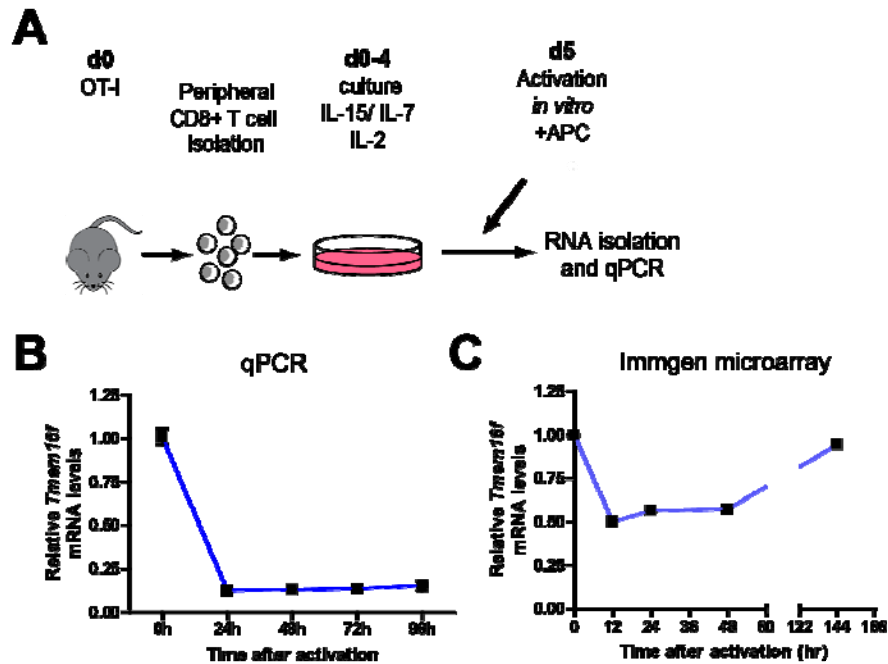


Figure 2. – Diminution de l’expression de *Tmem16f* suivant l’activation de lymphocytes T primaires murins

(A) Les lymphocytes T périphériques de souris OT-I ont été isolés et activés par des RAW présentant le peptide OVA sur H2-K^b. Les cellules T ont été activées à un ratio 3:1 de cellules T à cellules RAW. L’ARN des cellules T a été isolé suivant chaque jour d’activation in vitro. (B) L’expression de *Tmem16f* a été déterminée par qPCR et le niveau d’expression relatif de *Tmem16f* a été déterminé par le ratio sur le gène rapporteur *Hprt*. N = 3 expériences indépendantes. (C) Le niveau d’expression de *Tmem16f* (obtenu de la banque de données Immgen à partir des données de Best *et al*, 2013) dans les lymphocytes T CD8+ issus de la rate de souris OT-I suivant une infection avec *Listeria monocytogenes*-OVA. Le niveau d’ARN messagers exprimant *Tmem16f* a été déterminé par microarray avec la sonde 10426479 [375, 380].

3.4.3. TMEM16F est la scramblase calcium-dépendante dominante chez les lymphocytes T murins

Nous avons observé que TMEM16F est requis pour l’activation de la lignée de cellules T Jurkat (article au Chapitre 2) et que son expression est modulée tôt suivant la stimulation. Afin d’étudier le rôle de TMEM16F dans l’activation des lymphocytes T murins, nous avons établi un

protocole de transduction de lymphocytes T naïfs. Les lymphocytes T périphériques ont été récoltés à partir de la rate et des ganglions de souris *Rag1*^{-/-} OT-I. Les cellules T ont été transduites avec une MOI de 15 avec du lentivirus codant pour une séquence contrôle (shScr) ou pour TMEM16F (shTMEM16F) et exprimant le marqueur fluorescent Ametrine [378] (**Figure 3A**). 72 heures suivant la transduction, les niveaux d'Ametrine ont été vérifiés par cytométrie en flux. Nous avons obtenu des pourcentages de transduction de lymphocytes T naïfs d'environ 4-8% avec notre protocole (**Figure 3B**).

Avant l'activation avec le peptide OVA, nous avons voulu confirmer l'observation que TMEM16F est la scramblase calcium-dépendante la plus dominante chez les lymphocytes T murins [368]. Nous avons stimulé les cellules shScr et shTMEM16F avec de l'ionomycine. Nous avons suivi l'entrée de calcium par marquage intracellulaire au Fluo-4 et la redistribution de PS par marquage de surface avec de l'Annexine-V. Nous observons une redistribution robuste de la PS dans les cellules shScr stimulées à l'ionomycine. La diminution de l'expression de TMEM16F abolit la redistribution de la PS. L'absence de marquage de surface de PS n'est pas le résultat d'un défaut d'entrée de calcium, puisque le marquage Fluo-4 entre les cellules shScr et shTMEM16F est identique (**Figure 3C**).

Afin de confirmer la diminution de l'expression de TMEM16F, nous avons trié les lymphocytes T exprimant Ametrine pour du qPCR. Les cellules OT-I ont été activées pendant 48 heures avant le tri afin de permettre leur expansion. L'activation des lymphocytes T permet d'obtenir une quantité de cellules suffisantes pour l'isolation d'ARN et le qPCR. Nos résultats de qPCR confirment la diminution d'expression de *Tmem16f* par transduction d'un ARN interférant chez les lymphocytes T OT-I primaires (**Figure 3D**). En conclusion, notre protocole de transduction des lymphocytes T murins périphériques nous permet d'exprimer des ARNs interférants dans des cellules T primaires naïves. Par l'absence de redistribution de PS suivant une stimulation avec de l'ionomycine, nous confirmons que TMEM16F est la scramblase calcium-dépendante dominante chez les lymphocytes T murins.

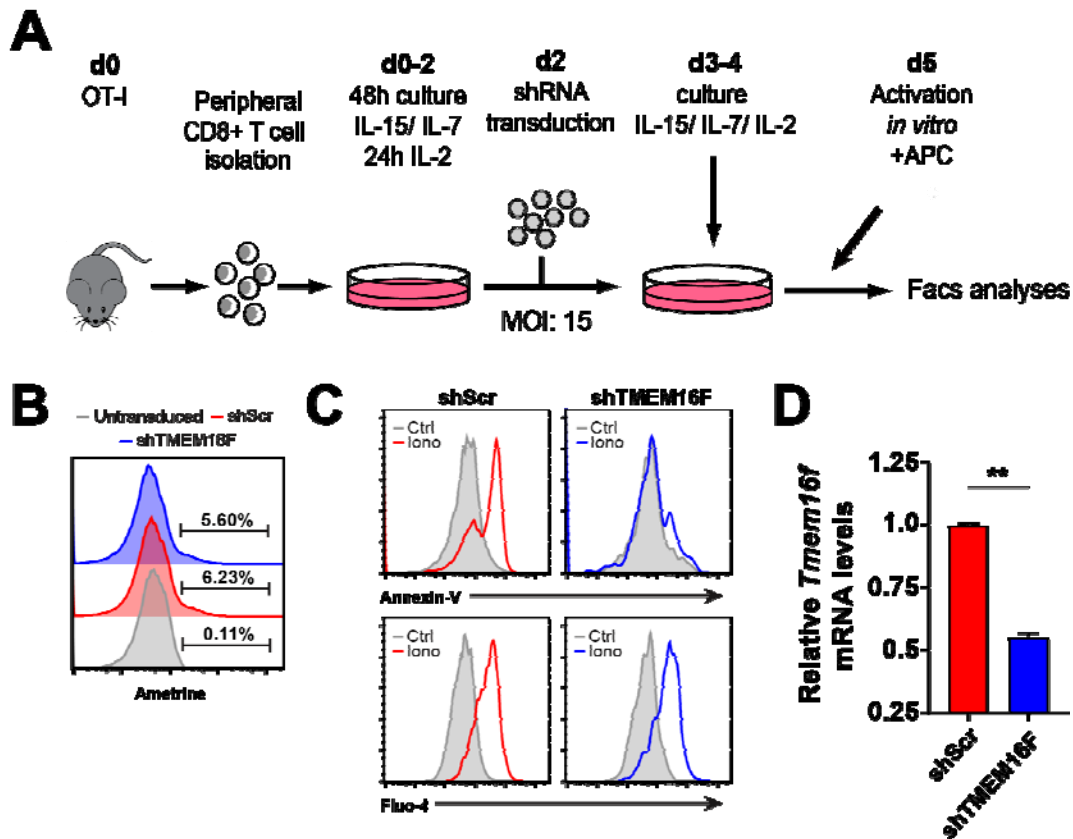


Figure 3. – Redistribution calcium-dépendante de la PS par TMEM16F chez les lymphocytes T murins

(A) Protocole de transduction des lymphocytes T OT-I avec shScr ou shTMEM16F et activation *in vitro*. (B) Expression d’Ametrine des cellules non-transduites, shScr et shTMEM16F déterminé 72 heures suivant la transduction. (C) Les cellules shScr et shTMEM16F ont été marquées avec l’indicateur de calcium Fluo-4 et de l’Annexine-V. Les cellules ont été stimulées pendant 5 minutes avec 2 μ M d’ionomycine. Les graphiques démontrent les cellules exprimant shScr et shTMEM16F (Ametrine⁺). N = 2 expériences indépendantes. (D) Les cellules OT-I transduites avec shScr et shTMEM16F ont été activées pendant 48 heures à un ratio de 3 :1 avec des RAW exprimant le peptide OVA sur H2-K^b. Les cellules ont été triées sur l’expression d’Ametrine et l’expression de *Tmem16f* a été déterminée par qPCR. Le niveau d’expression relatif de *Tmem16f* a été déterminé par le ratio sur le gène rapporteur *Hprt*. La signifiante statistique a été déterminée par test t de Student bilatéral non apparié, N =2 expériences indépendantes, ** p < 0.01.

3.4.4 TMEM16F régule la persistance des lymphocytes T activés

Afin de déterminer l'impact de la diminution de l'expression de TMEM16F sur l'activation des lymphocytes T primaires *in vitro*, nous avons suivi le pourcentage de cellules shScr et shTMEM16F dans le temps. Nous avons déterminé le pourcentage de cellules exprimant Ametrine (Ame+) avant activation (T_0) et dans le temps (T_x). En faisant le ratio du pourcentage de cellules Ame+ avant activation ($Ame+ T_x/Ame+ T_0$), nous observons une diminution graduelle du pourcentage de cellules shTMEM16F (**Figure 4A, B**). En contraste, le pourcentage de cellules shScr est stable dans le temps. En normalisant le pourcentage de cellules Ame+ sur les cellules shScr, nous observons une diminution constante du pourcentage de cellules shTMEM16F après 24 heures d'activation. Après 5 jours d'activation, les cellules shTMEM16F ont presque disparu du bassin de cellules activées, tandis que les shScr persistent (**Figure 4C**). Ainsi, l'expression de TMEM16F est requise pour la persistance des lymphocytes T primaires murins après l'activation.

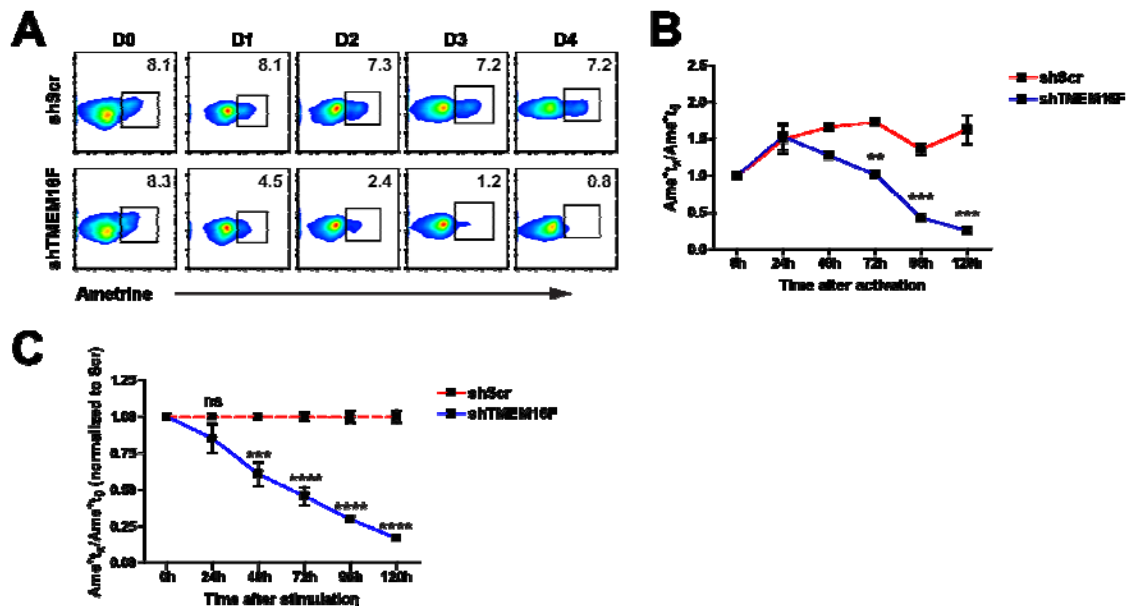


Figure 4. – Réduction de la population des lymphocytes T shTMEM16F suivant leur activation

(A)(B) Les cellules OT-I transduites avec shScr et shTMEM16F ont été activées à un ratio de 3 :1 avec des RAW exprimant le peptide OVA sur H2-K^b. Le pourcentage de cellules Ametrine+ a été

suivi par cytométrie en flux à chaque jour d'activation. **(C)** Le pourcentage de cellules Ametrine+ normalisé sur les cellules shScr. La signifiante statistique a été déterminée par analyse de variance bilatérale avec test de Bonferroni, N > 3 expériences indépendantes, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001, ns = non-significatif.

3.4.5 TMEM16F amplifie l'expansion des lymphocytes T

Nous avons suivi la division des lymphocytes T primaires par marquage CFSE afin de déterminer si la perte des cellules shTMEM16F était la conséquence d'une diminution de leur prolifération. Le CFSE est un marqueur intracellulaire qui se dilue à chaque division, permettant d'étudier le nombre de divisions des lymphocytes T suivant leur activation. Les cellules ont été marquées au CFSE et ont été activées in vitro avec les RAW-OVA. Après 48 heures d'activation, nous avons déterminé le pourcentage de cellules pour chaque division selon le marquage CFSE (**Figure 5A**). Puisque les cellules transduites ne sont pas triées, nous avons déterminé le nombre de division des cellules non-transduites, qui n'expriment pas Ametrine, en générant des bornes selon l'intensité du marquage CFSE. Nous n'avons pas observé de différences dans les divisions des cellules non-transduites pour les populations shScr et shTMEM16F, indiquant que les conditions d'activation sont comparables (**Figure 5A**). Nous avons ensuite appliqué les bornes générées avec les cellules non-transduites sur les cellules transduites exprimant Ametrine. Le pourcentage de cellules dans chaque borne nous a permis de déterminer le facteur de prolifération des lymphocytes T (**Figure 5B, C**). Malgré que nous n'observons pas une diminution significative de la population exprimant Ametrine chez les cellules shTMEM16F suivant 24 heures d'activation (**Figure 4C**), nous observons un plus faible facteur de prolifération avec le marquage CFSE (**Figure 5C**). Suivant 48 heures d'activation, l'écart de prolifération des cellules shTMEM16F en comparaison avec les cellules shScr se trouve augmenté (**Figure 5C**), ce qui corrèle avec la diminution de la population des cellules shTMEM16F Ametrine+ observé à la Figure 4C. Ainsi, nos

résultats indiquent que l'expression de TMEM16F est requise pour l'expansion des lymphocytes T suivant leur activation.

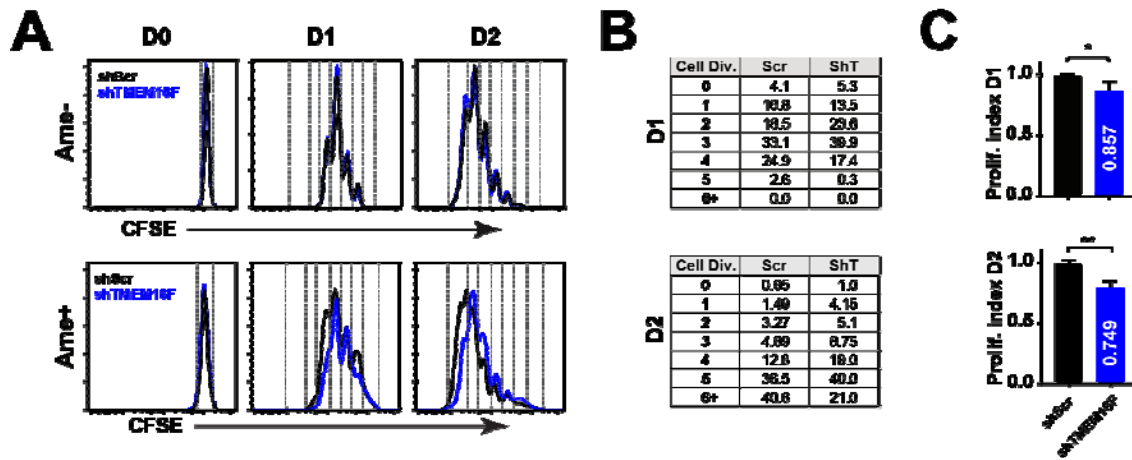


Figure 5. – Réduction de la division des cellules T shTMEM16F suivant l'activation

(A) Les lymphocytes OT-I périphériques ont été transduits avec les plasmides shScr ou shTMEM16F et ont été marqués au CFSE avant l'activation in vitro avec les RAW-OVA. La fluorescence du CFSE a été déterminée 24 (D1) et 48 (D2) heures après l'activation par cytométrie en flux. Le nombre de divisions a été déterminé selon les populations présentes dans chaque borne à partir des cellules non-transduites (Amc-) pour shScr et shTMEM16F. Les bornes ont été appliquées aux cellules transduites (Amc+) pour shScr et shTMEM16F afin d'obtenir le pourcentage de cellules présentes dans chaque borne. **(B)** Le pourcentage de cellules dans chaque borne de CFSE pour les cellules shScr (Scr) et les cellules shTMEM16F (ShT). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. **(C)** Le facteur de prolifération des cellules shScr et shTMEM16F après 24 et 48 heures d'activation. La signifiante statistique a été déterminée par test t de Student bilatéral non apparié, N = 2 expériences indépendantes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.4.6 TMEM16F régule la survie des lymphocytes T activés

Puisque nous avons observé une réduction massive de la population de cellules T shTMEM16F suivant la stimulation in vitro, nous avons voulu étudier si la perte des cellules

shTMEM16F est causée par leur élimination par apoptose. Les caspases sont des protéases activées par clivage lors de l'apoptose. Une caspase majeure du processus apoptotique est la caspase 3, qui clive plusieurs autres caspases ainsi que différents substrats cellulaires [30]. Nous avons étudié l'apoptose dans les lymphocytes T primaires par marquage intracellulaire de la caspase 3 clivée (anti-caspase 3 activée). Nos résultats préliminaires démontrent une augmentation de la population marquée à la caspase 3 activée dans les cellules shTMEM16F en comparaison avec les cellules shScr (**Figure 6A, B**). Le pourcentage de cellules shTMEM16F positives pour la caspase 3 activée augmente après 24 heures d'activation, ce qui suit la perte des cellules shTMEM16F que nous observons après 24 heures d'activation à la Figure 4. En contraste, l'absence de cellules apoptotiques dans la population shScr est consistante avec la persistance de ces cellules suivant l'activation in vitro. Ainsi, nos résultats préliminaires suggèrent que la diminution de l'expression de TMEM16F réduit la survie des lymphocytes T suivant leur activation.

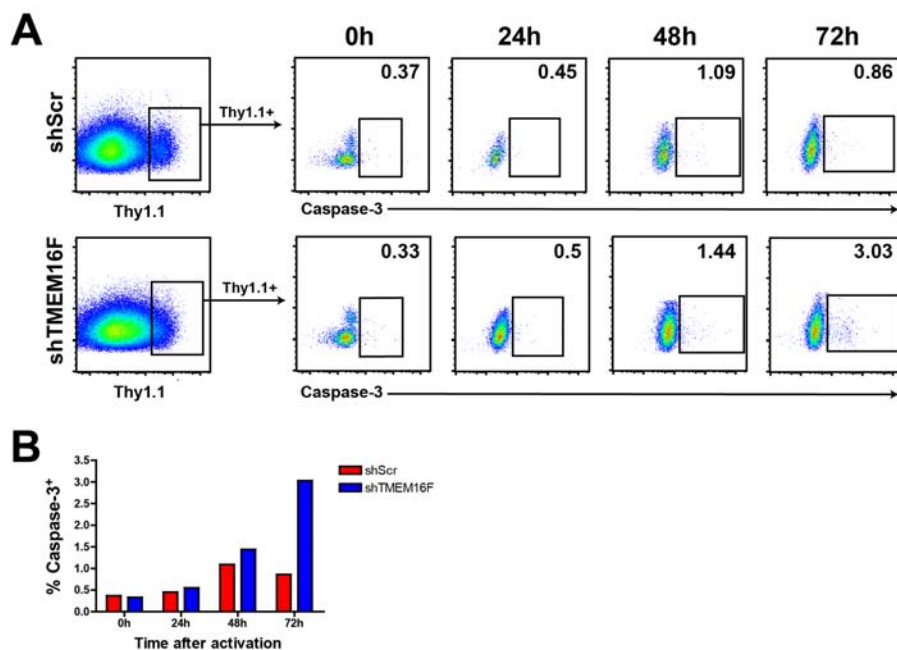


Figure 6. – Augmentation de la population de cellules apoptotiques dans les cellules shTMEM16F activées

(A) Les cellules transduites avec shScr ou shTMEM16F exprimant le marqueur de surface Thy1.1 ont été activées in vitro avec des RAW présentant OVA sur H2-K^b à un ratio 3:1. À chaque jour d'activation, les cellules ont été marquées en surface par Thy1.1 puis fixées et perméabilisées pour le marquage intracellulaire avec l'anti-caspase 3 activée. **(B)** Pourcentage de cellules shScr et shTMEM16F exprimant l'anti-caspase 3 activée. N = 1 expérience indépendante.

3.4.7 TMEM16F n'influence pas le phénotype d'activation in vitro

Nous avons observé que TMEM16F régule l'amplification de l'activation des cellules T Jurkat. Afin de déterminer le rôle de TMEM16F dans l'amplification de l'activation des lymphocytes T murins primaires, nous avons étudié les marqueurs d'activation des cellules T dans les cellules shScr et shTMEM16F à chaque jour d'activation in vitro.

L'activation des lymphocytes T résulte en la modulation de plusieurs marqueurs de surface. Les lymphocytes T activés expriment la lectine de type C CD44, qui se lie à l'acide hyaluronique des cellules endothéliales vasculaires [213]. L'expression de la lectine de type C CD69 est également augmentée dans les trois jours suivant la stimulation des lymphocytes T. L'expression élevée de CD69 antagonise le récepteur S1P₁, permettant de retenir les lymphocytes aux organes lymphoïdes secondaires pour leur maturation et leur prolifération. La diminution de l'expression de CD69 sur les lymphocytes T matures permet leur sortie vers la périphérie [47, 210]. Enfin, l'activation des lymphocytes T diminue l'expression de CD62L afin de diminuer la recirculation aux organes lymphoïdes secondaires [211].

Tel qu'attendu, nous avons observé une augmentation robuste de l'expression de CD44 et de CD69 suivant l'activation des cellules shScr et shTmem16f. De plus, nous observons une diminution de l'expression de CD62L suivant l'activation (**Figure 7A**). Étant donné que le marquage de CD69 et CD62L démontre une activation de toute la population de cellules, nous avons seulement étudié leur niveau d'expression. Nous n'avons pas observé de différences dans le niveau d'expression (moyenne géométrique) dans les marqueurs d'activation CD44, CD69 et CD62L entre les cellules T primaires shScr et shTMEM16F activées in vitro (**Figure 7B**).

Ainsi, la perte de la population shTMEM16F, la diminution de leur expansion et l'augmentation de la fréquence de cellules apoptotiques suivant l'activation in vitro ne sont pas

le résultat d'un défaut dans l'activation. Toutefois, nous avons seulement étudié l'expression des marqueurs d'activation à 24 heures post-stimulation. Nous avons précédemment démontré que la diminution de l'expression de TMEM16F entraîne une réduction de la phosphorylation des molécules de signalisation TCR-proximales. Ainsi, il est possible que les cellules shTMEM16F démontrent un retard initial d'activation que nous n'observons plus à 24 heures post-stimulation. Afin de mieux comprendre le rôle de TMEM16F dans l'activation des cellules primaires murines dans un contexte plus physiologique, nous avons étudié la différenciation et l'activation des cellules shTMEM16F dans un modèle in vivo.

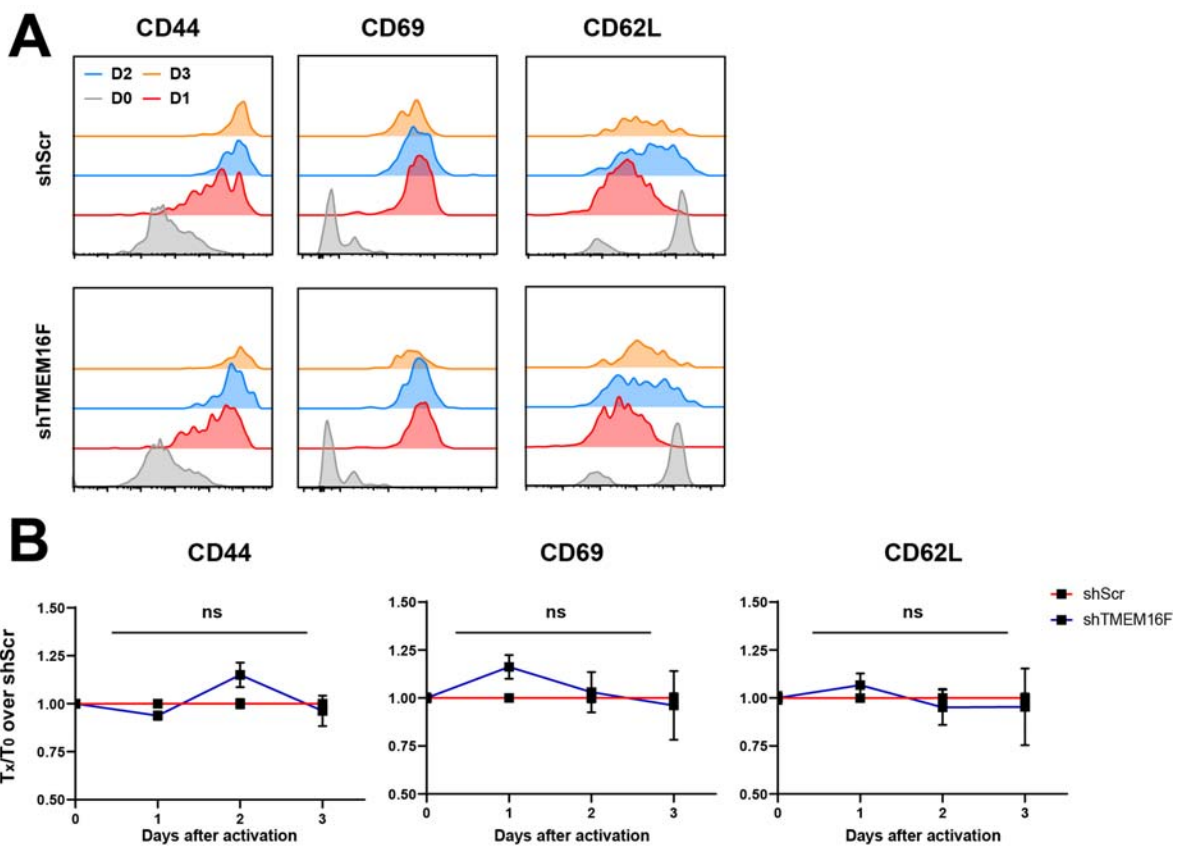


Figure 7. – Aucun défaut dans l'expression des marqueurs d'activation suivant l'activation in vitro des cellules shTMEM16F

(A) Les cellules shScr et shTMEM16F transduites ont été activées in vitro à un ratio 3:1 avec des RAW présentant OVA sur H2-K^b. À chaque jour d'activation, les cellules ont été marquées en surface avec CD44, CD69 et CD62L. **(B)** Niveau d'expression (moyenne géométrique) des

marqueurs d'activation à chaque jour d'activation selon l'expression au jour 0. L'expression a été normalisée sur les cellules shScr. La signifiante statistique a été déterminée par analyse de variance bilatérale avec test de Bonferroni. N = 3 expériences indépendantes, ns = non-significatif.

3.4.8 La diminution de l'expression de TMEM16F maintient les lymphocytes T effecteurs dans un phénotype immature

Nous avons observé des défauts d'activation des cellules Jurkat exprimant un ARN interférant contre TMEM16F. Il a été démontré que les lymphocytes T se différencient en sous-types distincts de cellules effectrices dépendamment des signaux d'activation qu'elles reçoivent [208]. Nous avons collaboré avec le groupe de Nathalie Labrecque afin d'étudier la différenciation des cellules T shTMEM16F primaires lors d'une réponse immunitaire protectrice contre un pathogène intracellulaire. Nous avons co-transféré les cellules T shScr (Ametrine) et shTMEM16F (Thy1.1) dans des souris congéniques sauvages. Le lendemain, les souris ont été infectées avec une dose sublétales de *Listeria monocytogenes* exprimant le peptide OVA (Lm-OVA) (**Figure 8A**). Nous avons ensuite étudié la différenciation des cellules effectrices avec les marqueurs de surface KLRG1 et CD127 (IL-7R α).

Lors d'une infection au Lm-OVA, les populations de cellules effectrices commencent à apparaître dans la rate au jour 3 sous forme de EEC et de T_{EFF}. À jour 5, les cellules T_{MP} émergent, mais les populations dominantes restent les EECs et les T_{EFF}. À jour 8, la population EEC devient négligeable tandis que les T_{EFF} atteignent un pic et composent 75% de la population effectrice totale. L'infection à *L. monocytogenes* est éliminée en environ 7 à 10 jours. Enfin, après 21 jours d'infection, la population T_{MP} CD127⁺KLRG1⁻ devient dominante et persiste afin de former le bassin de cellules mémoires [208]. L'expression de CD127 est essentielle à la survie des lymphocytes mémoires par voie IL-7-dépendante [194]. Nous avons choisi d'étudier la différenciation des cellules effectrices au jour 5 de l'infection dans la rate, où la bactérie *L. monocytogenes* se dissémine suivant une infection par voie intraveineuse [381] (**Figure 8A**). À ce point temporel, toutes les populations de cellules effectrices ont émergé, nous permettant d'étudier l'impact de la diminution de l'expression de TMEM16F sur la réponse immunitaire.

Après 5 jours d'infection, nous avons observé dans la rate une réduction du pourcentage des cellules shTMEM16F en comparaison avec les cellules shScr (**Figure 8B, C**). Cette diminution récapitule celle que nous avons observée lors de nos expériences d'activation *in vitro*, confirmant que TMEM16F est requis à la persistance des cellules T primaires activées. Nous observons également une diminution de la proportion des cellules shScr en comparaison avec les cellules non-transduites, ce qui pourrait être attribué à une réduction de viabilité ou de capacité d'expansion due à la transduction lentivirale [379]. De plus, en absence de TMEM16F, nous observons une augmentation de la population de cellules effectrices immatures EEC (KLRG1⁻ et CD127⁻) (**Figure 8D, E**). Les EECs sont les précurseurs des populations effectrices T_{EFF} et T_{MP} [208]. Une augmentation dans la proportion de cellules EEC pourrait indiquer un délai dans la différenciation et dans l'activation des cellules shTMEM16F.

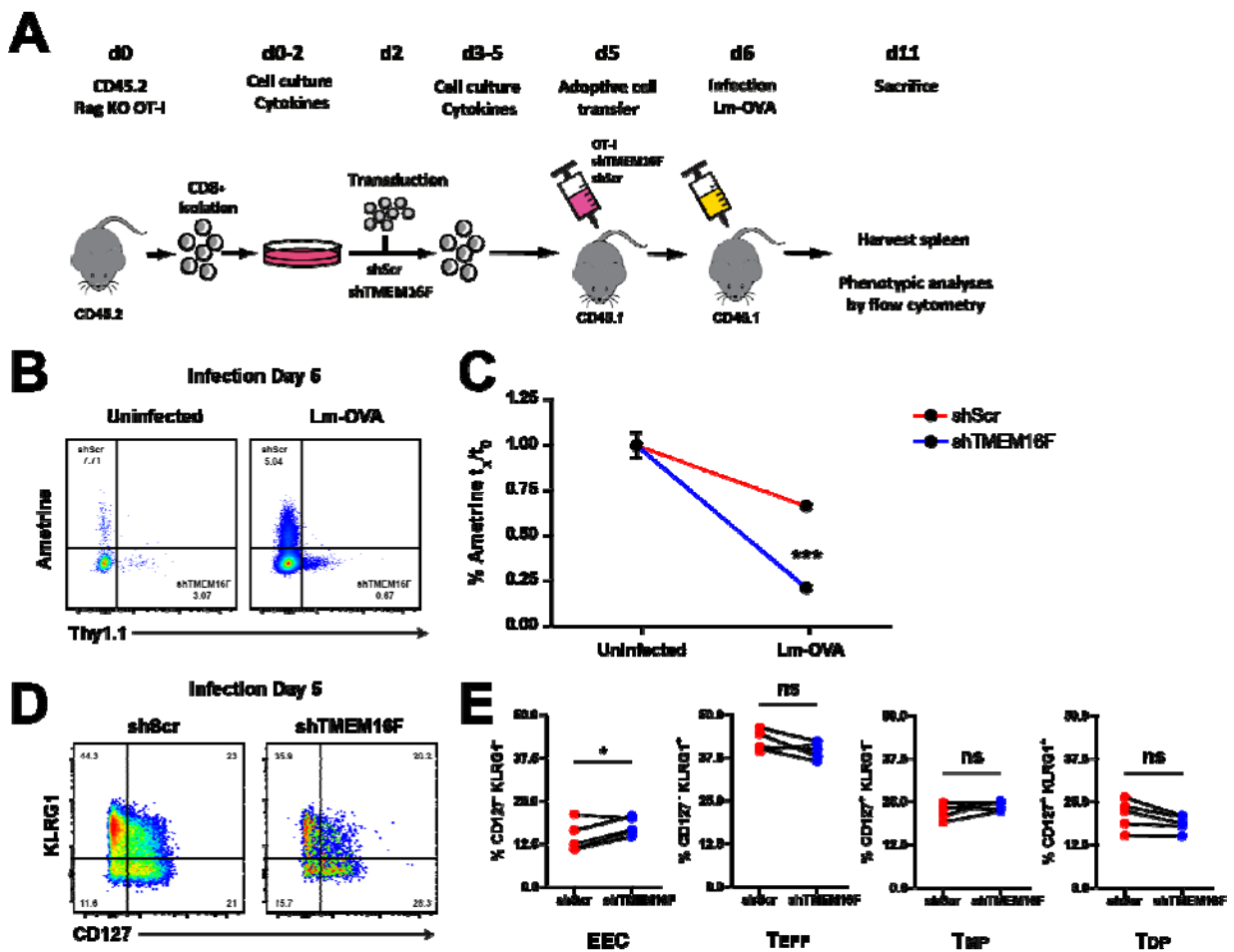


Figure 8. – Les cellules shTMEM16F se différencient préférentiellement en phénotype effecteur précoce EEC

(A) Les lymphocytes T naïfs périphériques de souris *Rag1*^{-/-} OT-I CD45.2 ont été isolés et transduits avec shScr-Ametrine ou shTMEM16F-Thy1.1. Les cellules ont été co-transférées à un ratio 1 :1 dans des souris congéniques C57BL/6.SJL CD45.1. 24 heures suivant le transfert, les souris ont été infectées avec 2×10^3 UFC de Lm-OVA. Après 5 jours d'infection, les souris ont été sacrifiées et les cellules T ont été isolées des rates. **(B)** Proportion des cellules shScr-Ametrine et shTMEM16F-Thy1.1 après 5 jours d'infection pour les souris infectées et non-infectées. **(C)** Proportion des cellules shScr et shTMEM16F dans les souris infectées et non-infectées normalisée sur les souris non-infectées. **(D)** Populations effectrices de cellules shScr et shTMEM16F isolées de la rate après 5 jours d'infection au Lm-OVA et marquées avec KLRG1 et CD127. **(E)** Proportion de chaque population de cellules T effectrices pour shScr et shTMEM16F suivant 5 jours d'infection au Lm-OVA. La signifiante statistique a été déterminée par test t de Student bilatéral apparié, N = 2 souris non-infectées et 5 souris infectées, * p < 0.05, *** p < 0.001, ns = non-significatif.

3.4.9 Diminution de l'activation des cellules T shTMEM16F lors d'une réponse immunitaire protectrice

Nous n'avons pas observé de défauts dans l'expression des marqueurs d'activation suivant l'activation in vitro des cellules shTMEM16F. Puisque nous avons observé un défaut dans la différenciation des cellules T shTMEM16F effectrices lors d'une réponse immunitaire in vivo, nous avons voulu étudier l'expression des marqueurs d'activation dans le modèle d'infection au Lm-OVA. Nous avons étudié l'expression de surface des marqueurs CD69, CD44, CD62L et Ly6C dans les lymphocytes T isolés de la rate 5 jours suivant l'infection au Lm-OVA (**Figure 9A**). Les lymphocytes T activés augmentent l'expression de Ly6C, une molécule ancrée aux glycosylphosphatidylinostol à la surface de la cellule. Ly6C est impliquée dans l'adhésion aux cellules endothéliales [382].

Comme suivant l'activation in vitro, nous observons une augmentation de l'expression de CD44 et une diminution de CD62L. Après 5 jours d'infection, nous observons que la population exprimant CD69 est déjà diminuée. Ce résultat est attendu puisque l'expression de CD69 est

augmentée seulement dans les trois premiers jours d'activation [47, 210]. Enfin, tel qu'attendu, nous observons une augmentation de la population exprimant Ly6C (**Figure 9A**). Nous observons que toutes les cellules shTMEM16F expriment le marqueur CD44, indiquant qu'elles sont activées, mais elles démontrent un plus faible niveau d'expression en comparaison avec les cellules shScr. De plus, nous observons une diminution dans la proportion de cellules exprimant le marqueur Ly6C. Enfin, nous observons une fréquence plus élevée de cellules shTMEM16F exprimant CD62L et CD69. Après trois jours d'activation, les lymphocytes T activés diminuent leur expression de CD69 afin de sortir des organes lymphoïdes secondaires afin de migrer en périphérie. La fréquence plus élevée de cellules shTMEM16F CD69⁺ indique un délai dans la progression de leur état activation. Ainsi, dans les cellules shTMEM16F, nous observons une diminution de l'expression des marqueurs d'activation CD44 et Ly6C, une augmentation de l'expression du marqueur de cellules naïves CD62L ainsi qu'un délai dans la diminution de l'expression de CD69 (**Figure 9B**).

En conclusion, nous observons un délai dans la différenciation et dans l'activation des lymphocytes T transduits avec l'ARN interférant contre TMEM16F. Lors d'une réponse immunitaire contre le pathogène intracellulaire Lm-OVA, TMEM16F régule la progression de l'activation et la différenciation des lymphocytes T. Ces résultats confirment nos observations réalisées au Chapitre 2, où nous avons démontré que TMEM16F régule le passage du seuil d'activation des cellules T. L'étude de l'expression des marqueurs d'activation à différents points temporels post-infection nous permettra de mieux comprendre le délai d'activation causé par la diminution de l'expression de TMEM16F.

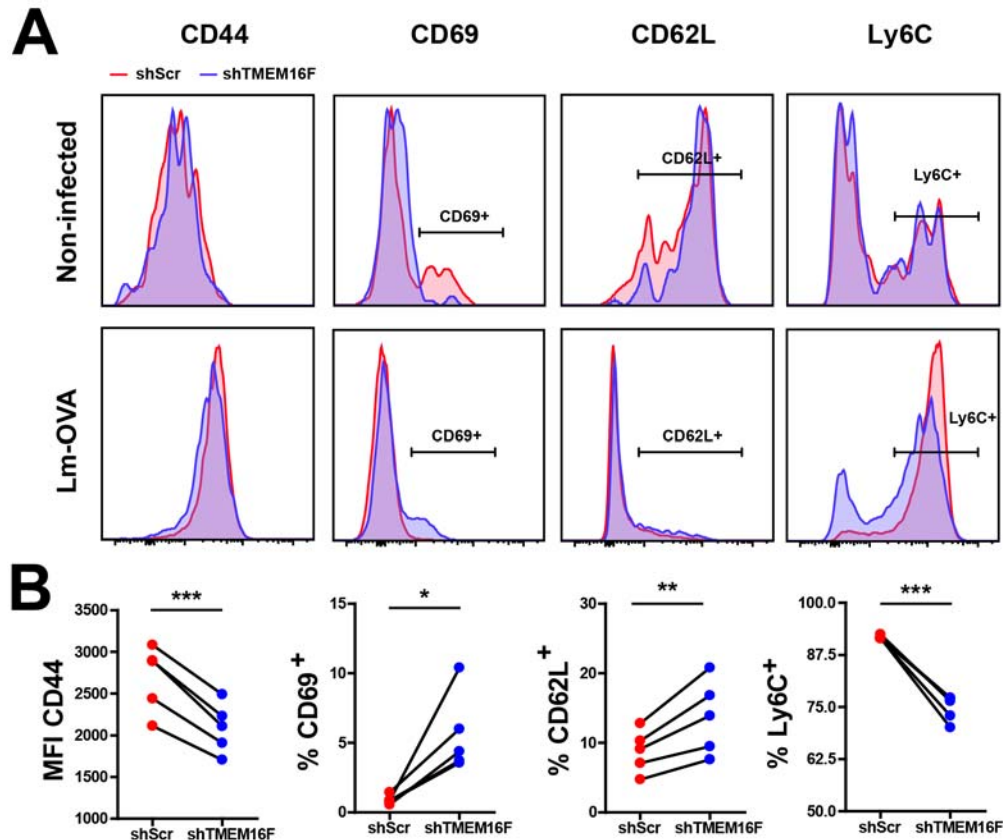


Figure 9. – Diminution de l'expression des marqueurs d'activation dans les cellules shTMEM16F

(A) Les lymphocytes T naïfs périphériques de souris *Rag1*^{-/-} OT-I CD45.2 ont été isolés et transduits avec shScr-Ametrine ou shTMEM16F-Thy1.1. Les cellules ont été co-transférées à un ratio 1 :1 dans des souris congéniques C57BL/6.SJL CD45.1. 24 heures suivant le transfert, les souris ont été infectées avec 2×10^3 UFC de *Listeria monocytogenes*-OVA. Après 5 jours d'infection, les souris ont été sacrifiées et les cellules T ont été isolées des rates. Les cellules T isolées ont été marquées en surface par CD44, CD69, CD62L et Ly6C **(B)** Niveau d'expression de CD44 et pourcentage de la population positive pour CD69, CD62L et Ly6C pour les cellules shScr-Ametrine et shTMEM16F-Thy1.1. La signifiante statistique a été déterminée par test t de Student bilatéral apparié, N = 2 souris non-infectées et 5 souris infectées, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Chapitre 4 – Discussion

La phosphorylation des ITAMs des chaînes CD3 du TCR représente la première étape de signalisation de l'activation des cellules T. Chez les lymphocytes T au repos, le TCR est maintenu inactif par la régulation stricte de la balance des kinases et des phosphatases ainsi que par l'association membranaire des domaines cytoplasmiques des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ . La stimulation du TCR induit la dissociation membranaire de CD3 ϵ et CD3 ζ , permettant le recrutement de Lck à leurs domaines BRS afin d'initier la cascade d'activation des cellules T. Plusieurs études ont proposé que l'influx de calcium généré lors de l'activation des cellules T mène à la dissociation membranaire des chaînes CD3 du TCR afin d'amplifier l'activation des cellules T. Le calcium régule l'activité de plusieurs enzymes, comme les scramblases qui redistribuent la PS à la MP.

Notre étude avait pour but d'éclaircir le rôle du calcium et des scramblases dans la l'association membranaire des chaînes CD3 du TCR et dans l'activation des cellules T. Nous avons développé une approche expérimentale afin d'étudier l'association de la chaîne CD3 ϵ du TCR à la MP. Avec cette approche, nous avons déterminé le rôle de la redistribution de la PS par la scramblase TMEM16F dans la dissociation membranaire de CD3 ϵ et dans l'amplification de l'activation des cellules T. Dans ce Chapitre, nous mettrons en contexte nos résultats avec les mécanismes connus d'activation et d'amplification de la signalisation du TCR. Enfin, nous discuterons des implications de nos résultats dans la modulation de la PS à la MP dans les immunothérapies contre le cancer.

4.1 La perte de l'asymétrie de la PS : un phénomène régulé

La PS est le phospholipide acide le plus abondant du feuillet interne de la MP. Les phospholipides acides génèrent un potentiel électrostatique négatif à la MP qui est requis pour l'association membranaire de protéines riches en résidus basiques. La distribution asymétrique de la PS à la MP est régulée de manière stricte par des flippases. La perte de l'asymétrie de la PS

est un phénomène rare observé dans quelques processus cellulaires comme l'activation des plaquettes, l'apoptose, ainsi que dans l'activation des lymphocytes T.

L'asymétrie de la PS est perturbée par les scramblases lipidiques, qui sont activées soit par le calcium ou par clivage par des caspases. TMEM16F est la scramblase calcium-dépendante dominante chez les lymphocytes T murins [368]. Dans la famille TMEM16, qui est composée de canaux ioniques et de scramblases, TMEM16F est la seule scramblase exprimée à la MP de manière ubiquitaire [282]. La scramblase PLSCR1 a également été identifiée chez les cellules hématopoïétiques, mais son rôle dans la redistribution de PS est controversé [383].

Puisque la PS est un contributeur important au potentiel électrostatique de la MP, nous avons voulu étudier le rôle de la modulation de la PS dans l'association membranaire de la chaîne CD3 ϵ du TCR, qui possède un domaine polycationique nommé le BRS. Nous avons comme premier objectif d'étudier le rôle de TMEM16F dans la modulation de la PS à la MP des cellules T. L'expression d'un ARN interférant contre TMEM16F dans la lignée cellulaire Jurkat T humaine abolit la redistribution de la PS à la MP suivant un influx de calcium généré par l'ionomycine. Nous avons confirmé la spécificité de l'ARN interférant par l'expression de la protéine TMEM16F dont les codons ciblés par l'ARN interférant ont été échangés (Rescue). L'expression de TMEM16F-Rescue rétabli la redistribution de PS calcium-dépendante, confirmant que TMEM16F est la principale scramblase activée par le calcium chez les cellules T.

Nous n'avons pas étudié l'impact de notre ARN interférant contre TMEM16F sur l'expression des autres membres de la famille de protéines TMEM16. Il a été démontré que le thymus, la rate, les ganglions et la moelle osseuse, seules les protéines TMEM16F, -16H et -16K sont exprimées [282]. De plus, le canal ionique TMEM16A est exprimé dans le thymus, la rate et les ganglions [282]. Aucune fonction de canal ionique ou de scramblase n'a été associée à TMEM16H à ce jour, tandis que TMEM16K est une scramblase lipidique ciblée au RE [282, 384]. Il a été démontré que les plaquettes sanguines d'origine murine expriment fortement TMEM16F tandis qu'elles expriment un niveau faible de TMEM16B, -16H et -16K [385]. À l'exception de TMEM16F, le niveau d'expression de TMEM16A, -16B, -16H et -16K chez les lymphocytes T matures est inconnu [368]. Il a été démontré que les plaquettes sanguines de souris déficientes

en TMEM16A ne présentent pas de défauts dans la redistribution de PS calcium-dépendante [386]. La déficience en TMEM16K prévient la redistribution de PS du feuillet cytoplasmique vers le feuillet luminal au RE, mais l'impact sur la redistribution de PS à la MP n'a pas été étudié [387]. Des expériences de qPCR devront être réalisées sur les autres membres de la famille TMEM16 afin de déterminer la spécificité de notre ARN interférant. Toutefois, le phénotype que nous observons dans les cellules Jurkat exprimant l'ARN interférant contre TMEM16F est similaire à celui observé chez les cellules isolées de patients atteints du syndrome de Scott, les souris *Tmem16f*^{-/-}, ou les cellules Jurkat déficientes en TMEM16F, où l'absence de TMEM16F prévient la redistribution de PS calcium-dépendante à la MP [276, 368, 374, 385, 388].

En contraste, dans les cellules surexprimant TMEM16F, nous observons une augmentation de la redistribution de PS aux différentes concentrations d'ionomycine testées. Ces résultats indiquent que l'expression de TMEM16F est limitée chez les cellules T car sa surexpression amplifie la redistribution de PS. En parallèle, nous avons exprimé un mutant de TMEM16F qui est activé par le calcium cytoplasmique basal et qui redistribue constitutivement la PS à la MP. La stimulation de cellules avec 0.3µM d'ionomycine induit un influx transitoire de calcium insuffisant à l'activation du TMEM16F endogène ou surexprimé, mais qui active le TMEM16F mutant de manière maximale.

Nos résultats correspondent des études réalisées dans la lignée de cellules B Ba/F3 ou la lignée HEK293, où l'expression du mutant de TMEM16F induit une exposition constitutive de la PS à la MP dû à son activation par le calcium cytoplasmique basal [292, 373]. Ces observations sont en contraste avec d'autres études réalisées chez les cellules HEK293, où le mutant de TMEM16F démontre une activité de canal ionique et de scramblase similaire à la protéine sauvage [293, 388]. Les cellules HEK293, une lignée dérivée de cellules de rein embryonnaire, ne démontrent pas de redistribution de PS calcium-dépendante dû à une expression faible de TMEM16F [279]. Ainsi, la régulation de TMEM16F pourrait varier dépendamment selon le sous-type cellulaire utilisé [293]. De plus, les niveaux d'expression de TMEM16F, soit mutant ou sauvage, pourrait varier entre les différentes études, expliquant potentiellement les différences de sensibilité au calcium observée. En effet, par qPCR et par la fluorescence d'Ametrine, nous avons observé une expression plus faible de TMEM16F mutant en comparaison avec la protéine

sauvage. Une expression trop faible de TMEM16F mutant pourrait résulter en un phénotype similaire à la surexpression de TMEM16F sauvage.

Le mutant de TMEM16F est issu d'un épissage alternatif, résultant en l'ajout de 21 acides aminés au domaine cytoplasmique N-terminal, et d'une mutation D430G. La mutation D430G est située dans un domaine cytoplasmique entre le deuxième et le troisième domaine transmembranaire de TMEM16F. Ce domaine cytoplasmique est situé à proximité de la cavité hydrophile formée par les domaines transmembranaires 3 à 7. Cette cavité hydrophile subit un changement conformationnel suivant la liaison de TMEM16F au calcium, ce qui permet le passage de phospholipides à travers la cavité [283, 284, 289]. La structure de TMEM16F a été précédemment élucidée par microscopie cryo-électronique [286]. Une étude structurale du TMEM16F mutant par cette méthode sera nécessaire afin de déterminer comment les mutations dans TMEM16F activent sa fonction scramblase par le calcium cytoplasmique basal. L'insertion seule des 21 acides aminés dans le domaine N-terminal de TMEM16F n'augmente pas son activité scramblase [369]. Toutefois, cette insertion augmente l'activité scramblase du mutant D430G de TMEM16F [373]. Il est possible que l'insertion et la mutation diminuent l'association d'un régulateur négatif à TMEM16F.

Afin d'identifier les partenaires d'interaction de TMEM16F, nous allons utiliser la méthode de BioID. Nous avons conjugué les protéines TMEM16F sauvage et mutante avec une biotine ligase. Cette méthode permet d'identifier les protéines proximales ou interagissant directement avec TMEM16F par leur biotinylation (**Figure 1**) [389]. Le BioID nous permettra d'identifier par spectrométrie de masse si le mutant de TMEM16F possède des partenaires d'interactions différents que le TMEM16F sauvage. Cette étude sera essentielle afin de mieux comprendre la régulation de l'activation de TMEM16F ainsi que la plus grande sensibilité du TMEM16F mutant au calcium.

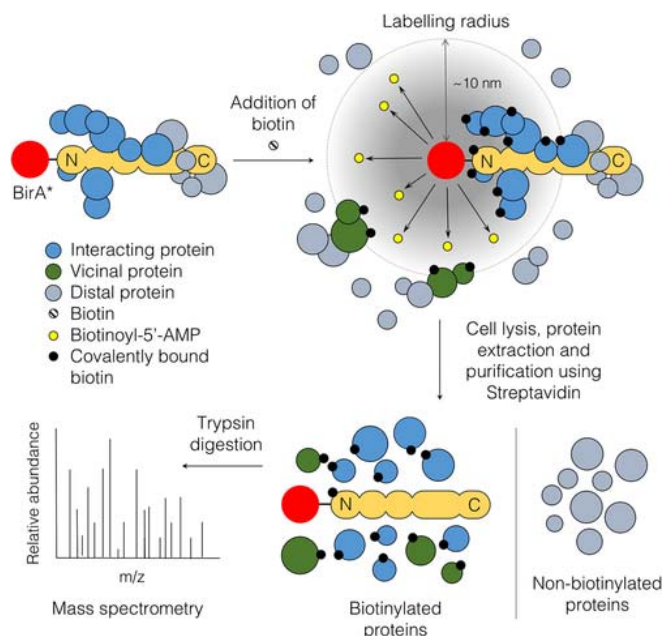


Figure 1. – Méthode d'identification de protéine proximales par la méthode de biotinylation
BioID

Image reproduite avec la permission de Wiley (Proteomics, Vol. 16, Renata Varnaité et Stuart A. MacNeill, "Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID", p.2503-2518, © 2016) [390]

Enfin, le rôle de la fonction de canal ionique de TMEM16F sur son activité scramblase est controversé. Étant donné que TMEM16F est également un canal ionique non sélectif, certaines études ont observé que TMEM16F est un canal calcique [285, 293, 294]. Nous avons observé un influx de calcium identique entre les cellules shScr et shTMEM16F, indiquant que l'activation de TMEM16F n'amplifie pas l'entrée de calcium. La mutation activatrice dans le TMEM16F mutant augmente son passage d'ions calcium-dépendant en comparaison avec les cellules sauvages [292]. Toutefois, nous avons observé aucune différence dans l'influx de calcium entre les cellules Jurkat sauvages, la surexpression de TMEM16F, ou l'expression du TMEM16F mutant suivant la stimulation avec 0.3µM d'ionomycine. L'activation du canal ionique de TMEM16F nécessite des concentrations de calcium plus élevées que pour l'activation de la fonction scramblase [292].

Ainsi, il est possible que dans notre étude, l'influx de calcium généré par l'ionomycine ne soit pas suffisamment élevé pour activer le passage d'ions par TMEM16F.

En conclusion, nos résultats démontrent que la réduction de l'expression de TMEM16F abolit la redistribution de PS à la MP tandis que l'expression d'une forme mutante de TMEM16F augmente la redistribution de PS basale. Ainsi, nos résultats confirment que TMEM16F est la scramblase qui régule la redistribution de PS de manière calcium-dépendante chez les lymphocytes T [368].

4.2 Développement d'une nouvelle approche pour étudier l'association dynamique de CD3 ϵ à la MP

L'association membranaire des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR est essentielle au maintien de l'état déphosphorylé du TCR en absence de stimulation. La séquestration des tyrosines des ITAMs et des domaines BRS à l'intérieur de la bicouche lipidique prévient le recrutement de Lck au TCR des lymphocytes T au repos. Considérant l'importance des phospholipides acides dans la régulation de l'activation du TCR, nous avons développé une méthode de FRET couplée au FLIM afin d'étudier le rôle de la redistribution de PS dans l'association membranaire de la chaîne CD3 ϵ . Le FLIM offre l'avantage de la quantification pixel par pixel du temps de vie de fluorescence du donneur, donc de l'efficacité de FRET. De plus, le FLIM est insensible à la concentration du donneur puisque seul son temps de vie de fluorescence est mesuré [391]. La formation de la synapse immunologique augmente la concentration locale du rapporteur CD3 ϵ -mTFP1 lié au TCR [318, 391]. Ainsi, le FLIM a pu être utilisé pour étudier spécifiquement la dissociation membranaire de CD3 ϵ à la synapse immunologique.

Les études précédentes sur l'association membranaire des domaines cytoplasmiques de CD3 ϵ et CD3 ζ avaient utilisé le marqueur membranaire R18 comme accepteur FRET. Le marqueur R18 complexifie l'étude de processus dynamiques à la MP puisqu'il s'intercale à la membrane des cellules. Pour diminuer la toxicité, les cellules doivent être maintenues à 4°C suivant leur marquage au R18 [391]. Afin d'être en mesure d'étudier les lymphocytes T de manière dynamique, nous avons fusionné la protéine fluorescente mVenus au domaine N-terminal de Lck

(PM-Venus). Ce domaine de Lck constitutivement ciblé à la MP par des modifications de myristoylation et palmitoylation.

Nous avons confirmé que notre méthode de FRET-FLIM est robuste avec différents contrôles. Nous avons généré des lignées cellulaires exprimant PM-Venus ainsi que le rapporteur HA-KIR-mTFP1. Nous avons lié le rapporteur FRET au domaine transmembranaire du récepteur KIR des cellules NK afin de cibler efficacement la protéine fluorescente à la MP. Le marqueur HA extracellulaire permet de confirmer l'expression du rapporteur en surface. Comme contrôles, nous avons ajouté une protéine de liaison de soit 3 ou 50 acides aminés dans le domaine cytoplasmique du rapporteur HA-KIR-mTFP1. Ces contrôles ont été précédemment utilisés afin de comparer l'efficacité de FRET du rapporteur HA-KIR-CD3 ϵ -mTFP1 [230]. Le rapporteur HA-KIR-3-mTFP1 permet de comparer l'efficacité de FRET de la chaîne CD3 ϵ associée aux lipides tandis qu'HA-KIR-50-mTFP1 démontre un FRET similaire au CD3 ϵ dissocié. L'efficacité de FRET que nous avons obtenu avec ces rapporteurs est comparable aux données déjà publiées, nous indiquant que notre méthode de FRET est robuste pour l'étude l'association dynamique de CD3 ϵ à la MP [230]. De plus, nous avons observé une efficacité de FRET similaire entre les rapporteurs HA-KIR-3-mTFP1 et HA-KIR-CD3 ϵ -mTFP1, confirmant que CD3 ϵ est associé à la MP dans notre système.

4.3 TMEM16F : le pont entre l'entrée de calcium et la dissociation membranaire de CD3 ϵ

Il a été proposé que les ions de calcium dissocient les chaînes cytoplasmiques de récepteurs immuns de la MP par neutralisation directe de la charge des phospholipides acides [322, 323, 366]. Des études de FRET ont démontré que la stimulation de lymphocytes avec l'ionophore de calcium ionomycine induit la dissociation membranaire de CD3 ϵ , du récepteur de co-stimulation CD28 et de l'IgG-BCR [322, 323, 366]. L'ionomycine augmente la concentration de calcium intracellulaire à environ 1 μ M chez les lymphocytes T [392]. Toutefois, cette concentration intracellulaire de calcium active TMEM16F [276, 286, 369]. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation du calcium intracellulaire avec l'ionomycine induit la dissociation membranaire de la chaîne CD3 ϵ par l'activation de la scramblase TMEM16F. L'entrée de calcium

robuste observée dans les cellules shTMEM16F nous a permis d'étudier si les ions de calcium mènent à la dissociation membranaire de CD3ε en absence de redistribution de PS.

4.3.1 La redistribution de PS régule la dissociation de CD3ε

Nous avons utilisé l'approche de FRET-FLIM que nous avons développée afin d'élucider la contribution du calcium et de TMEM16F dans l'association de CD3ε. En stimulant les cellules shScr avec de l'ionomycine, nous avons observé une augmentation du temps de vie de fluorescence de mTFP1 et une diminution de l'efficacité de FRET, confirmant que l'ionomycine induit la dissociation membranaire de CD3ε. En contraste, l'ionomycine n'apporte aucun changement au temps de vie de fluorescence et l'efficacité de FRET chez les cellules shTMEM16F. Ainsi, les ions de calcium entrant par la stimulation à l'ionomycine ne dissocient pas la chaîne cytoplasmique de CD3ε en absence de l'expression de TMEM16F. La stimulation avec 0.3μM d'ionomycine entraîne la dissociation membranaire de CD3ε dans les cellules exprimant le TMEM16F mutant, mais pas dans les cellules Jurkats sauvages ou celles surexprimant TMEM16F. Ainsi, la redistribution de PS est requise pour la dissociation calcium-dépendante de CD3ε.

Il a été démontré que le remplacement du calcium contre le strontium comme ion divalent induit la dissociation des domaines cytoplasmiques de CD3ε et de CD28 [322, 366]. Des études in vitro ont démontré que le TMEM16F murin peut être activé par les ions de strontium [293]. La fonction scramblase d'un homologue fongique de TMEM16F est activée par le strontium, mais avec une plus faible affinité que le calcium [280, 393]. Les concentrations de calcium et de strontium utilisées afin de démontrer la dissociation des chaînes CD3ε et de CD28 de la MP sont suffisantes pour activer la redistribution de la PS par TMEM16F [293]. Avec notre approche expérimentale de FRET, nous n'avons pas étudié le rôle du strontium dans la dissociation membranaire de CD3ε par TMEM16F. Toutefois, l'observation que la fonction scramblase de TMEM16F est activée par le strontium renforce notre modèle démontrant que TMEM16F régule la dissociation membranaire de CD3ε.

En conclusion, l'augmentation du calcium intracellulaire par l'ionomycine n'est pas suffisamment élevée pour la neutralisation directe de la charge des phospholipides acides et pour la dissociation de CD3ε de la MP en absence de TMEM16F. Nos résultats démontrent que la

réduction de la concentration de PS au feuillet interne de la MP par l'activation de TMEM16F diminue les interactions électrostatiques entre le BRS de CD3ε et la MP, entraînant la dissociation membranaire de CD3ε. Nos résultats indiquent que les modèles de dissociation des chaînes cytoplasmiques de CD28 et de l'IgG-BCR devraient être révisés. L'approche de FRET-FLIM que nous avons développé nous permettrait de déterminer si la dissociation calcium-dépendante des chaînes cytoplasmiques de CD28 et de l'IgG-BCR est régulée par TMEM16F. De plus, avec notre approche, nous pourrions étudier si les autres récepteurs immuns dotés d'un domaine BRS sont associés à la MP par interactions électrostatiques (**Tableau 2, pages 85-86**).

4.3.2 Le ciblage de TMEM16F à la MP dans sa fonction de scramblase

L'étude de Hu *et al* (2016) réalisée dans la lignée de cellules T Jurkat démontre que TMEM16F est localisé dans les endosomes tardifs Rab7⁺ à la synapse immunologique [368]. La GTPase Rab7 est un marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes [394]. L'étude démontre que la co-localisation de TMEM16F avec Rab7 augmente suivant l'activation des cellules T. Cette étude est la seule qui observe une localisation intracellulaire de TMEM16F. L'expression de TMEM16F dans différentes lignées cellulaires, soit de fibroblastes ou de lymphocytes, démontre un ciblage à la MP [276, 283, 285, 290, 292, 369].

Nos résultats démontrent que le TMEM16F sauvage conjugué avec eGFP (TMEM16F WT-eGFP) est ciblé à la MP. Le ciblage de TMEM16F WT-eGFP est identique à celui du contrôle N-Lck-eGFP. De plus, le TMEM16F-Rescue conjugué à eGFP rétablit la redistribution calcium-dépendante de PS à la MP. Ainsi, nous avons confirmé que la scramblase TMEM16F est ciblée à la MP dans les cellules T Jurkat.

Afin d'étudier la localisation de TMEM16F lors de la formation d'une synapse immunologique, nous avons activé les cellules Jurkat exprimant TMEM16F WT-eGFP avec des billes recouvertes d'anticorps contre CD3 et CD28. Nos résultats démontrent que TMEM16F est ciblé à la MP et à la synapse immunologique des cellules activées. Nous n'avons toutefois pas quantifié les niveaux de TMEM16F entre la synapse immunologique et le restant de la cellule. Pour ce faire, nous aurions pu transduire les cellules avec un contrôle interne, comme une molécule fluorescente ciblée à la MP par modification hydrophobique de prénylation de la

séquence CAAX, qui démontre un ciblage stable entre la synapse immunologique et le restant de la MP [395]. Le contrôle interne permettrait de normaliser les niveaux d'expression de TMEM16F afin de déterminer si la scramblase est enrichie ou exclue de la synapse.

Nous observons également TMEM16F dans des vésicules intracellulaires, mais la proportion de TMEM16F intracellulaire ne semble pas augmenter au cours de l'expérience d'activation. De plus, les vésicules intracellulaires marquées par TMEM16F-eGFP ne semblent pas recrutées à la synapse immunologique comme dans l'étude de Hu *et al.* Toutefois, la molécule fluorescente eGFP est sensible au pH acide des lysosomes, ce qui pourrait prévenir sa détection dans les vésicules intracellulaires [396]. Afin d'étudier le ciblage de TMEM16F dans les endosomes, nous pourrions marquer les cellules avec Rab7 et étudier de manière quantitative le recrutement de TMEM16F et de ces vésicules à la synapse immunologique [368]. De plus, TMEM16F pourrait être conjugué à la protéine fluorescente mRFP1 comme dans l'étude de Hu *et al.*, puisqu'elle démontre une plus forte résistance à l'acidité des lysosomes [368, 396].

Nos résultats démontrent que TMEM16F est ciblé à la MP des cellules T au repos et activées. Le ciblage membranaire de TMEM16F est constant avec sa fonction de redistribution calcium-dépendante de PS à la MP [276]. Dans l'étude de Hu *et al.*, TMEM16F est conjugué au domaine N-terminal avec le marqueur de surface NGFR suivi du peptide P2A. De plus, TMEM16F est conjugué à une protéine fluorescente à sa région C-terminale. La conjugaison de TMEM16F aurait pu entraîner un repliement inefficace de la protéine de fusion, ce qui l'aurait ciblé au lysosomes Rab7⁺ pour sa dégradation [397]. Dans notre étude, nous avons ajouté une séquence de liaison entre TMEM16F et la protéine fluorescente afin de diminuer l'impact de la fusion de protéine sur le repliement de TMEM16F et sur l'insertion de ses domaines transmembranaires à la MP. De plus, nous avons confirmé que notre protéine de fusion était fonctionnelle par la redistribution calcium-dépendante de PS par le TMEM16F-Rescue, ce qui n'a pas été fait dans l'étude de Hu *et al.*

L'épissage alternatif de TMEM16F résulte en l'expression de quatre différents variants de TMEM16F. Les différents variants identifiés chez l'humain sont exprimés de manière variable dans différents tissus. L'expression du variant V3 n'a pas été détectée dans les tissus [292]. Les

variants possèdent une fonction semblable de canal ionique et de scramblase calcium-dépendante, à l'exception du variant V3. Ce variant est le seul qui n'est pas exprimé à la MP et qui ne démontre aucune activité scramblase ou de passage d'ions [292, 369]. Le variant de TMEM16F exprimé dans l'étude de Hu *et al* n'a pas été précisé. L'expression du variant V3 de TMEM16F pourrait également expliquer la localisation intracellulaire observée dans cette étude. Étant donné que la redistribution calcium-dépendante de PS n'a pas été démontrée dans l'étude de Hu *et al*, il est difficile de conclure que la protéine TMEM16F exprimée est fonctionnelle.

4.3.3 La modulation de la PS à la synapse immunologique régule la dissociation membranaire de CD3 ϵ

Nos résultats démontrent que la redistribution de PS par TMEM16F agit en tant que pont entre l'influx de calcium et la dissociation de CD3 ϵ de la MP. Il a été proposé que l'influx de calcium robuste généré à la synapse immunologique par l'activation des canaux CRAC entraîne la dissociation membranaire des chaînes CD3 du TCR. L'activation des canaux CRAC augmente la concentration de calcium à 2 μ M à la synapse immunologique [365]. Considérant que la fonction scramblase de TMEM16F est activée par 1 μ M de calcium, nous avons voulu étudier si TMEM16F régule la dissociation de CD3 ϵ à la synapse immunologique [286, 369].

Nous avons généré des lignées de cellules Jurkat exprimant les rapporteurs PM-Venus et HA-KIR-CD3 ϵ -mTFP1 dont les tyrosines de l'ITAMs ont été mutées en phénylalanine (HA-KIR-CD3 ϵ _{FF}-mTFP1). La mutation conservatrice en phénylalanine prévient la phosphorylation et l'internalisation du rapporteur lors de l'activation des cellules T [318]. Étant donné que la synapse immunologique est dynamique et que l'acquisition de FLIM nécessite 30 secondes d'imagerie, nous avons opté pour la quantification de FRET par la mesure de la fluorescence de mTFP1 et Venus entre la synapse immunologique et au restant de la cellule. La dissociation membranaire de CD3 ϵ augmente la fluorescence de mTFP1 à la synapse immunologique par la diminution du FRET entre mTFP1 et Venus.

Nos résultats démontrent une dissociation de CD3 ϵ à la synapse immunologique par l'augmentation de la fluorescence de mTFP1 en comparaison avec la lignée contrôles 3-TFP. L'absence de TMEM16F prévient la dissociation membranaire du rapporteur HA-KIR-CD3 ϵ -mTFP1

à la synapse immunologique puisque la fluorescence de mTFP1 est identique aux cellules 3-TFP. En contraste, l'expression de TMEM16F mutant augmente la dissociation d'HA-KIR-CD3 ϵ -mTFP1 de la MP en comparaison avec les cellules sauvages. Ainsi, nos résultats démontrent que l'influx de calcium régule la dissociation membranaire de la chaîne CD3 ϵ à la synapse immunologique par l'activation de la scramblase TMEM16F.

4.4 La régulation de la PS dans l'initiation de l'activation des cellules T

La formation des microagrégats de TCRs entraîne l'exclusion de la phosphatase CD45 par son domaine extracellulaire large et au recrutement de la kinase Lck par son association aux co-récepteurs CD4 ou CD8 [56, 62, 63]. Puis, les chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR doivent se dissocier de la MP afin de recruter la kinase Lck pour l'initiation de la cascade d'activation des cellules T. Toutefois, le rôle de l'association membranaire comme mécanisme de contrôle de l'activation du TCR a été remis en question par l'observation que la mutation des résidus basiques du BRS, qui force l'exposition de CD3 ϵ au cytoplasme, prévient la phosphorylation des ITAMs des chaînes CD3 [319, 398]. Une étude subséquente a démontré que le Domaine Unique de Lck, qui est riche en résidus acides, recrute la kinase par interaction électrostatique avec les domaines BRS de CD3 ϵ et CD3 ζ , expliquant l'absence de phosphorylation de ces chaînes suivant la mutation du BRS [320].

De plus, il a été proposé que l'ITAM de CD3 ϵ est accessible aux kinases chez les cellules T au repos puisque l'inhibition des phosphatases avec du pervanadate entraîne la phosphorylation de CD3 ϵ [398]. Toutefois, l'inhibition pharmacologique des phosphatases par traitement au pervanadate conduit à la dissociation membranaire des domaines cytoplasmique de CD3 ϵ et de CD3 ζ [319, 399]. Le traitement au pervanadate mène à une diminution de la PS au feuillet interne de la MP, couplée à une redistribution de la PS vers le feuillet externe [399]. Nous avons démontré que la redistribution de PS par TMEM16F entraîne la dissociation membranaire de CD3 ϵ . Ainsi, la redistribution de PS induite par le pervanadate pourrait mener à la dissociation des chaînes CD3 ϵ et de CD3 ζ plutôt que par la phosphorylation des ITAMs.

Enfin, le modèle a été remis en question par l'observation que le TCR isolé en présence de détergent, donc en absence de phospholipides acides, ne peut pas être phosphorylé in vitro. L'ajout de ligand cause un changement conformationnel dans le TCR, permettant sa

phosphorylation et l'exposition du domaine PRS de CD3 ϵ [330]. Étant donné que le TCR purifié n'est pas phosphorylé en absence de phospholipides, il a été proposé que les phospholipides acides ne régulent pas l'état d'activation du TCR. En contraste, il a été démontré que les chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ ne sont pas phosphorylées en présence de phospholipides acides in vitro [230, 312]. Récemment, la structure du TCR a été élucidée par microscopie cryo-électronique en présence de détergent, donc en absence de membrane lipidique et de phospholipides acides. Par leur flexibilité et leur dynamisme en solution, la structure des domaines cytoplasmiques des chaînes CD3 n'a pas pu être définie avec précision [18, 400]. Ainsi, il est possible que pour le complexe du TCR purifié en absence de membrane lipidique, la structure des domaines cytoplasmiques des chaînes CD3 empêche le recrutement de Lck en absence de ligand. Lors de la ligation du TCR, le changement conformationnel permettant l'exposition du domaine PRS pourrait également permettre l'exposition des domaines de recrutement de Lck, soit le domaine de liaison SH3 de CD3 ϵ ou les domaines BRS. L'élucidation de la structure des domaines cytoplasmiques des chaînes CD3 du complexe du TCR sera ainsi essentielle à la compréhension de la régulation de l'activation du TCR en présence et en absence de ligands.

Les domaines BRS des récepteurs immuns, comme le TCR, CD28 et l'IgG-BCR, sont donc maintenant généralement acceptés comme étant un mécanisme essentiel au maintien de leur état inactif en absence d'activation. L'association membranaire de ces domaines cytoplasmiques oscille entre la forme associée et non-associée, expliquant l'observation que la conversion de Lck à sa forme active (phosphorylation sur Y394) par l'inhibition de Csk permet la phosphorylation de CD3 ζ [231, 314, 401]. Ainsi, l'association électrostatique des récepteurs immuns à la MP agit de concert avec des mécanismes de contrôles additionnels, comme la balance kinase-phosphatase, afin de prévenir l'activation de ces récepteurs en absence de ligation.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour la dissociation membranaire initiale des chaînes CD3 ϵ et CD3 ζ du TCR. Il a été démontré que la phosphorylation de la chaînes CD3 ζ est requise pour sa dissociation [319, 336]. En contraste, la chaîne CD3 ϵ se dissocie en absence de signalisation [318]. Il a également été proposé que la force induite sur le TCR par l'interaction entre la cellule T et la CPA entraîne des changements conformationnels permettant l'activation du TCR. Une étude de FRET démontre une compression dans le TCR suivant l'interaction avec un

pCMH agoniste, menant à la dissociation membranaire de CD3 ζ . Toutefois, la phosphorylation de CD3 ζ était requise pour sa dissociation [336]. Ainsi, un changement conformationnel dans le TCR n'est pas suffisant pour la dissociation membranaire de CD3 ζ . De plus, la structure du complexe du TCR ne démontre aucun changement conformationnel dans les domaines extracellulaires et transmembranaires du TCR en présence d'un pCMH [18]. Toutefois, la structure du TCR a été élucidée en absence de membrane ainsi qu'en absence d'application de force externe sur le TCR. Il est possible que dans son environnement membranaire natif, la force induite par l'interaction TCR-pCMH entraîne des changements conformationnels dans les domaines extracellulaires et transmembranaires du TCR, permettant son activation [10, 400].

Il a été proposé que l'exclusion de la PS des microagrégats de TCRs induit la dissociation membranaire des chaînes CD3 du TCR pour l'initiation de l'activation. Toutefois, l'observation que la PS est exclue des TCRs activés reste controversée. Une étude a démontré que la PS et les radeaux lipidiques sont enrichis autour des TCRs activés suivant une isolation des feuilletts membranaire avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 [402]. Ainsi, cette étude suggère que la PS n'est pas exclue des microagrégats de TCRs et qu'elle s'associe avec les domaines lipidiques ordonnés. Toutefois, l'isolation des TCRs a été réalisée suivant plusieurs minutes de stimulation et n'indique pas si la PS isolée provient du feuillet interne ou externe de la MP. En effet, nous avons observé une redistribution de la PS suivant 5 minutes d'activation chez les cellules Jurkat (**Chapitre 2, Figure S6B**). Il a également été observé que la concentration de PS au feuillet interne de la MP est stable entre le cSMAC et le pSMAC, malgré une diminution du potentiel électrostatique au cSMAC [310]. Cependant, il a été démontré que les lipides ordonnés se localisent avec la PS au feuillet externe à la synapse immunologique des lymphocytes T activés [370]. Comme nous allons en discuter plus loin, la co-localisation de la PS et du cholestérol au feuillet externe de la MP de la synapse immunologique protège les CTLs contre leur sécrétion de perforine [403]. Ainsi, la PS serait exclue des microagrégats de TCRs lors de l'activation initiale des cellules T, puis l'externalisation de la PS à la synapse immunologique mature pourrait stabiliser la concentration de PS interne à travers le cSMAC et le pSMAC.

Le mécanisme d'exclusion de la PS des microagrégats de TCRs reste toujours incompris. L'inhibition pharmacologique de l'activité des kinases Src par traitement au PP2 ne prévient pas

la formation d'agrégats de TCRs ni l'exclusion de la PS [85, 86, 318]. La mobilité latérale de la PS de la MP vers la synapse immunologique est diminuée chez les lymphocytes T stimulés [318]. Étant donné que le traitement pharmacologique au PP2 inhibe l'influx de calcium, l'exclusion de la PS des microagrégats de TCRs n'est pas une conséquence de l'activation de TMEM16F [318]. La formation d'agrégats de TCR et la redistribution latérale de PS serait ainsi une conséquence structurelle indépendante de la signalisation résultant de la stimulation initiale des lymphocytes T. Nos résultats démontrent que la diminution de PS au feuillet interne de la MP entraîne la dissociation membranaire de CD3 ϵ . Ainsi, nos résultats indiquent que l'exclusion de la PS des microagrégats de TCRs pourrait induire la dissociation membranaire de CD3 ϵ et CD3 ζ lors du contact initial entre une CPA et une cellule T.

Finalement, le rôle du cholestérol et des radeaux lipidiques dans l'initiation de l'activation des lymphocytes T reste controversé [404]. D'une part, il a été démontré que l'association du cholestérol à la chaîne TCR β maintient le TCR dans un état inactif chez les lymphocytes T au repos, et que la dissociation du cholestérol permet l'activation des cellules T suivant la stimulation du TCR [330]. D'une autre part, le même groupe a démontré que le cholestérol était requis pour la formation de microagrégats de TCRs [405]. L'importance du cholestérol dans la formation de domaines lipidiques ordonnés à la synapse immunologique et dans le regroupement des TCRs activés a été confirmée dans plusieurs études [95, 370, 406-408]. La répartition latérale des domaines ordonnés n'a pas été étudiée avec le Laurdan lors de la formation initiale des microagrégats de TCRs. Ainsi, des études de microscopie à haute résolution avec le Laurdan seront nécessaires afin de déterminer si la condensation du cholestérol lors de la stimulation des lymphocytes T induit l'exclusion de la PS. De plus, notre approche FRET nous permettrait d'étudier si l'exclusion de la PS des microagrégats de TCRs induit la dissociation membranaire initiale des chaînes CD3 du TCR.

4.5 La redistribution de PS dans l'amplification de l'activation des cellules T

Les lymphocytes T sont activés de manière robuste suivant une interaction avec un faible nombre de pCMHs agonistes présentés par une CPA. Nous avons démontré que la redistribution

de PS par TMEM16F régule la dissociation membranaire de CD3 ϵ à la synapse immunologique. L'activité scramblase de TMEM16F est activée suivant un influx robuste de calcium. Étant donné que l'influx de calcium nécessite une activation initiale de la cellule T, il est peu probable que TMEM16F régule la dissociation membranaire initiale des chaînes CD3 du TCR. Ainsi, nous proposons que TMEM16F régule la dissociation des TCRs lors de l'étape de l'amplification de la signalisation des lymphocytes T.

L'activation des lignées shScr et shTMEM16F démontre une diminution de la phosphorylation des molécules CD3 ζ , ZAP-70 et LAT dans les cellules shTMEM16F. Cette diminution de phosphorylation est similaire à celle observée chez les cellules activées en absence de calcium extracellulaire [366]. La phosphorylation de CD3 ζ , ZAP-70, LAT et MEK est augmentée dans les cellules activées exprimant le TMEM16F mutant. Nous observons en parallèle une redistribution de PS robuste suivant l'activation des cellules TMEM16F mutante. Enfin, après 30 minutes d'activation, nous observons une augmentation de la phosphorylation de CD3 ζ et LAT dans les cellules surexprimant la version sauvage de TMEM16F. L'activation génère un influx de calcium suffisamment robuste pour activer la redistribution de PS dans les cellules surexprimant TMEM16F. Malgré que nous n'avons pas observé une augmentation de la dissociation membranaire de CD3 ϵ à la synapse immunologique, il est possible qu'une activation prolongée des cellules surexprimant TMEM16F permette la dissociation d'un plus grand nombre de TCRs pour l'amplification de la signalisation. En conclusion, nos résultats démontrent que la redistribution de PS calcium-dépendante par TMEM16F est requise pour l'amplification de l'activation des cellules T.

4.5.1 TMEM16F amplifie l'activation des cellules T par les TCRs non-engagés

Plusieurs modèles ont été proposés pour l'amplification de l'activation des cellules T, soit l'engagement en série des TCRs, l'amplification par les pCMHs du soi, ainsi que la dissociation membranaire des chaînes CD3 du TCR par la régulation des phosphoinositides ou l'influx de calcium. Il a été proposé que le calcium amplifie l'activation des cellules T en entraînant la dissociation membranaire de TCRs "bystanders", c'est-à-dire des TCRs qui ne sont pas directement engagés par un pCMH agoniste [366]. La dissociation membranaire massive de TCRs

par le calcium permettrait la phosphorylation de ces TCRs non-engagés pour l'amplification de l'activation des cellules T.

Nous avons démontré que le calcium active la redistribution de PS par la scramblase TMEM16F, permettant la dissociation membranaire de chaînes CD3 ϵ et l'amplification de l'activation des cellules T. De plus, nous avons démontré que TMEM16F régule la dissociation du rapporteur HA-KIR-CD3 ϵ -mTFP1 à la synapse immunologique. Ce rapporteur n'est pas associé au TCR et sert de mesure des changements globaux apportés à la MP. Ainsi, nous proposons que TMEM16F régule la dissociation membranaire calcium-dépendante des TCRs non-engagés à la synapse immunologique. La dissociation membranaire des TCRs non-engagés par l'activité scramblase de TMEM16F permettrait l'activation de ces TCRs pour l'amplification de la signalisation des cellules T. Dans ce sous-chapitre, nous allons discuter du rôle de TMEM16F dans les différents mécanismes proposés d'amplification de l'activation des cellules T.

4.5.1.1 Les TCRs non-engagés amplifient l'activation des cellules T

Afin d'étudier si TMEM16F amplifie l'activation des cellules T par les TCRs non-engagés, nous avons activé le rapporteur HA-KIR-CD3 ϵ -mTFP1 avec de l'anti-HA pour déterminer le niveau d'activation des TCRs endogènes non-engagés. Toutefois, la ligation d'HA-KIR-CD3 ϵ -mTFP1 n'active pas les cellules T puisque nous n'avons observé aucune augmentation du marquage CD69. Étant donné que les chaînes du TCR sont exprimées en tant que dimères, nous avons développé une molécule chimérique du dimère CD3 $\epsilon\delta$ exprimé à la MP. Les dimères des chaînes du TCRs doivent être incorporés dans le complexe du TCRs pour leur expression à la surface de la cellule. Afin d'exprimer CD3 $\epsilon\delta$ à la MP, nous avons fusionné les domaines cytoplasmiques de CD3 $\epsilon\delta$ aux domaines transmembranaires et extracellulaires du CMH de classe II (DR-CD3 $\epsilon\delta$).

La ligation de la chimère DR-CD3 $\epsilon\delta$ avec de l'anti-DR active une faible proportion des cellules T observée par marquage CD69. La ligation de DR avec CD4 triple le pourcentage de cellules exprimant CD69. Le domaine cytoplasmique du co-récepteur CD4 est lié à la kinase Lck. Ainsi, la ligation de CD4 rapproche Lck près de la chimère DR-CD3 $\epsilon\delta$ et du TCR pour leur activation. L'activation de DR-CD3 $\epsilon\delta$ avec de l'anti-DR/CD4 ne mène pas à une activation aussi robuste que l'activation du TCR avec anti-CD3/CD4. Il est possible que cette différence d'activation soit

attribuée au plus faible nombre d'ITAMs dans DR-CD3 $\epsilon\delta$ que dans le TCR. En effet, il a été démontré que la multiplicité des ITAMs augmente la proportion des cellules T activées [409].

Afin de déterminer si TMEM16F régule l'activation des TCRs non-engagés, nous avons voulu déterminer le niveau de phosphorylation du TCR non-engagé suivant l'activation des cellules T. Nous avons stimulé les cellules exprimant la chimère HA-DR-CD3 $\epsilon\delta$ avec l'anti-DR/CD4 ou de l'anti-CD3/CD4 et nous avons étudié le niveau de phosphorylation de la chaîne CD3 ζ du TCR par Western blot (voir Annexe 2). Nous avons observé l'activation des cellules T par la phosphorylation de LAT suivant la ligation par DR/CD4 et CD3/CD4. Toutefois, nous n'avons pas réussi à observer une augmentation de la phosphorylation de CD3 ζ , donc du TCR non-engagé, suivant la stimulation de la chimère HA-DR-CD3 $\epsilon\delta$.

L'activation directe des TCRs non-engagés a été démontré dans un modèle d'activation au superantigène. Les superantigènes sont des toxines bactériennes liant spécifiquement certaines chaînes TCR β avec un CMH. L'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* lie spécifiquement les TCRs V β 3, tandis que l'entérotoxine E de *S.aureus* lie les TCRs V β 8. L'activation de cellules Jurkat exprimant les TCRs V β 3 et V β 8 avec l'entérotoxine B mène à l'internalisation robuste de V β 3 et la co-internalisation de V β 8, et la stimulation avec l'entérotoxine E entraîne l'internalisation robuste de V β 8 et la co-internalisation de V β 3 [410]. De plus, la chaîne CD3 ζ du TCR non-engagé est phosphorylée mais dans une proportion plus faible que le TCR engagé, ce qui corrèle avec les niveaux d'internalisation plus faibles du TCR non-engagé [411]. Ainsi, il est possible que l'activation de DR-CD3 $\epsilon\delta$ est moins robuste et plus graduelle qu'une activation au superantigène, ce qui empêche la détection directe de la phosphorylation du TCR non-engagé.

Nous avons ainsi étudié l'internalisation du TCR endogène non-engagé afin d'étudier son activation suivant la stimulation de la chimère DR-CD3 $\epsilon\delta$. La stimulation de lymphocytes T avec une faible quantité de pCMH entraîne une internalisation massive des TCRs [111]. Le niveau d'internalisation des TCRs dépend de la quantité et de l'affinité des peptides présentés par la CPA [111, 168, 349, 412]. Dans un modèle où deux TCRs distincts sont exprimés, la stimulation robuste d'un TCR mène à l'internalisation de l'autre TCR [111]. Comme il a été démontré dans le modèle d'activation au superantigène, puisque le TCR non-spécifique au pCMH agoniste n'est pas

directement engagé, son niveau d'internalisation est plus faible que pour le TCR spécifique [111, 161, 162, 410, 413]. Les TCRs internalisés et phosphorylés sont dégradés tandis que les TCRs non-activés sont redirigés à la surface pour le maintien de l'activation des lymphocytes T. Étant donné que les TCRs non-activés sont réexprimés à la surface, la quantité de TCRs internalisés est corrélée au niveau de phosphorylation du TCR et de l'activation des cellules T [349, 412].

Nous avons observé une diminution de l'expression du TCR endogène suivant une cinétique de stimulation de DR-CD3 $\epsilon\delta$ par ligation avec de l'anti-DR/CD4. Nous observons que la perte d'expression du TCR non-engagé est moins forte et plus graduelle que lorsque le TCR est directement activé par ligation avec de l'anti-CD3/CD4. La cinétique d'internalisation du récepteur engagé et non-engagé de notre étude suit celle d'autres études, où le récepteur engagé s'internalise plus lentement et moins robustement que le récepteur engagé [162, 410, 413]. Ces résultats démontrent que la ligation de la chimère DR-CD3 $\epsilon\delta$ active le TCR endogène non-engagé.

L'internalisation du TCR non-engagé, mais pas du récepteur engagé, est kinase-dépendant puisque l'inhibition des kinases Src avec PP1 ou PP2 prévient leur internalisation, confirmant les observations réalisées dans une autre étude [161]. Nous avons observé que contrairement au TCR, l'internalisation de DR-CD3 $\epsilon\delta$ suite à sa ligation directe était partiellement dépendante des kinases Src. Les TCRs engagés sont internalisés par différents mécanismes. L'ubiquitination de la chaîne CD3 ζ phosphorylée par les ubiquitines ligases c-Cbl et Cbl-b entraîne l'internalisation du TCR dans un corps multivésiculaire, un endosome tardif qui fusionne avec des lysosomes pour la dégradation de protéines [414-416]. La phosphorylation de la sérine 126 (S126) par PKC- θ dans le domaine cytoplasmique de CD3 γ expose une séquence di-leucine formée des acides aminés DxxxLL. La séquence di-leucine de CD3 γ recrute la protéine adaptatrice AP-2 afin d'initier le processus d'endocytose par vésicules de clathrine [413, 417]. De plus, il a été démontré que la chaîne CD3 ϵ possède un signal d'endocytose activation-dépendant dans son domaine cytoplasmique [418]. Enfin, les TCRs activés sont également internalisés par phagocytose [419]. Ainsi, contrairement au TCR, l'internalisation de la chimère DR-CD3 $\epsilon\delta$ activée dépend seulement de la chaîne CD3 ϵ , dont le mécanisme d'internalisation suggère une plus grande dépendance sur les kinases Src que l'internalisation par CD3 γ ou CD3 ζ .

Il a été proposé que les TCRs peuvent s'assembler en oligomères, permettant aux lymphocytes T d'augmenter l'avidité de l'interaction TCR-pCMH afin de répondre à une plus faible dose d'antigène [420, 421]. L'oligomérisation directe des TCRs a été remise en question par des études de microscopie à haute résolution démontrant que les TCRs au repos et activés sont monomériques [422]. Nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation afin d'exclure la possibilité que les TCRs et la chimère DR-CD3 ϵ δ soient co-associés, ce qui pourrait résulter en leur co-internalisation. Nous avons démontré que le TCR et la chimère DR-CD3 ϵ δ ne forment pas de complexes chez les cellules Jurkat au repos ou activée, soit par la ligation du TCR ou de DR. Des expériences de co-immunoprécipitation additionnelles en utilisant le détergent doux Brij98, qui a été précédemment utilisé afin de démontrer que les TCRs forment des oligomères, pourraient être réalisées afin de confirmer que le TCR et DR-CD3 ϵ δ ne forment pas de complexes [420]. En conclusion, les résultats de co-immunoprécipitation et d'internalisation suivant l'inhibition des kinases Src suggèrent que le TCR et DR-CD3 ϵ δ ne sont pas co-internalisés et que l'activation des récepteurs non-engagés par les kinases Src entraîne leur internalisation indépendamment des récepteurs directement engagés [161]. Ainsi, la ligation de la chimère DR-CD3 ϵ δ entraîne l'activation de TCRs non-directement engagés.

Afin de confirmer que nous activons les TCRs non-engagés dans notre modèle, nous avons étudié l'activation des cellules T suivant la ligation de la chimère DR-CD3 ϵ δ en absence de TCR endogène. Nous avons diminué l'expression du TCR endogène par la transduction d'un ARN interférant contre la chaîne TCR α (shTCR). Nous observons une diminution de la fréquence des cellules exprimant CD69 en absence de TCR endogène. Il a été démontré que la réponse des lymphocytes T est à la fois analogue et digitale. L'activation des cellules T mène à une réponse digitale, c'est-à-dire qu'une population de cellules s'active et exprime des marqueurs d'activation comme CD69. En contraste, certaines cellules n'atteignent pas un seuil d'activation suffisant pour l'expression de CD69 [409, 423]. Ainsi, nos résultats démontrent que l'activation des TCRs endogènes non-engagés est requise pour l'amplification de la signalisation afin d'atteindre le seuil d'activation des cellules T.

4.5.1.2 TMEM16F active les TCRs non-engagés

Nous avons étudié le rôle de TMEM16F dans l'amplification de l'activation des cellules T par les TCRs non-engagés. Les cellules shTMEM16F démontrent un défaut d'internalisation du TCR endogène suivant une heure de ligation avec de l'anti-DR/CD4. Ce défaut d'activation est consistant avec la diminution de la fréquence de cellules shTMEM16F exprimant CD69 suivant une stimulation de 20 heures avec de l'anti-DR ou l'anti-DR/CD4. Le pourcentage de cellules CD69⁺ obtenu par l'activation des cellules shTCR avec l'anti-DR ou l'anti-DR/CD4 est identique à celui obtenu pour les cellules shTMEM16F exprimant à la fois DR-CD3 ϵ δ et le TCR endogène. Ces résultats démontrent que la redistribution de PS par TMEM16F est requise pour activer les TCRs non-engagés afin d'amplifier la signalisation des TCRs et atteindre le seuil d'activation des cellules T. De plus, il a été démontré que le blocage de l'externalisation de la PS avec de l'Annexin-V soluble diminue l'internalisation des TCRs suivant l'activation des lymphocytes T, confirmant que la redistribution de PS régule l'amplification de l'activation des cellules T [370].

L'étude de Hu *et al* a démontré que l'expression de TMEM16F régule la formation de corps multivésiculaires suivant l'activation des cellules T. Les corps multivésiculaires fusionnent avec les endosomes et les lysosomes pour la dégradation de protéines. Les corps multivésiculaires se forment à une région de la MP riche en acide lysobisphosphatidique, un lipide qui s'accumule au cSMAC [88]. La diminution de l'expression de TMEM16F par ARN interférant réduit la quantité de vésicules marquées à l'acide lysobisphosphatidique et induit un délai dans le développement de corps multivésiculaires [368]. Au cSMAC, les TCRs ubiquitinés co-localisent avec l'acide lysophosphatidique pour leur internalisation dans des corps multivésiculaires et leur dégradation [414]. L'observation de Hu *et al* que les cellules shTMEM16F forment moins de corps multivésiculaires au cSMAC est consistante avec notre observation d'une diminution de l'activation et de l'internalisation des TCRs non-engagés en absence de TMEM16F. Les auteurs démontrent également une accumulation d'un rapporteur composé du domaine SH2 de ZAP-70 et argumentent que l'absence de TMEM16F favorise le maintien de la signalisation. Toutefois, la colocalisation du rapporteur avec les TCRs phosphorylés n'a pas été confirmée. De plus, les niveaux de phosphorylation temporels des molécules TCR-proximales n'ont pas été démontrés. En contraste, nous avons confirmé l'efficacité de notre ARN interférant contre TMEM16F et nous

avons démontré que l'activation des cellules shTMEM16F est diminuée, à la fois par la phosphorylation des molécules de signalisation et par marquage de CD69. Ainsi, nos résultats indiquent que TMEM16F régule positivement l'amplification de l'activation des cellules T.

La surexpression de TMEM16F ou l'expression de TMEM16F mutant augmente la proportion de cellules CD69⁺ suivant la stimulation de la chimère DR-CD3εδ avec 1µg/mL d'anti-DR. L'internalisation du TCR non-engagé suivant la stimulation de la chimère DR-CD3εδ avec 1µg/mL d'anti-DR pendant 1 heure est seulement observée dans les cellules exprimant le TMEM16F mutant. Ainsi, ces résultats confirment que l'activation de TCRs non-engagés par la redistribution de PS à la MP permet d'atteindre le seuil d'activation des cellules T.

La ligation des cellules surexprimant TMEM16F, sauvage ou mutant, avec de l'anti-DR/CD4 ou de l'anti-CD3/CD4 n'augmente pas la proportion de cellules exprimant CD69 ou internalisant le TCR endogène. Ces résultats indiquent les cellules Jurkat sauvages atteignent un seuil d'activation maximal suivant la ligation avec 1µg/mL d'anti-DR/CD4 ou d'anti-CD3/CD4. Toutefois, la réponse des cellules T qui atteignent le seuil d'activation est ensuite analogue, où un niveau d'activation plus élevé résulte en une augmentation du niveau d'expression de CD69 [423]. Nous observons une amplification de l'activation des cellules T par l'augmentation du marquage CD69 dans les cellules TMEM16F mutantes activées par l'anti-DR/CD4 ou l'anti-CD3/CD4. Ainsi, il est possible que l'expression du TMEM16F mutant n'entraîne pas une augmentation du nombre de TCRs activés suivant une activation robuste, mais plutôt amplifie le niveau d'activation des TCRs.

Afin de confirmer la régulation de l'amplification de l'activation des cellules T par la redistribution de PS dans un contexte physiologique, nous avons généré des lignées Jurkat exprimant deux TCRs distincts. Nous avons exprimé le TCR A6 spécifique pour le peptide Tax du virus HTLV1. Le TCR A6 est activé par des cellules lymphoblastiques JY présentant le peptide Tax sur HLA-A2. Suivant l'activation du TCR A6, nous observons une fréquence et un niveau plus élevé de CD69 pour les cellules surexprimant TMEM16F en comparaison avec les Jurkat TCR A6 sauvages. De plus, les cellules TMEM16F mutant démontrent un pourcentage et une expression plus élevée de CD69 que les Jurkats sauvages et les cellules surexprimant TMEM16F. En parallèle, nous observons une augmentation de l'internalisation du TCR endogène non-engagé dans les

cellules TMEM16F mutantes suivant la stimulation du TCR A6. Ainsi, l'activation physiologique par interaction TCR-pCMH récapitule l'activation de la chimère DR-CD3 $\epsilon\delta$ en présence du TCR endogène. De plus, en contraste avec les résultats obtenus avec la chimère DR-CD3 $\epsilon\delta$, nous observons que dans un contexte d'activation physiologique, la surexpression de TMEM16F sauvage ou mutant augmente la proportion de cellules qui atteignent le seuil d'activation des cellules T. Ainsi, l'augmentation de la redistribution de PS mène à une augmentation de l'activation des TCRs non-engagés pour l'amplification de l'activation des cellules T.

En conclusion, nous démontrons que l'expression de TMEM16F est requise pour l'atteinte du seuil d'activation suivant une stimulation sous-optimale des cellules T. La redistribution de PS par TMEM16F permet la dissociation membranaire et la phosphorylation d'un plus grand nombre de TCRs pour l'amplification de l'activation des cellules T. La réduction de l'internalisation des TCRs non-engagés observée chez les cellules shTMEM16F permettrait de prolonger la signalisation pour l'activation des cellules T. En contraste, l'internalisation plus forte des TCRs non-engagés dans les cellules TMEM16F mutant permettrait l'extinction plus rapide de la signalisation.

4.5.2 L'engagement en série des TCRs

Nos résultats démontrent que TMEM16F régule l'amplification de l'activation des cellules T. Un modèle d'amplification de l'activation des cellules T proposé dans la littérature est l'engagement en série des TCRs. Ce modèle propose qu'un seul pCMH active plus d'un TCR dans les microagrégats de TCRs [111]. Ce modèle a été proposé suivant l'observation que la majorité des TCRs sont internalisés suivant l'activation des lymphocytes T avec une faible quantité de pCMHs agoniste [111].

Il a été démontré que la diminution du potentiel électrostatique de la MP par la réduction de PI(4,5)P₂ augmente la mobilité latérale des TCRs [363]. Ainsi, la diminution des interactions électrostatiques entre les chaînes CD3 du TCR et la MP pourrait favoriser la diffusion latérale des TCRs. Il a été démontré que la mobilité latérale des TCRs permet leur recrutement à la synapse immunologique [424]. Ainsi, l'augmentation de la diffusion des TCRs pourrait faciliter la formation de microagrégats afin de promouvoir l'engagement en série des TCRs. Nous allons étudier la

mobilité latérale du rapporteur HA-KIR-CD3ε-mTFP1 suivant l'activation de la redistribution de PS par TMEM16F par la méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP). Cette méthode permet d'étudier la mobilité latérale de molécules par la récupération de la fluorescence suivant le photoblanchiment d'une portion de la cellule. La mobilité latérale de complexes de TCRs conjugués à une protéine fluorescente sera également étudiée [424]. Nous allons ensuite étudier par FRAP si la redistribution de PS par TMEM16F facilite le recrutement d'HA-KIR-CD3ε-mTFP1 et de TCRs à la synapse immunologique.

En parallèle, dans notre modèle de Jurkat exprimant le TCR A6, nous allons étudier la cinétique d'internalisation du TCR A6 activé suivant la modulation de l'expression de TMEM16F. Ainsi, dans ce modèle d'activation physiologique, nous allons pouvoir déterminer si la redistribution de PS par TMEM16F amplifie l'engagement en série des TCRs.

4.5.3 L'amplification par les pCMHs du soi

Un autre modèle proposé pour l'amplification de l'activation des lymphocytes T est la stimulation de TCRs par les pCMHs qui présentent des peptides du soi non-agonistes. Il a été démontré que l'interaction entre les co-récepteurs CD4 ou CD8 et des pCMHs non-agonistes recrute la kinase Lck et les TCRs à la synapse immunologique [351, 352, 354, 355]. Les pCMHs du soi augmentent l'internalisation des TCRs et la proportion de cellules CD69⁺ [353]. Dans notre étude, nous avons confirmé que la ligation de CD4 contribue à l'atteinte du seuil d'activation des cellules T par l'augmentation de la population CD69⁺ et de l'internalisation des TCRs. Nos résultats indiquent que TMEM16F pourrait réguler l'amplification de l'activation des cellules T suivant l'interaction entre les pCMHs du soi avec les TCRs et les co-récepteurs.

Un système de titration de peptides du soi a été précédemment utilisé afin de démontrer le rôle des peptides non-agonistes dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Dans ce système, les pCMHs agonistes sont exprimés par un vecteur codant pour le peptide et le complexe du CMH de classe I. Les pCMHs non-agonistes sont exprimés dans un vecteur inducible à la doxycycline, ce qui permet la titration de l'expression des pCMHs du soi par la CPA [355]. L'activation des cellules T par les pCMHs agonistes était augmentée en présence des pCMHs du soi. Dans cette étude, il a été démontré que l'expression de pCMHs du soi n'augmente pas l'internalisation des

TCRs de manière significative. Ceci indique que les pCMHs non-agonistes ne mènent pas à l'activation de TCRs qui ne sont pas engagés par un pCMH agoniste [355]. Toutefois, le niveau d'internalisation du TCR non-engagé varie selon la lignée cellulaire utilisée [111, 168]. Dans l'étude, il est plutôt proposé que les pCMHs du soi amplifient l'activation des cellules T par l'augmentation de la phosphorylation de CD3 et des molécules de signalisation TCR-proximales [355].

Le système d'expression inductible des pCMHs du soi pourrait être utilisé afin d'éclaircir le rôle de TMEM16F et des TCRs non-engagés dans l'amplification de l'activation des cellules T par les peptides du soi. Avec ce système, nous pourrions moduler le niveau d'expression des pCMHs présentant des peptides agonistes ou non-agonistes. Le niveau d'activation des cellules shTMEM16F ou surexprimant le TMEM16F sauvage ou mutant pourrait être suivi par la phosphorylation des molécules TCR-proximales, l'internalisation des TCRs et l'expression de marqueurs d'activation comme CD69. De plus, nous pourrions étudier le rôle des pCMHs du soi dans l'activation des TCRs non-engagés dans un système où deux TCRs distincts sont exprimés. Enfin, le rôle de TMEM16F dans l'activation des TCRs par les pCMHs du soi sera étudié dans différentes lignées cellulaires et en cellules T primaires. Ces expériences permettraient d'éclaircir le rôle des pCMHs non-agonistes dans l'activation des TCRs non-engagés pour l'amplification de l'activation des cellules T.

4.5.4 La modulation des phosphoinositides

Les principaux contributeurs à la charge électrostatique négative de la MP sont la PS et PI(4,5)P₂. La modulation de chacun de ces phospholipides entraîne une perte de la charge négative de la MP. À la synapse immunologique, le potentiel électrostatique du cSMAC est diminué en comparaison avec la région périphérique [310]. La formation de la synapse immunologique mature est accompagnée d'un réarrangement des PIs à la MP, où les phospholipides PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃ sont exclus du cSMAC [360, 362]. La perte des PIs à la synapse immunologique pourrait entraîner la dissociation des chaînes CD3ε et CD3ζ du TCR par la diminution des interactions électrostatiques.

Il a été démontré que les domaines BRS des chaînes CD3ε et CD3ζ s'associent avec une plus forte affinité aux PIs qu'à la PS [315, 425]. De plus, une étude a démontré que la diminution de la concentration de PI(4,5)P₂ par l'expression ectopique de la phosphatase Inp54p à la MP entraîne la dissociation membranaire de CD3ε. L'expression ectopique d'Inp54p mène à une augmentation de la phosphorylation basale de CD3ζ ainsi qu'à une augmentation des molécules de signalisation TCR-proximale suivant la stimulation [363]. Toutefois, l'importance de la modulation de PI(4,5)P₂ dans l'association membranaire de CD3ε à la synapse immunologique n'a pas été démontré dans l'étude. Nos résultats démontrent une absence de dissociation membranaire de CD3ε non-engagé à la synapse immunologique chez les cellules exprimant un ARN interférant contre TMEM16F. Ainsi, la redistribution de PS par TMEM16F à la synapse immunologique est suffisante à la dissociation membranaire de CD3ε.

PI(4,5)P₂ régule l'activité de certains canaux ioniques à la MP en facilitant l'ouverture du canal pour le passage d'ions [426]. Il a été démontré que l'activation du canal ionique de TMEM16F nécessite l'élévation de calcium intracellulaire et PI(4,5)P₂ à la MP. Le passage d'ions par TMEM16F devient désensibilisé et inhibé à des concentrations élevées de calcium. L'ajout exogène de PI(4,5)P₂ ou de PI(3,4,5)P₃ résensibilise TMEM16F au calcium et réactive sa fonction de canal ionique. La mutation de résidus basiques dans une section chargée positivement du domaine N-terminal, qui pourrait s'associer à PI(4,5)P₂ ou d'autres phospholipides acides, diminue la sensibilité de TMEM16F au calcium [427]. Similairement à TMEM16F, la fonction de canal ionique de TMEM16A nécessite le calcium et l'interaction de différents résidus basiques avec PI(4,5)P₂ [428-430].

L'impact de la concentration élevée de calcium et de PI(4,5)P₂ sur l'activité scramblase de TMEM16F n'a pas été démontré [427]. Une étude structurale a démontré l'amincissement de la membrane lipidique lorsque TMEM16F est en présence de calcium et de PI(4,5)P₂. Il est proposé que l'amincissement de la membrane facilite le transport de lipides par TMEM16F [288]. Toutefois, une étude in vitro a démontré que l'efficacité de redistribution de phospholipides par TMEM16F ne dépendait pas de la présence ou l'absence de PI [431]. De plus, l'activité scramblase de TMEM16F ne semble pas désensibilisée par une concentration élevée de calcium puisque nous avons démontré une redistribution graduelle de PS malgré une élévation immédiate de calcium.

Ainsi, des études supplémentaires seront nécessaires afin d'élucider le rôle de PI(4,5)P₂ dans l'activation de la scramblase TMEM16F et dans la dissociation membranaire de CD3ε. La phosphatase Inp54p et les inhibiteurs de Pls sont des outils qui peuvent être utilisés afin de déterminer si l'activité scramblase de TMEM16F est régulée par PI(4,5)P₂. Des cellules exprimant la phosphatase Inp54p pourraient être stimulées avec l'ionomycine afin de déterminer si la réduction de PI(4,5)P₂ prévient la redistribution de PS. Alternativement, la redistribution de PS par TMEM16F pourrait être étudiée suivant le prétraitement de cellules avec de la néomycine, une molécule antibiotique qui masque la charge négative de PI(4,5)P₂ [363, 429].

Il est essentiel de mieux comprendre la régulation de l'activation de TMEM16F par PI(4,5)P₂ puisque ce phospholipide est modulé de manière dynamique à la synapse immunologique. La méthode de FRET que nous avons développé nous permettrait d'élucider le rôle de la modulation de PI(4,5)P₂ dans la dissociation membranaire de CD3ε. Des cellules FRET exprimant à la fois l'ARN interférant contre TMEM16F et la phosphatase Inp54p pourraient être utilisées pour déterminer si la modulation de PI(4,5)P₂ peut entraîner la dissociation membranaire de CD3ε à la synapse immunologique. En parallèle, dans des Jurkat sauvages, la redistribution de PS par TMEM16F et la diminution de PI(4,5)P₂ pourraient s'additionner pour augmenter le niveau de dissociation membranaire de CD3ε, sauf si TMEM16F nécessite PI(4,5)P₂ pour son activation.

La régulation de l'activité de TMEM16F par PI(4,5)P₂ indique que TMEM16F serait désensibilisé au cSMAC, où la concentration de calcium est élevée et où PI(4,5)P₂ est absent. Toutefois, TMEM16F serait actif en périphérie du cSMAC, où sont localisés PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃. De plus, puisque les molécules de signalisation comme Lck, CD28 et ZAP-70 sont présentes en périphérie du cSMAC, l'activation de TMEM16F par PI(4,5)P₂ pourrait y induire la dissociation membranaire et l'activation de TCRs non-engagés.

4.6 Limitations du modèle cellulaire Jurkat dans l'étude des lipides à la MP et dans la signalisation TCR-proximale

Le modèle Jurkat a été essentiel à la communauté scientifique afin d'élucider les cascades de signalisation TCR-dépendantes. En comparaison avec les cellules T primaires humaines,

l'utilisation des cellules Jurkat a été avantageuse par leur facilité de transduction, leur maintenance à long terme en culture, leur expansion rapide in vitro, ainsi que l'absence de variabilité associée à l'isolation de lymphocytes T chez différents donneurs humains [432]. Toutefois, comme toutes lignées cellulaires immortalisées, les cellules Jurkats présentent plusieurs limitations. La lignée cellulaire Jurkat est dérivée de cellules isolées chez un garçon de 14 ans atteint d'une leucémie aiguë lymphoblastique T [432]. Les cellules Jurkats présentent plusieurs défauts génétiques, dont l'absence de l'expression des phosphatases PTEN et SHIP [311, 433]. Ces phosphatases contre-balancent l'activité de PI3K, ce qui résulte en une concentration basale élevée de PI(3,4,5)P₃ à la MP des cellules Jurkat [311, 433].

Les défauts dans l'homéostasie des PIs chez les cellules Jurkats présentent des limitations pour l'étude des lipides à la MP et pour la signalisation du TCR. En effet, il est possible que la concentration élevée de PI(3,4,5)P₃ augmente le potentiel électrostatique de la MP [310]. Ceci pourrait engendrer une interaction plus forte entre les chaînes CD3ε et CD3ζ du TCR et la MP des cellules Jurkat. Malgré une concentration élevée de PI(3,4,5)P₃ à la MP, nous avons observé une dissociation membranaire de CD3ε suite à un influx robuste de calcium, soit suivant une stimulation à l'ionomycine ou lors de la formation de la synapse immunologique. Ainsi, une concentration élevée de PI(3,4,5)P₃ ne prévient pas la dissociation membranaire de CD3ε lorsque la PS est redistribuée par TMEM16F. En absence de TMEM16F, nous n'observons pas de dissociation membranaire du rapporteur FRET pour CD3ε suite à un influx de calcium. Il est possible que l'élévation de PI(3,4,5)P₃ dans la lignée Jurkat pourrait prévenir la d'une dissociation membranaire calcium-dépendante de CD3ε en absence de TMEM16F.

Afin d'exclure un rôle direct du calcium dans la dissociation membranaire de CD3ε en absence d'expression de TMEM16F, les expériences de FRET devront être répétées chez des cellules T primaires humaines. Les cellules T primaires humaines ont été précédemment utilisées avec succès afin de démontrer par FRET la dissociation membranaire de CD3ε à la synapse immunologique [318]. Ces cellules présentent un modèle pour l'étude de l'association membranaire de CD3ε dans un contexte où l'homéostasie des PIs est normale.

De plus, par l'activation constitutive de PI3K, les cellules Jurkats démontrent un phénotype hyperactivé en réponse à la stimulation du TCR, qui est observé par la phosphorylation des molécules TCR-proximales et de la voie MAP kinase [311, 432]. De plus, les cellules Jurkats démontrent un influx de calcium plus élevé que les cellules T primaires humaines [432]. Ainsi, le rôle de la redistribution de PS par TMEM16F sur la phosphorylation de molécules TCR-proximales devra être étudié dans un contexte plus physiologique chez cellules T primaires. Enfin, par l'utilisation du modèle Jurkat, notre étude s'est limitée aux étapes initiales de l'activation des cellules T, soit au niveau de la phosphorylation des molécules d'activation TCR-proximales, l'internalisation des TCRs ainsi que l'expression de CD69. Les différentes limitations du modèle Jurkat quant à l'étude de l'activation à long terme des cellules T nous ont menées à étudier le rôle de TMEM16F dans un modèle de cellules T primaires murines.

4.7 La redistribution de la PS dans la réponse immunitaire des lymphocytes T

Nous avons démontré que la redistribution de PS par TMEM16F permet le passage du seuil d'activation des cellules T. Nos résultats démontrent que TMEM16F augmente la dissociation membranaire et l'activation de TCRs non-engagés à la synapse immunologique afin d'amplifier l'activation des cellules T. Nous avons ensuite voulu étudier l'impact à long terme de la redistribution de PS calcium-dépendante dans la réponse immunitaire des cellules T.

4.7.1 TMEM16F dans l'éducation des lymphocytes T

Dans l'étude de Hu *et al* (2016), il a été démontré que les cellules T issues de souris *Tmem16f*^{-/-} sont suractivées en comparaison avec les cellules T des souris sauvages [368]. En contraste, nous avons démontré que la diminution de l'expression de TMEM16F par ARN interférant réduit l'amplification de l'activation des cellules T. Les données d'Immgen démontrent une régulation temporelle de l'expression de TMEM16F durant le développement des thymocytes (**Chapitre 3, Figure 1**). L'expression de TMEM16F est maximale au stade DP lors de la sélection positive et négative. Lors de la sélection positive, les thymocytes interagissent avec des pCMHs du soi exprimés par les cellules corticales épithéliales du thymus.

Il a été démontré que les thymocytes sont plus sensibles aux peptides à faible affinité que les lymphocytes T matures [434, 435]. En périphérie, les lymphocytes T matures reçoivent des signaux de survie par l'IL-7 et par la signalisation tonique générée par l'interaction du TCR avec des pCMHs du soi. Malgré que les lymphocytes T matures expriment un niveau plus élevé de TCRs que les thymocytes présélection, la signalisation reçue par les pCMHs du soi en périphérie n'engendre pas une signalisation aussi forte que celle observée lors de la sélection positive des thymocytes [7, 434]. En effet, la quantité de Lck associé au TCR est plus élevée dans les thymocytes que les lymphocytes T périphériques [435].

La signalisation engendrée par des peptides à faible affinité est restreinte chez les lymphocytes T matures par différents mécanismes. Par exemple, chez les lymphocytes T matures, la phosphatase PTPN22 réduit la signalisation du TCR en réponse à des peptides de faible affinité en déphosphorylant différents substrats comme les chaînes CD3 du TCR et les kinases Lck et ZAP-70 [436, 437]. Les lymphocytes T matures possèdent une expression plus élevée de PTPN22 que les thymocytes [7]. En contraste, le microARN mir-181a régule positivement la signalisation du TCR chez les thymocytes en réprimant l'expression de différentes phosphatases, telle que PTPN22 [438].

La protéine THEMIS démontre un profil d'expression similaire à TMEM16F chez les thymocytes, où l'expression est maximale au stade DP [439]. Les souris *Themis*^{-/-} démontrent défaut dans la sélection positive des thymocytes DP [439-441]. Chez les lymphocytes T périphériques, THEMIS régule négativement la phosphatase SHP-1 afin de promouvoir la signalisation tonique du TCR suivant l'interaction avec les pCMHs du soi [442]. Le mécanisme de cette régulation reste controversé chez les thymocytes, où une régulation négative et positive de SHP-1 par THEMIS a été observée [441, 443]. Toutefois, des études réalisées in vivo démontrent que THEMIS régule positivement la signalisation du TCR lors de la sélection positive [440]. Ainsi, la machinerie d'activation des thymocytes est adaptée pour répondre à des interactions de faible affinité avec les pCMHs du soi durant la sélection positive [7]. Similairement à THEMIS, l'expression élevée de TMEM16F au stade DP indique que la scramblase pourrait être impliquée dans la sélection des thymocytes par la redistribution de PS.

De plus, il a été démontré que la concentration de calcium cytoplasmique augmente chez les thymocytes lors de la sélection positive et négative [377, 444]. Les thymocytes doivent accumuler des signaux d'activation, comme l'activation de ZAP-70 et l'élévation du calcium intracellulaire, pendant plusieurs heures afin de pouvoir passer le seuil d'activation de la sélection positive [377, 445]. En contraste, la sélection négative est associée à une signalisation et une élévation de calcium plus rapide et robuste [444, 445]. La fenêtre d'affinité pour la sélection des TCRs des thymocytes est stricte, où une affinité trop faible résulte en la mort par négligence tandis que l'affinité trop forte induit l'apoptose des thymocytes [446]. Le calcium est essentiel pour l'activation de TMEM16F mais également pour les cascades d'activation des cellules T et la translocation du facteur de transcription NFAT au noyau.

Lors de la sélection positive, la signalisation générée au TCR est corrélée à l'avidité de l'interaction avec les pCMHs du soi. Suivant la sélection positive, les thymocytes expriment le marqueur d'activation CD69, le récepteur inhibiteur CD5, et augmentent l'expression du TCR [377, 445]. Les thymocytes ayant reçu une signalisation plus élevée par le TCR expriment un niveau plus élevé de CD5 en périphérie [447]. CD5 recrute les ubiquitines ligases c-Cbl et Cbl-b, qui ubiquitinent le TCR afin de le cibler pour son internalisation et restreindre la signalisation [448]. Dans les souris *Tmem16f*^{-/-}, il a été démontré par marquage CD4 et CD8 que le développement des thymocytes est normal [368, 374]. Toutefois, l'expression des marqueurs CD69, CD5 et du TCR dans les thymocytes ou les lymphocytes T périphériques des souris *Tmem16f*^{-/-} n'a pas été étudiée. Enfin, des études sur le répertoire des TCRs exprimé par les lymphocytes T périphériques des souris *Tmem16f*^{-/-} n'ont pas été réalisées [368, 374].

Selon nos résultats, l'absence de TMEM16F lors du développement des lymphocytes T pourrait réduire la signalisation du TCR et dévier la sélection positive et négative vers des TCRs à plus haute affinité. En effet, l'absence de TMEM16F pourrait augmenter le seuil d'activation nécessaire pour la sélection positive et négative. Ainsi, une affinité plus forte des TCRs serait requise pour atteindre le seuil d'activation lors de la sélection. Une fois en périphérie, les cellules T sélectionnées à haute affinité pourraient démontrer un phénotype d'activation plus élevé suivant une stimulation avec un pCMH agoniste, comme il a été observé pour les souris *Tmem16f*^{-/-} [368]. Ce mécanisme de compensation pourrait expliquer l'absence de défauts immunitaires

majeurs chez les patients atteints du syndrome de Scott, qui n'expriment pas une protéine TMEM16F fonctionnelle.

Plusieurs modèles murins sont à disposition afin d'étudier l'efficacité de la sélection positive et négative en absence de TMEM16F. L'efficacité de la sélection négative peut être étudiée en croisant les souris *Tmem16f*^{-/-} avec des souris possédant un TCR transgénique spécifique à l'antigène HY exprimé seulement chez les mâles. Une sélection négative efficace chez les mâles exprimant le TCR HY résulte en une absence de lymphocytes T en périphérie. Les thymocytes ne sont pas éliminés chez les femelles, qui n'expriment pas l'antigène HY [449]. La présence de lymphocytes T matures en périphérie de souris mâles *Tmem16f*^{-/-} HY indiquerait un défaut dans la signalisation du TCR nécessaire à la sélection négative. Enfin, la sélection positive peut être étudiée dans un modèle de TCR transgénique, comme le TCR OT-I, par la culture de thymocytes sur des tranches de thymus présentant des peptides OVA mutés à différentes affinités [444]. Ainsi, par l'étude de la sélection positive et négative en absence de TMEM16F, nous pourrions éclaircir son rôle dans l'amplification de la signalisation générée par les interactions TCR-pCMH du soi dans le thymus.

4.7.2 TMEM16F dans l'activation des lymphocytes T primaires

La stimulation du TCR mène à la répression de l'expression de TMEM16F, à la fois lors de la sélection positive et suivant l'activation de lymphocytes T périphériques (**Chapitre 3, Figures 1 et 2**). L'activation des lymphocytes T est accompagnée de la translocation de plusieurs facteurs de transcription au noyau permettant la répression ou l'expression de plusieurs gènes, comme le récepteur de l'IL-2 à haute affinité. De plus, l'activation des lymphocytes T entraîne des modifications dans l'accessibilité à la chromatine aux sites de liaisons des facteurs de transcription, où plusieurs gènes sont réprimés ou régulés positivement [450]. L'expression de plusieurs gènes est modulée dès la première division suivant l'activation des lymphocytes T [451].

Nous avons observé une forte diminution de l'expression de TMEM16F après 24 heures d'activation, indiquant une répression rapide de son expression. Ainsi, une fois les cellules T activées, l'expression de TMEM16F devient dispensable, suggérant que l'expression de TMEM16F est critique pour l'activation initiale des cellules T. En effet, il a été démontré que l'accumulation

de signaux de stimulation du TCR n'est plus nécessaire lorsque les lymphocytes T se commettent à la prolifération [452]. Toutefois, les facteurs transcriptionnels ou épigénétiques régulant l'expression de TMEM16F n'ont pas encore été identifiés. Nous allons utiliser des outils d'analyse bio-informatique et des données publiques afin de prédire les facteurs de transcriptions pouvant s'associer au promoteur de *Tmem16f*, en plus d'identifier les modifications épigénétiques dans le gène. L'association des facteurs de transcriptions à *Tmem16f* sera confirmée par immunoprécipitation de chromatine suivie de séquençage (ChIP-seq). Ces études nous permettront de mieux comprendre la régulation de TMEM16F lors de l'activation des cellules T.

L'étude de Hu et al (2016) démontre une augmentation de la fréquence des lymphocytes T *Tmem16f*^{-/-} après une semaine d'une infection virale chronique au LCMV clone 13 [368]. En contraste, il a été démontré que les souris *Tmem16f*^{-/-} contrôlent moins efficacement une infection bactérienne. Les souris *Tmem16f*^{-/-} infectées à *L. monocytogenes* démontrent une plus grande charge bactérienne dans la rate et dans le foie [374]. Toutefois, cette étude ne s'est pas concentrée sur la réponse des lymphocytes T. L'étude a démontré que la redistribution de PS et la formation de microvésicules par TMEM16F est requise pour la réparation de la MP suivant une brèche causée par la toxine listériolysine O de *L. monocytogenes*. La listériolysine O forme des pores à la MP, ce qui induit un influx de calcium intracellulaire activant l'activité scramblase de TMEM16F. La redistribution de PS permet la formation de microvésicules et la réparation du pore à la MP. En absence de TMEM16F, la listériolysine O augmente la mortalité des cellules immunitaires comme les neutrophiles lors d'une infection à *L. monocytogenes* [374].

Afin d'étudier le rôle de TMEM16F dans l'activation des cellules T primaires, nous avons développé un modèle de transduction de lentivirus exprimant shScr et shTMEM16F dans des cellules T naïves périphériques isolées de souris *Rag1*^{-/-} OT-I (**Chapitre 3, Figure 3A**). Ce modèle nous permet d'étudier la réponse immunitaire en absence de TMEM16F seulement dans les cellules T. Ainsi, nous évitons la toxicité pouvant résulter de l'absence de TMEM16F dans les cellules immunitaires innées. En transduisant des cellules périphériques, nous nous assurons que les cellules transduites avec shScr et shTMEM16F ont été sélectionnées de manière identique dans le thymus et qu'elles possèdent la même affinité pour le peptide OVA. De plus, puisque nous transduisons les cellules T avant de les activer, nous pouvons étudier les conséquences de la

modulation de l'expression de TMEM16F à partir des étapes initiales de l'activation des cellules T.

Nous avons observé une forte diminution de la fréquence des lymphocytes T shTMEM16F suivant une activation in vitro avec des RAW présentant le peptide OVA ou suivant une infection bactérienne au Lm-OVA (**Chapitre 3, Figures 4C et 8C**). In vitro, les cellules T primaires shTMEM16F démontrent une augmentation de la proportion de cellules apoptotique, marquées à la caspase-3 activée, ainsi qu'une diminution de leur prolifération suivant l'activation (**Chapitre 3, Figures 5C et 6B**). Il a été démontré que la force d'activation du TCR était corrélée au niveau d'expansion des lymphocytes T [182, 452]. Toutefois, l'étude des marqueurs d'activation n'a démontré aucun défaut dans le statut d'activation des cellules shTMEM16F in vitro (**Chapitre 3, Figure 7B**). Nos résultats d'activation in vitro indiquent que TMEM16F régule la survie et l'expansion des lymphocytes T, sans toutefois moduler le niveau d'activation comme nous l'avons observé dans la lignée Jurkat. Puisqu'il est possible de l'absence de TMEM16F induit un délai dans l'activation, nous allons étudier les marqueurs d'activation à des points temporels plus précoces.

Afin d'étudier le rôle de TMEM16F lors d'une réponse immunitaire protectrice des cellules T, nous avons co-transféré des cellules T OT-I shScr et shTMEM16F dans des souris congéniques que nous avons infectées au Lm-OVA. La diminution de la fréquence des cellules shTMEM16F dans le modèle in vivo est similaire à celle observée lors des activations in vitro. L'étude des marqueurs de différenciation de cellules T effectrices (CD127 et KLRG1) isolées du foie à jour 5 post-infection ont démontré une augmentation de la proportion de la population immature EEC dans les cellules shTMEM16F (**Chapitre 3, Figure 8E**). Des expériences de tris et de transfert des différentes sous-populations effectrices dans une souris infectée ("infection-matched") ont démontré que les EEC possèdent le potentiel de différenciation le plus élevé. Malgré leur statut peu différencié, les EECs possèdent un potentiel cytolytique similaire au T_{EFF} et au T_{MP} [208].

Enfin, l'étude des marqueurs d'activation démontre un défaut d'activation dans les cellules shTMEM16F in vivo (**Chapitre 3, Figure 9B**). Nous observons une expression plus faible de CD44 dans les cellules shTMEM16F à jour 5 post-infection. Il a été démontré que le niveau d'expression de CD44 est corrélé au niveau d'activation du TCR [453]. Nous observons un

fréquence plus faible de cellules exprimant le marqueur d'activation Ly6C. En contraste, nous observons une fréquence plus élevée de cellules shTMEM16F exprimant CD62L et CD69 à jour 5 post-infection. À ce point temporel, l'expression de CD62L et CD69 est réprimée chez les lymphocytes T. Ainsi, nos résultats suggèrent un délai dans la progression de l'activation des cellules shTMEM16F. Nous avons également observé qu'une population de cellules shScr exprime CD69 dans les souris non-infectées. Les lymphocytes T naïfs peuvent exprimer CD69 de manière transitoire suivant l'interaction avec les pCMHs du soi dans les organes lymphoïdes secondaires [454]. En conclusion, la diminution de l'activation des cellules shTMEM16F in vivo est consistante avec nos résultats démontrant que TMEM16F régule l'amplification de l'activation des lymphocytes T.

L'infection intraveineuse au *L. monocytogenes* se dissémine rapidement au foie et à la rate [381]. Afin d'étudier temporellement la différenciation et l'activation des cellules shTMEM16F in vivo, nous allons étudier les marqueurs de différenciation et d'activation des cellules T effectrices isolées des ganglions, de la rate et du foie aux jours 3, 5 et 8 post-infection. De plus, nous allons déterminer si la diminution de la fréquence des cellules shTMEM16F dans la rate est reliée à l'apoptose ou un défaut d'expansion. Les cellules seront marquées au CFSE avant le transfert et la prolifération sera étudiée au jour 3 post-infection. La proportion de cellules transférées apoptotiques exprimant la caspase-3 activées sera suivie temporellement par cytométrie en flux. Afin de déterminer si les cellules shTMEM16F persistent, nous allons étudier les phénotypes de cellules mémoires à 60 jours post-infection. Enfin, nous allons répéter les expériences d'activation in vitro et in vivo avec le TMEM16F mutant afin d'étudier le rôle de l'amplification de la redistribution de PS sur l'activation, la différenciation et la persistance des cellules T primaires et dans la réponse immunitaire.

De plus, il n'est pas connu si TMEM16F régule la survie des lymphocytes T matures en périphérie par l'amplification de la signalisation tonique du TCR. En périphérie, les lymphocytes T naïfs prolifèrent par la signalisation tonique générée par l'interaction du TCR avec les pCMHs du soi et par les cytokines homéostatiques IL-7 et IL-15. Afin d'étudier le rôle de TMEM16F sur la prolifération homéostatique des lymphocytes T, nous allons co-transférer les cellules OT-I transduites avec shScr et shTMEM16F dans des souris $CD3\epsilon^{-/-}$. Les souris $CD3\epsilon^{-/-}$ n'expriment pas

de cellules T périphériques, permettant d'étudier la prolifération homéostatique dans un environnement lymphopénique, où la compétition pour les cytokines est réduite [455]. Nous allons étudier la fréquence des populations shScr et shTMEM16F dans les organes lymphoïdes secondaires 4 à 6 semaines après le transfert [456]. De plus, par marquage des lymphocytes transduit au CFSE, nous pourrions étudier la prolifération des cellules primaires shScr et shTMEM16F dans un environnement lymphopénique. Ainsi, par l'étude de l'ontogenèse, de la prolifération homéostatique et de la réponse immunitaire des cellules T, nous pourrions mieux comprendre le rôle de la redistribution de PS par TMEM16F dans la régulation l'activation du TCR.

4.7.3 La PS externalisée comme bouclier contre la perforine

Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques induisent l'apoptose de cellules cibles en sécrétant des granules cytotoxiques composées de perforine et de granzyme [6]. Une étude récente démontre que la PS externalisée chez les CTLs offre une protection contre la perforine sécrétée à la synapse immunologique. La perforine interagit avec la membrane de la cellule cible par son domaine C2 lié à un ion de calcium afin de se polymériser et de former un pore. La CTL est insensible à sa propre sécrétion de perforine et seule la cellule cible est éliminée par apoptose. La MP des CTLs est composée d'une concentration plus élevée de cholestérol et de radeaux lipidiques que les cellules T CD8+ naïves ou les cellules cibles [403, 406]. In vitro, la perforine s'associe moins efficacement aux membranes lipidiques riches en cholestérol. De plus, tandis que la perforine peut s'associer à des membranes lipidiques riches en PS, elle ne peut pas former de pores. À la surface des CTLs, la PS et les radeaux lipidiques sont co-localisés avec la perforine sous forme de puncta. La composition lipidique unique de la MP des CTLs, riche en radeaux lipidiques et en PS, réduit l'association de la perforine à la MP et empêche la formation des pores de perforine, respectivement [403].

Il sera intéressant d'étudier le rôle de la redistribution de PS par TMEM16F dans la capacité cytolytique des lymphocytes T murins et dans la protection contre leur sécrétion de perforine. La fonction effectrice des lymphocytes T CD8+ exprimant le TCR transgénique OT-I est étudiée par la lyse de cellules cibles, comme les cellules de la lignée lymphoïde EL4 exprimant le peptide OVA. La dégranulation est également étudiée par l'expression du marqueur lysosomal CD107a/LAMP-

1 à la MP [457]. La fonction effectrice des lymphocytes T CD8⁺ exprimant le shTMEM16F sera étudiée par marquages intracellulaires ou par qPCR pour l'IFN- γ , TNF- α et granzyme B. De plus, la viabilité des cellules shTMEM16F suivant la lyse cytotoxique sera étudiée afin de déterminer si la redistribution de PS par TMEM16F est requise dans la protection contre la perforine.

4.7.4 Régulation de l'expression de protéines par la PS externalisée

L'activation des lymphocytes T module l'expression de plusieurs protéines en surface. Chez les lymphocytes T activés, la diminution de l'expression de la molécule d'adhésion CD62L permet la circulation des lymphocytes vers le site d'infection en périphérie et empêche la remigration aux tissus lymphoïdes [211]. L'activation des lymphocytes T entraîne le clivage des domaines extracellulaires de CD62L, de TNF- α et du récepteur de TNF- α 1 (TNFR1) par la protéase ADAM17 [458-460]. L'activation d'ADAM17 est régulée par la redistribution de PS calcium-dépendante par TMEM16F [461]. De plus, l'expression du mutant constitutivement actif de TMEM16F augmente l'activité protéolytique d'ADAM17 [461, 462]. La PS externalisée active ADAM17 en interagissant avec un motif cationique situé dans sa portion extracellulaire [462, 463]. Il a été démontré qu'en absence d'ADAM17, le clivage de CD62L est plus lent mais pas abrogé [459, 464]. De plus, le clivage calcium-dépendant de TNFR1 est réduit en absence de TMEM16F [461]. Ainsi, la redistribution de PS par TMEM16F pourrait réguler le clivage de différentes molécules de surface suivant l'activation des lymphocytes T.

Nous n'avons pas observé de défauts dans la diminution de l'expression de CD62L suivant l'activation in vitro et in vivo des cellules shTMEM16F. Toutefois, il est possible qu'en absence de TMEM16F les cellules démontrent un délai dans le clivage de CD62L. La diminution de CD62L a été observée suivant une heure d'activation des lymphocytes T in vitro, tandis que la sécrétion de TNF- α a été observée après 4 heures d'activation [465]. Ainsi, afin de confirmer le rôle de TMEM16F dans l'activation d'ADAM17, nous allons étudier la perte d'expression de CD62L, TNF- α et TNFR1 des lymphocytes T transduits avec shTMEM16F à différents points temporels précoces suivant l'activation in vitro avec des RAW-OVA ou de l'ionomycine. La diminution ou le délai du clivage de TNFR1 dans les cellules shTMEM16F pourrait les sensibiliser à TNF- α et ainsi expliquer l'augmentation de l'apoptose que nous observons en réponse à l'activation [465].

4.8 TMEM16F comme cible thérapeutique dans l'immunothérapie du cancer

Les cellules cancéreuses développent différents mécanismes afin d'échapper à la surveillance du système immunitaire. L'immunothérapie a pour but de modifier la réponse du système immunitaire du patient afin de combattre le cancer. Un avantage majeur de l'immunothérapie est la formation d'une mémoire immunologique afin de contrôler la résurgence de la tumeur [466]. La modulation de l'association membranaire de CD3 ϵ et de l'activation des lymphocytes T par l'activité scramblase de TMEM16F a plusieurs implications pour l'immunothérapie contre le cancer. De plus, les récepteurs immuns CD28 et 4-1BB, qui possèdent également un domaine BRS cytoplasmique, sont utilisés dans certaines immunothérapies. Ainsi, la modulation de l'activité de TMEM16F pourrait permettre l'amélioration de l'activation des cellules T dans les immunothérapies ciblant le cancer.

4.8.1 Amplification de l'activation des récepteurs chimériques d'antigènes

La compréhension des mécanismes de dissociation membranaire du TCR est essentielle pour l'étude de l'activation des récepteurs chimériques d'antigènes, les CARs, utilisés en immunothérapie. Les CARs sont générés par la fusion entre le domaine extracellulaire à haute affinité d'un anticorps et les domaines cytoplasmiques de récepteurs des cellules T. Plus précisément, les CARs sont composés d'un domaine extracellulaire scFv, d'un domaine transmembranaire et cytoplasmique d'un récepteur de co-stimulation comme CD28 ou 4-1BB suivi de la chaîne cytoplasmique de CD3 ζ . Un scFv est issu de la liaison entre la chaîne lourde et légère du domaine variable d'un anticorps qui reconnaît un antigène tumoral (**Figure 2**) [467].

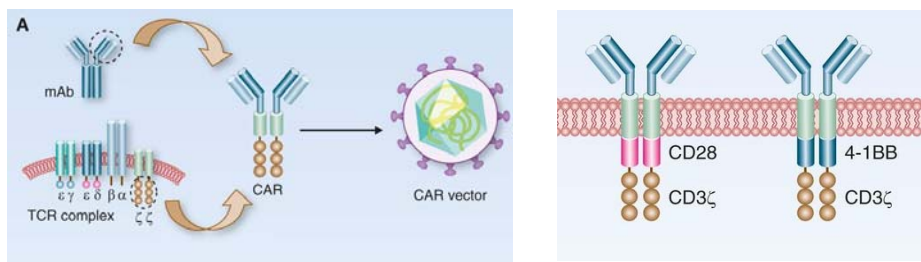


Figure 2. – Conception des récepteurs chimériques d'antigènes

Image reproduite avec la permission de l'American Association of Cancer Research (Cancer Discovery, Vol. 6, Aurore Morello *et al*, "Mesothelin-Targeted CARs: Driving T cells to solid tumors", p.133-146, © 2016) [468]

Lors d'une immunothérapie par cellules T CAR, les lymphocytes T issus des patients sont transduits *ex vivo* avec le récepteur CAR. Les lymphocytes T transduits s'expandent et sont réinfusés dans le même patient. Les avantages de l'immunothérapie par CAR sont la spécificité du ScFv pour un peptide tumoral et la diminution de la toxicité par la réinfusion de lymphocytes T autologues au patient. L'immunothérapie par les CARs a démontré une efficacité en clinique contre l'antigène tumoral CD19 spécifique à certains cancers hématologiques. Toutefois, une activation trop robuste des CARs génère une sécrétion systémique de cytokines à des niveaux toxiques pour les patients. De plus, la toxicité peut être générée par l'expression de l'antigène du scFv dans les tissus sains. En contraste, certaines tumeurs expriment une densité d'antigènes trop faible pour l'activation efficace des CARs. De plus, l'efficacité des CARs contre les tumeurs solides est faible. Les tumeurs solides sont un environnement hostile pour les cellules T, par la présence de cellules immunitaires et cytokines inhibitrices, la diminution des nutriments ainsi qu'un cœur hypoxique [467]. Ainsi, il est essentiel de moduler la réponse des cellules T CARs afin d'augmenter leur activation et leur persistance dans un contexte de tumeurs solides.

Il a été démontré que l'augmentation du nombre d'ITAMs dans le domaine cytoplasmique d'un CAR, en passant de trois à six ITAMs, augmente la proportion de cellules T CAR qui s'activent. Ceci indique que l'augmentation des ITAMs facilite le passage du seuil d'activation des cellules T. Un nombre élevé d'ITAMs sensibilise le CAR à une faible concentration d'antigènes présentés par la cellule tumorale. En contraste, la diminution du nombre d'ITAMs à deux augmente la sélectivité des cellules T CAR pour des cellules tumorales exprimant une quantité élevée d'antigènes [409]. Ainsi, le niveau d'activation du CAR par la modulation du nombre d'ITAMs génère une réponse plus ou moins forte par la cellule T.

Nos résultats démontrent que TMEM16F facilite le passage du seuil d'activation des cellules T par l'activation de TCRs non-engagés à la synapse immunologique. Étant donné que les

cellules T CARs expriment toujours le TCR endogène, il est possible que la stimulation du CAR permette l'amplification de l'activation par les TCRs endogènes non-engagés. La modulation de l'expression de TMEM16F pourrait permettre d'améliorer la réponse des CARs contre les antigènes tumoraux. L'expression du TMEM16F mutant pourrait augmenter la réponse des CARs dans un contexte où l'antigène tumoral est limité, comme il a été démontré pour l'augmentation du nombre d'ITAMs. En contraste, la diminution de l'expression de TMEM16F pourrait permettre l'activation de CARs seulement lorsque la quantité d'antigène est élevée, permettant de diminuer la cytotoxicité potentielle des CARs. Enfin, il a été démontré que la molécule A01 est un inhibiteur faible (concentration inhibitrice médiane de 100µM) de la fonction de canal ionique et de scramblase de TMEM16F [294, 469]. Cette molécule inhibe également le canal ionique de TMEM16A, mais dont le niveau d'expression et la fonction chez les lymphocytes T matures restent inconnus [470, 471]. De plus, une molécule récemment brevetée est à l'étude pour l'activation de TMEM16F [368].

Il serait intéressant d'étudier ces molécules sur l'activité de TMEM16F et sur l'amplification de l'activation des cellules T dans un contexte CAR. Étant donné que les antigènes tumoraux sont présents en faible quantité, l'activation et la réponse cytotoxique des cellules T CARs sera étudiée avec des cellules cibles exprimant différentes concentrations d'antigènes dans un contexte de modulation de l'expression de TMEM16F (shTMEM16F, ou surexpression du TMEM16F sauvage ou mutant) ainsi que dans la modulation de son activité par des molécules. Enfin, le contrôle tumoral des CARs prétraités avec les différentes molécules activant ou inhibant TMEM16F pourrait être étudié dans un modèle de tumeur in vivo.

Nos résultats sur la dissociation membranaire de CD3ε par la redistribution de PS par TMEM16F indiquent que les autres récepteurs immuns possédant des domaines BRS pourraient être régulés d'une manière semblable. Le mécanisme d'activation des CARs n'a pas encore été élucidé. Les chaînes cytoplasmiques de CD3ζ, CD28 et 4-1BB sont dotées de BRS, mais il n'est pas connu si le domaine cytoplasmique du CAR est associé à la MP par interactions électrostatiques. Avec l'approche FRET-FLIM que nous avons développée, nous pourrions déterminer le niveau d'association membranaire du CAR chez les lymphocytes T au repos. De plus, comme les TCRs, les récepteurs CARs forment une synapse immunologique et s'accumulent au cSMAC lorsqu'ils

interagissent avec une cellule cible [395, 472]. La dissociation membranaire du CAR suivant la stimulation avec une cellule tumorale exprimant l'antigène spécifique au scFv du CAR pourrait être étudiée par notre approche FRET-FLIM. La redistribution de PS par TMEM16F lors de l'activation du CAR pourrait augmenter la quantité de chaînes cytoplasmiques de CARs ou de TCRs endogènes dissociées à la synapse immunologique. Ainsi, la dissociation massive de chaînes cytoplasmiques par TMEM16F augmenterait l'activation de la cellule T CAR.

4.8.2 Réhabilitation des lymphocytes T épuisés

Le récepteur inhibiteur PD-1 est exprimé à la surface des lymphocytes T suivant leur activation [169]. PD-1 recrute la phosphatase SHP-2, qui déphosphoryle plusieurs molécules de signalisation des cellules T [171, 172]. L'expression soutenue de PD-1 est associée à l'épuisement et la dysfonction des lymphocytes T lors d'une infection virale chronique ou dans le cancer [57]. Les lymphocytes T CD8⁺ de souris *Tmem16f*^{-/-} infectées au LCMV clone 13 démontrent une élévation de PD-1 en comparaison avec les souris contrôles [368]. Il a été démontré que l'expression de surface de PD-1 est régulée par TMEM16F. Une augmentation robuste du calcium intracellulaire par stimulation avec l'ionomycine mène à l'excrétion de PD-1 sur des microvésicules [388]. En contraste, en absence d'expression de TMEM16F, la stimulation à l'ionomycine induit l'internalisation massive de PD-1 [388]. Toutefois, le rôle de TMEM16F dans l'excrétion de PD-1 lors de la réponse immunitaire physiologique des lymphocytes T contre une infection virale aiguë ou chronique n'a pas été démontré. En effet, il a été démontré que plusieurs protéines membranaires sont excrétées dans les vésicules de manière TMEM16F-dépendante, comme les co-récepteurs CD4 ou CD8 ainsi que la phosphatase CD45 [374]. Ainsi, l'excrétion de PD-1 par vésicules pourrait être non-spécifique et être un mécanisme de régulation plus général d'expression de protéines par TMEM16F. Ainsi, notre modèle de transduction de lymphocytes T périphériques murins avec un ARN interférant contre *Tmem16f* sera utilisé afin d'élucider le rôle de TMEM16F dans l'expression de PD-1 et dans l'épuisement des lymphocytes T lors d'une infection virale chronique.

L'immunothérapie par l'inhibition de PD-1 et/ou CTLA-4 à la surface des lymphocytes T a démontré une efficacité clinique contre le mélanome [473]. Comme décrit au sous-chapitre

précédent pour les cellules T CARs, la modulation de l'activation des lymphocytes T épuisés par traitement anti-PD-1 en combinaison avec une molécule agoniste de TMEM16F pourrait permettre de réactiver les cellules T dans le cancer. Ainsi, la modulation de l'activité de TMEM16F sur la revitalisation des lymphocytes T épuisés sera étudiée dans un modèle d'infection virale chronique et un modèle de mélanome.

Chapitre 5 - Conclusion

L'activation du TCR et des cellules T est un processus complexe et régulé. Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'éclaircir le rôle de la redistribution de la PS dans l'association électrostatique de la chaîne CD3 ϵ à la MP ainsi que dans l'amplification de l'activation des cellules T. Nous avons démontré que la redistribution de PS calcium-dépendante par la scramblase TMEM16F entraîne la dissociation membranaire de CD3 ϵ de la MP. Cette étude est la première à avoir directement démontré que la diminution de PS au feuillet interne de la MP régule la dissociation membranaire de la chaîne CD3 ϵ du TCR. De plus, nous avons démontré que TMEM16F régule l'activation de TCRs non-engagés par la dissociation massive des chaînes CD3 ϵ à la synapse immunologique, un mécanisme essentiel pour l'amplification de l'activation des cellules T. En plus de réguler la dissociation membranaire de TCRs, la redistribution de PS est proposé de réguler plusieurs processus de l'activation des lymphocytes T comme la protection contre la sécrétion de perforine et l'expression de protéines en surface. Enfin, nous avons confirmé l'importance de TMEM16F dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T dans un modèle de cellules T primaires murines. Ainsi, nous avons démontré que la modulation de l'activité de TMEM16F varie les niveaux de PS à la MP afin de diminuer ou augmenter l'activation des cellules T.

Nos résultats démontrent que les récepteurs immuns dotés de domaines BRS dans leurs chaînes cytoplasmiques pourraient également être régulés par la redistribution de PS TMEM16F-dépendante. De plus, TMEM16F pourrait réguler l'efficacité de l'activation des cellules T dans l'immunothérapie par les récepteurs chimériques d'antigènes, qui sont dotés de domaines BRS dans leurs domaines cytoplasmiques. Enfin, l'étude de la réponse immunitaire effectrice dans des cellules T dont l'expression de TMEM16F est modulée nous permettra de mieux comprendre leur phénotype de différenciation et leur fonctionnalité afin de prédire leur persistance lors d'une immunothérapie contre le cancer. Ainsi, notre étude ouvre des possibilités quant à la modulation de la PS par TMEM16F afin d'améliorer l'activation des cellules T dans les immunothérapies contre le cancer.

Références bibliographiques

1. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
2. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
3. Dalod, M., et al., *Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming*. EMBO J, 2014. **33**(10): p. 1104-16.
4. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 823-36.
5. Roth, D.B., *V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity*. Microbiol Spectr, 2014. **2**(6).
6. Cullen, S.P. and S.J. Martin, *Mechanisms of granule-dependent killing*. Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 251-62.
7. Gaud, G., R. Lesourne, and P.E. Love, *Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(8): p. 485-497.
8. Luoma, A.M., et al., *Crystal structure of Vdelta1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human gammadelta T cells*. Immunity, 2013. **39**(6): p. 1032-42.
9. Zimmer, M.I., et al., *Polymorphisms in CD1d affect antigen presentation and the activation of CD1d-restricted T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1909-14.
10. Xu, X., H. Li, and C. Xu, *Structural understanding of T cell receptor triggering*. Cell Mol Immunol, 2020. **17**(3): p. 193-202.
11. Reth, M., *Antigen receptor tail clue*. Nature, 1989. **338**(6214): p. 383-4.
12. Wange, R.L., et al., *Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor zeta and CD3 epsilon from activated Jurkat T cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19797-801.
13. Market, E. and F.N. Papavasiliou, *V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system*. PLoS Biol, 2003. **1**(1): p. E16.
14. Oettinger, M.A., et al., *RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1517-23.
15. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
16. Shinkai, Y., et al., *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. Cell, 1992. **68**(5): p. 855-67.
17. Zarnitsyna, V.I., et al., *Estimating the diversity, completeness, and cross-reactivity of the T cell repertoire*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 485.
18. Dong, et al., *Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex*. Nature, 2019. **573**(7775): p. 546-552.
19. Sun, Z.J., et al., *Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer*. Cell, 2001. **105**(7): p. 913-23.

20. Call, M.E., et al., *The structure of the zeta/zeta transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor*. Cell, 2006. **127**(2): p. 355-68.
21. Call, M.E., et al., *The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex*. Cell, 2002. **111**(7): p. 967-79.
22. Call, M.E., J. Pyrdol, and K.W. Wucherpfennig, *Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum*. EMBO J, 2004. **23**(12): p. 2348-57.
23. Call, M.E. and K.W. Wucherpfennig, *Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex*. Mol Immunol, 2004. **40**(18): p. 1295-305.
24. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
25. Brady, B.L., N.C. Steinle, and C.H. Bassing, *Antigen receptor allelic exclusion: an update and reappraisal*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 3801-8.
26. Niederberger, N., et al., *Allelic exclusion of the TCR alpha-chain is an active process requiring TCR-mediated signaling and c-Cbl*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4557-63.
27. Xiong, N. and D.H. Raulet, *Development and selection of gammadelta T cells*. Immunol Rev, 2007. **215**: p. 15-31.
28. Adams, J.J., et al., *Structural interplay between germline interactions and adaptive recognition determines the bandwidth of TCR-peptide-MHC cross-reactivity*. Nat Immunol, 2016. **17**(1): p. 87-94.
29. McDonald, B.D., et al., *Crossreactive alphabeta T Cell Receptors Are the Predominant Targets of Thymocyte Negative Selection*. Immunity, 2015. **43**(5): p. 859-69.
30. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
31. Xing, Y. and K.A. Hogquist, *T-cell tolerance: central and peripheral*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(6).
32. Dzhagalov, I.L., et al., *Elimination of self-reactive T cells in the thymus: a timeline for negative selection*. PLoS Biol, 2013. **11**(5): p. e1001566.
33. Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein*. Science, 2002. **298**(5597): p. 1395-401.
34. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 531-64.
35. Klein, L., et al., *Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 833-44.
36. Tanchot, C., et al., *Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2057-62.
37. Brocker, T., *Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1223-32.
38. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 426-32.
39. Berard, M., et al., *IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5018-26.

40. Yu, W., et al., *Clonal Deletion Prunes but Does Not Eliminate Self-Specific alphabeta CD8(+) T Lymphocytes*. *Immunity*, 2015. **42**(5): p. 929-41.
41. Nolz, J.C., *Molecular mechanisms of CD8(+) T cell trafficking and localization*. *Cell Mol Life Sci*, 2015. **72**(13): p. 2461-73.
42. Rosen, S.D., *Endothelial ligands for L-selectin: from lymphocyte recirculation to allograft rejection*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(4): p. 1013-20.
43. Warnock, R.A., et al., *Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes*. *J Exp Med*, 1998. **187**(2): p. 205-16.
44. Gunn, M.D., et al., *A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(1): p. 258-63.
45. Yoshida, R., et al., *Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(12): p. 7118-22.
46. Yoshida, R., et al., *EBI1-ligand chemokine (ELC) attracts a broad spectrum of lymphocytes: activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC*. *Int Immunol*, 1998. **10**(7): p. 901-10.
47. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1*. *Nature*, 2004. **427**(6972): p. 355-60.
48. Yatomi, Y., et al., *Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum*. *J Biochem*, 1997. **121**(5): p. 969-73.
49. Norment, A.M., et al., *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*. *Nature*, 1988. **336**(6194): p. 79-81.
50. Doyle, C. and J.L. Strominger, *Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion*. *Nature*, 1987. **330**(6145): p. 256-9.
51. Kovacsovics-Bankowski, M. and K.L. Rock, *A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules*. *Science*, 1995. **267**(5195): p. 243-6.
52. Houde, M., et al., *Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 402-6.
53. Guermonprez, P., et al., *ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 397-402.
54. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *T cell activation*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 591-619.
55. Borg, N.A., et al., *The CDR3 regions of an immunodominant T cell receptor dictate the 'energetic landscape' of peptide-MHC recognition*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(2): p. 171-80.
56. Rudd, C.E., et al., *The Cd4 Receptor Is Complexed in Detergent Lysates to a Protein-Tyrosine Kinase (Pp58) from Human Lymphocytes-T*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988. **85**(14): p. 5190-5194.
57. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. *Nature*, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
58. Abraham, N. and A. Veillette, *Activation of p56lck through mutation of a regulatory carboxy-terminal tyrosine residue requires intact sites of autophosphorylation and myristylation*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(10): p. 5197-206.

59. Paige, L.A., et al., *Reversible palmitoylation of the protein-tyrosine kinase p56lck*. J Biol Chem, 1993. **268**(12): p. 8669-74.
60. Nika, K., et al., *Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction*. Immunity, 2010. **32**(6): p. 766-77.
61. Artyomov, M.N., et al., *CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(39): p. 16916-21.
62. Choudhuri, K., et al., *T-cell receptor triggering is critically dependent on the dimensions of its peptide-MHC ligand*. Nature, 2005. **436**(7050): p. 578-82.
63. Cordoba, S.P., et al., *The large ectodomains of CD45 and CD148 regulate their segregation from and inhibition of ligated T-cell receptor*. Blood, 2013. **121**(21): p. 4295-302.
64. Hui, E. and R.D. Vale, *In vitro membrane reconstitution of the T-cell receptor proximal signaling network*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(2): p. 133-42.
65. Gascoigne, N.R., *Do T cells need endogenous peptides for activation?* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(11): p. 895-900.
66. Chan, A.C., et al., *Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function*. EMBO J, 1995. **14**(11): p. 2499-508.
67. Williams, B.L., et al., *Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1388-99.
68. Zhang, W., et al., *LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation*. Cell, 1998. **92**(1): p. 83-92.
69. Buday, L., et al., *A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(12): p. 9019-23.
70. Sieh, M., et al., *GRB2 and phospholipase C-gamma 1 associate with a 36- to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T-cell receptor stimulation*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(7): p. 4435-42.
71. Liu, S.K., et al., *The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors*. Curr Biol, 1999. **9**(2): p. 67-75.
72. Yablonski, D., *Bridging the Gap: Modulatory Roles of the Grb2-Family Adaptor, Gads, in Cellular and Allergic Immune Responses*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1704.
73. Bubeck Wardenburg, J., et al., *Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 19641-4.
74. Dobbins, J., et al., *Binding of the cytoplasmic domain of CD28 to the plasma membrane inhibits Lck recruitment and signaling*. Sci Signal, 2016. **9**(438): p. ra75.
75. Prasad, K.V., et al., *T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2834-8.
76. Fukazawa, T., et al., *T cell activation-dependent association between the p85 subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase and Grb2/phospholipase C-gamma 1-binding phosphotyrosyl protein pp36/38*. J Biol Chem, 1995. **270**(34): p. 20177-82.

77. August, A., et al., *Src-induced activation of inducible T cell kinase (ITK) requires phosphatidylinositol 3-kinase activity and the Pleckstrin homology domain of inducible T cell kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11227-32.
78. Heyeck, S.D., et al., *Lck phosphorylates the activation loop tyrosine of the Itk kinase domain and activates Itk kinase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25401-8.
79. Bogin, Y., et al., *SLP-76 mediates and maintains activation of the Tec family kinase ITK via the T cell antigen receptor-induced association between SLP-76 and ITK*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6638-43.
80. Cao, L., et al., *Quantitative phosphoproteomics reveals SLP-76 dependent regulation of PAG and Src family kinases in T cells*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46725.
81. Sela, M., et al., *Sequential phosphorylation of SLP-76 at tyrosine 173 is required for activation of T and mast cells*. EMBO J, 2011. **30**(15): p. 3160-72.
82. Devkota, S., et al., *Scaffold Protein SLP-76 Primes PLCgamma1 for Activation by ITK-Mediated Phosphorylation*. J Mol Biol, 2015. **427**(17): p. 2734-47.
83. Liu, K.Q., et al., *T cell receptor-initiated calcium release is uncoupled from capacitative calcium entry in Itk-deficient T cells*. J Exp Med, 1998. **187**(10): p. 1721-7.
84. Trebak, M. and J.P. Kinet, *Calcium signalling in T cells*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(3): p. 154-169.
85. Campi, G., R. Varma, and M.L. Dustin, *Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1031-6.
86. 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, 2005. **6**(12): p. 1253-62.
87. Yokosuka, T., et al., *Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 589-601.
88. Varma, R., et al., *T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster*. Immunity, 2006. **25**(1): p. 117-27.
89. Sherman, E., et al., *Functional nanoscale organization of signaling molecules downstream of the T cell antigen receptor*. Immunity, 2011. **35**(5): p. 705-20.
90. Filipp, D., O. Ballek, and J. Manning, *Lck, Membrane Microdomains, and TCR Triggering Machinery: Defining the New Rules of Engagement*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 155.
91. Harayama, T. and H. Riezman, *Understanding the diversity of membrane lipid composition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(5): p. 281-296.
92. Munro, S., *Lipid rafts: elusive or illusive?* Cell, 2003. **115**(4): p. 377-88.
93. Hashimoto-Tane, A., et al., *T-cell receptor microclusters critical for T-cell activation are formed independently of lipid raft clustering*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(14): p. 3421-9.
94. Dinic, J., et al., *The T cell receptor resides in ordered plasma membrane nanodomains that aggregate upon patching of the receptor*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 10082.
95. Gaus, K., et al., *Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation*. J Cell Biol, 2005. **171**(1): p. 121-31.
96. Gaus, K., T. Zech, and T. Harder, *Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy*. Mol Membr Biol, 2006. **23**(1): p. 41-8.
97. Lillemeier, B.F., et al., *TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 90-6.

98. Griffie, J., et al., *3D Bayesian cluster analysis of super-resolution data reveals LAT recruitment to the T cell synapse*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4077.
99. Williamson, D.J., et al., *Pre-existing clusters of the adaptor Lat do not participate in early T cell signaling events*. Nat Immunol, 2011. **12**(7): p. 655-62.
100. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
101. Krummel, M.F., et al., *Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition*. Science, 2000. **289**(5483): p. 1349-52.
102. Cemerski, S., et al., *The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 414-22.
103. Grakoui, A., et al., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. Science, 1999. **285**(5425): p. 221-7.
104. Huppa, J.B., et al., *Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential*. Nat Immunol, 2003. **4**(8): p. 749-55.
105. Lee, K.H., et al., *T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation*. Science, 2002. **295**(5559): p. 1539-42.
106. Johnson, K.G., et al., *A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10138-43.
107. Irvine, D.J., et al., *Direct observation of ligand recognition by T cells*. Nature, 2002. **419**(6909): p. 845-9.
108. Viola, A. and A. Lanzavecchia, *T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds*. Science, 1996. **273**(5271): p. 104-6.
109. Harding, C.V. and E.R. Unanue, *Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation*. Nature, 1990. **346**(6284): p. 574-6.
110. Demotz, S., H.M. Grey, and A. Sette, *The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation*. Science, 1990. **249**(4972): p. 1028-30.
111. Valitutti, S., et al., *Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 148-51.
112. Matsui, K., et al., *Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors*. Science, 1991. **254**(5039): p. 1788-91.
113. Matsui, K., et al., *Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12862-6.
114. Corr, M., et al., *T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity*. Science, 1994. **265**(5174): p. 946-9.
115. Sykulev, Y., et al., *Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes*. Immunity, 1994. **1**(1): p. 15-22.
116. Zhong, S., et al., *T-cell receptor affinity and avidity defines antitumor response and autoimmunity in T-cell immunotherapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(17): p. 6973-8.
117. Cemerski, S., et al., *The stimulatory potency of T cell antigens is influenced by the formation of the immunological synapse*. Immunity, 2007. **26**(3): p. 345-55.

118. Lee, K.H., et al., *The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation*. Science, 2003. **302**(5648): p. 1218-22.
119. Valitutti, S., *Immunological synapse: center of attention again*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 384-6.
120. Mignery, G.A., et al., *Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor*. Nature, 1989. **342**(6246): p. 192-5.
121. Wolf, I.M., et al., *Frontrunners of T cell activation: Initial, localized Ca²⁺ signals mediated by NAADP and the type 1 ryanodine receptor*. Sci Signal, 2015. **8**(398): p. ra102.
122. Diercks, B.P., et al., *ORAI1, STIM1/2, and RYR1 shape subsecond Ca²⁺ microdomains upon T cell activation*. Sci Signal, 2018. **11**(561).
123. Guse, A.H., et al., *Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose*. Nature, 1999. **398**(6722): p. 70-3.
124. Schwarzmann, N., et al., *Knock-down of the type 3 ryanodine receptor impairs sustained Ca²⁺ signaling via the T cell receptor/CD3 complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50636-42.
125. Zhang, S.L., et al., *STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane*. Nature, 2005. **437**(7060): p. 902-5.
126. Liou, J., et al., *STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx*. Curr Biol, 2005. **15**(13): p. 1235-41.
127. Wu, M.M., et al., *Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane*. J Cell Biol, 2006. **174**(6): p. 803-13.
128. Luik, R.M., et al., *The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions*. J Cell Biol, 2006. **174**(6): p. 815-25.
129. Prakriya, M., et al., *Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 230-233.
130. Yeromin, A.V., et al., *Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 226-229.
131. Luik, R.M., et al., *Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 538-42.
132. Park, C.Y., et al., *STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1*. Cell, 2009. **136**(5): p. 876-90.
133. Yuan, J.P., et al., *SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(3): p. 337-43.
134. Navarro-Borelly, L., et al., *STIM1-Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy*. J Physiol, 2008. **586**(22): p. 5383-401.
135. Cai, X., et al., *The Orai1 Store-operated Calcium Channel Functions as a Hexamer*. J Biol Chem, 2016. **291**(50): p. 25764-25775.
136. Yen, M., L.A. Lokteva, and R.S. Lewis, *Functional Analysis of Orai1 Concatemers Supports a Hexameric Stoichiometry for the CRAC Channel*. Biophys J, 2016. **111**(9): p. 1897-1907.
137. Lioudyno, M.I., et al., *Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2011-6.
138. Negulescu, P.A., et al., *Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen*. Immunity, 1996. **4**(5): p. 421-30.

139. Elliott, J.I., et al., *Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 808-16.
140. Feske, S., et al., *A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 179-85.
141. Feske, S., et al., *Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 316-24.
142. Evenas, J., et al., *Ca²⁺ binding and conformational changes in a calmodulin domain*. Biochemistry, 1998. **37**(39): p. 13744-54.
143. Shen, X., et al., *The secondary structure of calcineurin regulatory region and conformational change induced by calcium/calmodulin binding*. J Biol Chem, 2008. **283**(17): p. 11407-13.
144. Loh, C., et al., *Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10884-91.
145. Okamura, H., et al., *Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 539-50.
146. Shaw, K.T., et al., *Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 11205-9.
147. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan, *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 707-47.
148. Loh, C., et al., *T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(7): p. 3945-54.
149. Kong, K.F., et al., *A motif in the V3 domain of the kinase PKC-theta determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28*. Nat Immunol, 2011. **12**(11): p. 1105-12.
150. Gao, X. and T.K. Harris, *Role of the PH domain in regulating in vitro autophosphorylation events required for reconstitution of PDK1 catalytic activity*. Bioorg Chem, 2006. **34**(4): p. 200-23.
151. Liu, Y., et al., *Phosphorylation of the protein kinase C-theta activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation is critical to in vivo nuclear-factor-kappaB induction*. Biochem J, 2002. **361**(Pt 2): p. 255-65.
152. Sommer, K., et al., *Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation*. Immunity, 2005. **23**(6): p. 561-74.
153. Sun, L., et al., *The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes*. Mol Cell, 2004. **14**(3): p. 289-301.
154. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
155. Paul, S. and B.C. Schaefer, *A new look at TCR signaling to NF-kB*. Trends Immunol, 2013. **34**(6): p. 269-281.
156. Rubio, I., et al., *TCR-induced activation of Ras proceeds at the plasma membrane and requires palmitoylation of N-Ras*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3536-43.

157. Ebinu, J.O., et al., *RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras*. *Blood*, 2000. **95**(10): p. 3199-203.
158. Rincon, M., R.A. Flavell, and R.J. Davis, *Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes*. *Oncogene*, 2001. **20**(19): p. 2490-7.
159. Rincon, M. and G. Pedraza-Alva, *JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells*. *Immunol Rev*, 2003. **192**: p. 131-42.
160. Liu, H., et al., *On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation*. *Immunity*, 2000. **13**(5): p. 665-75.
161. San Jose, E., et al., *Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism*. *Immunity*, 2000. **12**(2): p. 161-70.
162. Monjas, A., A. Alcover, and B. Alarcon, *Engaged and bystander T cell receptors are downmodulated by different endocytotic pathways*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(53): p. 55376-84.
163. Yudushkin, I.A. and R.D. Vale, *Imaging T-cell receptor activation reveals accumulation of tyrosine-phosphorylated CD3zeta in the endosomal compartment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(51): p. 22128-33.
164. Das, V., et al., *Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes*. *Immunity*, 2004. **20**(5): p. 577-88.
165. Compeer, E.B., et al., *A mobile endocytic network connects clathrin-independent receptor endocytosis to recycling and promotes T cell activation*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 1597.
166. Fernandez-Arenas, E., et al., *beta-Arrestin-1 mediates the TCR-triggered re-routing of distal receptors to the immunological synapse by a PKC-mediated mechanism*. *EMBO J*, 2014. **33**(6): p. 559-77.
167. Cai, Z., et al., *Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naive CD8+ T cells*. *J Exp Med*, 1997. **185**(4): p. 641-51.
168. Utzny, C., et al., *Analysis of peptide/MHC-induced TCR downregulation: deciphering the triggering kinetics*. *Cell Biochem Biophys*, 2006. **46**(2): p. 101-11.
169. Ahn, E., et al., *Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(18): p. 4749-4754.
170. Buchbinder, E.I. and A. Desai, *CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition*. *Am J Clin Oncol*, 2016. **39**(1): p. 98-106.
171. Marasco, M., et al., *Molecular mechanism of SHP2 activation by PD-1 stimulation*. *Sci Adv*, 2020. **6**(5): p. eaay4458.
172. Yokosuka, T., et al., *Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2*. *J Exp Med*, 2012. **209**(6): p. 1201-17.
173. Chauveau, A., et al., *Diacylglycerol kinase alpha establishes T cell polarity by shaping diacylglycerol accumulation at the immunological synapse*. *Sci Signal*, 2014. **7**(340): p. ra82.
174. Merino, E., et al., *Role of the diacylglycerol kinase alpha-conserved domains in membrane targeting in intact T cells*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(48): p. 35396-404.
175. Schenkel, L.C. and M. Bakovic, *Formation and regulation of mitochondrial membranes*. *Int J Cell Biol*, 2014. **2014**: p. 709828.

176. Olenchock, B.A., et al., *Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1174-81.
177. Almena, M., et al., *Diacylglycerol metabolism attenuates T-cell receptor signaling and alters thymocyte differentiation*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e912.
178. Sanjuan, M.A., et al., *T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 2877-83.
179. Waldmann, T.A., *The multi-subunit interleukin-2 receptor*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 875-911.
180. Spolski, R., D. Gromer, and W.J. Leonard, *The gamma c family of cytokines: fine-tuning signals from IL-2 and IL-21 in the regulation of the immune response*. F1000Res, 2017. **6**: p. 1872.
181. Lawrence, C.W. and T.J. Braciale, *Activation, differentiation, and migration of naive virus-specific CD8+ T cells during pulmonary influenza virus infection*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1209-18.
182. Marchingo, J.M., et al., *T cell signaling. Antigen affinity, costimulation, and cytokine inputs sum linearly to amplify T cell expansion*. Science, 2014. **346**(6213): p. 1123-7.
183. Blattman, J.N., et al., *Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 657-64.
184. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
185. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
186. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
187. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
188. Calzascia, T., et al., *TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3833-45.
189. Junttila, I.S., *Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 888.
190. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. **89**(4): p. 587-96.
191. Ouyang, W., et al., *Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism*. Immunity, 1998. **9**(5): p. 745-55.
192. Tesmer, L.A., et al., *Th17 cells in human disease*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 87-113.
193. Zou, W. and N.P. Restifo, *T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(4): p. 248-56.
194. 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, 2003. **4**(12): p. 1191-8.
195. Sarkar, S., et al., *Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates*. J Exp Med, 2008. **205**(3): p. 625-40.

196. 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*, 2007. **27**(2): p. 281-95.
197. Kalia, V., et al., *Prolonged interleukin-2/Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo*. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 91-103.
198. King, C.G., et al., *T cell affinity regulates asymmetric division, effector cell differentiation, and tissue pathology*. *Immunity*, 2012. **37**(4): p. 709-20.
199. Nayar, R., et al., *Graded levels of IRF4 regulate CD8+ T cell differentiation and expansion, but not attrition, in response to acute virus infection*. *J Immunol*, 2014. **192**(12): p. 5881-93.
200. Amsen, D., R.A. Backer, and C. Helbig, *Decisions on the road to memory*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **785**: p. 107-20.
201. Boulet, S., J.F. Daudelin, and N. Labrecque, *IL-2 induction of Blimp-1 is a key in vivo signal for CD8+ short-lived effector T cell differentiation*. *J Immunol*, 2014. **193**(4): p. 1847-54.
202. Ji, Y., et al., *Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8+ T cells*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(12): p. 1230-7.
203. Yang, C.Y., et al., *The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(12): p. 1221-9.
204. Liu, Z., et al., *Cutting Edge: Transcription Factor BCL6 Is Required for the Generation, but Not Maintenance, of Memory CD8(+) T Cells in Acute Viral Infection*. *J Immunol*, 2019. **203**(2): p. 323-327.
205. Chang, J.T., et al., *Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses*. *Science*, 2007. **315**(5819): p. 1687-91.
206. Gerlach, C., et al., *One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation*. *J Exp Med*, 2010. **207**(6): p. 1235-46.
207. Plumlee, C.R., et al., *Early Effector CD8 T Cells Display Plasticity in Populating the Short-Lived Effector and Memory-Precursor Pools Following Bacterial or Viral Infection*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 12264.
208. Obar, J.J., et al., *Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation*. *J Immunol*, 2011. **187**(10): p. 4967-78.
209. Herndler-Brandstetter, D., et al., *KLRG1(+) Effector CD8(+) T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity*. *Immunity*, 2018. **48**(4): p. 716-729 e8.
210. Shioh, L.R., et al., *CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs*. *Nature*, 2006. **440**(7083): p. 540-4.
211. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. *Nature*, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
212. Bromley, S.K., T.R. Mempel, and A.D. Luster, *Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(9): p. 970-80.
213. DeGrendele, H.C., P. Estess, and M.H. Siegelman, *Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site*. *Science*, 1997. **278**(5338): p. 672-5.
214. Mohamadzadeh, M., et al., *Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(1): p. 97-108.

215. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. Adv Immunol, 2007. **96**: p. 41-101.
216. Sykulev, Y., et al., *Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response*. Immunity, 1996. **4**(6): p. 565-71.
217. Podack, E.R., J.D. Young, and Z.A. Cohn, *Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(24): p. 8629-33.
218. Rouvier, E., M.F. Luciani, and P. Golstein, *Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity*. J Exp Med, 1993. **177**(1): p. 195-200.
219. Hanabuchi, S., et al., *Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4930-4.
220. Garrod, K.R., et al., *Dissecting T cell contraction in vivo using a genetically encoded reporter of apoptosis*. Cell Rep, 2012. **2**(5): p. 1438-47.
221. Krammer, P.H., R. Arnold, and I.N. Lavrik, *Life and death in peripheral T cells*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 532-42.
222. Brenner, D., P.H. Krammer, and R. Arnold, *Concepts of activated T cell death*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. **66**(1): p. 52-64.
223. Wherry, E.J. and M. Kurachi, *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(8): p. 486-99.
224. Hoffman, W., F.G. Lakkis, and G. Chalasani, *B Cells, Antibodies, and More*. Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(1): p. 137-54.
225. Ku, C.C., et al., *Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines*. Science, 2000. **288**(5466): p. 675-8.
226. Gerlach, C., et al., *The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis*. Immunity, 2016. **45**(6): p. 1270-1284.
227. Conroy, M.J., et al., *Identifying a Novel Role for Fractalkine (CX3CL1) in Memory CD8(+) T Cell Accumulation in the Omentum of Obesity-Associated Cancer Patients*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1867.
228. Gebhardt, T., et al., *Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus*. Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 524-30.
229. Higgins, J.M., et al., *Direct and regulated interaction of integrin alphaEbeta7 with E-cadherin*. J Cell Biol, 1998. **140**(1): p. 197-210.
230. Xu, C.Q., et al., *Regulation of T Cell Receptor Activation by Dynamic Membrane Binding of the CD3 epsilon Cytoplasmic Tyrosine-Based Motif*. Cell, 2008. **135**(4): p. 702-713.
231. Courtney, A.H., et al., *CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells*. Sci Signal, 2019. **12**(604).
232. Roh, K.H., et al., *The coreceptor CD4 is expressed in distinct nanoclusters and does not colocalize with T-cell receptor and active protein tyrosine kinase p56lck*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(13): p. E1604-13.
233. Li, J., et al., *A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **10**(2): p. 81-98.
234. Resh, M.D., *Covalent lipid modifications of proteins*. Curr Biol, 2013. **23**(10): p. R431-5.

235. Heo, W.D., et al., *PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1458-61.
236. Yeung, T., et al., *Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis*. Science, 2006. **313**(5785): p. 347-51.
237. Yeung, T., et al., *Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization*. Science, 2008. **319**(5860): p. 210-3.
238. Verkleij, A.J., et al., *The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy*. Biochim Biophys Acta, 1973. **323**(2): p. 178-93.
239. Fridriksson, E.K., et al., *Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry*. Biochemistry, 1999. **38**(25): p. 8056-63.
240. Fairn, G.D., et al., *High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine*. J Cell Biol, 2011. **194**(2): p. 257-75.
241. Seigneuret, M. and P.F. Devaux, *ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(12): p. 3751-5.
242. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 112-24.
243. Bevers, E.M. and P.L. Williamson, *Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane*. Physiol Rev, 2016. **96**(2): p. 605-45.
244. Vance, J.E., *Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria*. J Biol Chem, 1990. **265**(13): p. 7248-56.
245. Stone, S.J. and J.E. Vance, *Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34534-40.
246. Kuge, O., M. Nishijima, and Y. Akamatsu, *A Chinese hamster cDNA encoding a protein essential for phosphatidylserine synthase I activity*. J Biol Chem, 1991. **266**(35): p. 24184-9.
247. Saito, K., M. Nishijima, and O. Kuge, *Genetic evidence that phosphatidylserine synthase II catalyzes the conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylserine in Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 17199-205.
248. Kuge, O., K. Saito, and M. Nishijima, *Cloning of a Chinese hamster ovary (CHO) cDNA encoding phosphatidylserine synthase (PSS) II, overexpression of which suppresses the phosphatidylserine biosynthetic defect of a PSS I-lacking mutant of CHO-K1 cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19133-9.
249. Vance, J.E. and R. Steenbergen, *Metabolism and functions of phosphatidylserine*. Prog Lipid Res, 2005. **44**(4): p. 207-34.
250. Chung, J., et al., *INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts*. Science, 2015. **349**(6246): p. 428-32.
251. Borkenhagen, L.F., K. E.P., and L. Fielding, *Enzymatic Formation and Decarboxylation of Phosphatidylserine*. Journal of Biological Chemistry, 1961. **236**(6).

252. Pomorski, T., et al., *Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(3): p. 1240-54.
253. Darland-Ransom, M., et al., *Role of C. elegans TAT-1 protein in maintaining plasma membrane phosphatidylserine asymmetry*. Science, 2008. **320**(5875): p. 528-31.
254. Segawa, K., S. Kurata, and S. Nagata, *Human Type IV P-type ATPases That Work as Plasma Membrane Phospholipid Flippases and Their Regulation by Caspase and Calcium*. J Biol Chem, 2016. **291**(41): p. 21421.
255. Segawa, K., et al., *Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure*. Science, 2014. **344**(6188): p. 1164-8.
256. Takatsu, H., et al., *Phospholipid Flippase Activities and Substrate Specificities of Human Type IV P-type ATPases Localized to the Plasma Membrane*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(48): p. 33543-33556.
257. Segawa, K., S. Kurata, and S. Nagata, *The CDC50A extracellular domain is required for forming a functional complex with and chaperoning phospholipid flippases to the plasma membrane*. J Biol Chem, 2018. **293**(6): p. 2172-2182.
258. Baumgartner, H.R., *Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested subendothelium*. Thromb Haemost, 1977. **37**(1): p. 1-16.
259. Moroi, M., et al., *A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion*. J Clin Invest, 1989. **84**(5): p. 1440-5.
260. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
261. Tate, B.F. and S.E. Rittenhouse, *Thrombin activation of human platelets causes tyrosine phosphorylation of PLC-gamma 2*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1178**(3): p. 281-5.
262. Offermanns, S., et al., *Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice*. Nature, 1997. **389**(6647): p. 183-6.
263. Gilio, K., et al., *Roles of platelet STIM1 and Orai1 in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation*. J Biol Chem, 2010. **285**(31): p. 23629-38.
264. Lentz, B.R., *Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(5): p. 423-38.
265. Bevers, E.M., P. Comfurius, and R.F. Zwaal, *Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation*. Biochim Biophys Acta, 1983. **736**(1): p. 57-66.
266. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol, 1967. **13**(3): p. 269-88.
267. Rosing, J., et al., *Impaired factor X and prothrombin activation associated with decreased phospholipid exposure in platelets from a patient with a bleeding disorder*. Blood, 1985. **65**(6): p. 1557-61.
268. Tilly, R.H., et al., *Increased aminophospholipid translocase activity in human platelets during secretion*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1029**(1): p. 188-90.
269. Arashiki, N., et al., *ATP11C is a major flippase in human erythrocytes and its defect causes congenital hemolytic anemia*. Haematologica, 2016. **101**(5): p. 559-65.

270. Weiss, H.J., et al., *Isolated deficiency of platelet procoagulant activity*. Am J Med, 1979. **67**(2): p. 206-13.
271. Miletich, J.P., et al., *Deficiency of factor Xa-factor Va binding sites on the platelets of a patient with a bleeding disorder*. Blood, 1979. **54**(5): p. 1015-22.
272. Kojima, H., et al., *Production and characterization of transformed B-lymphocytes expressing the membrane defect of Scott syndrome*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2237-44.
273. Sims, P.J., et al., *Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity*. J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17049-57.
274. Bevers, E.M., et al., *Defective Ca(2+)-induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome*. Blood, 1992. **79**(2): p. 380-8.
275. Toti, F., et al., *Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder*. Blood, 1996. **87**(4): p. 1409-15.
276. Suzuki, J., et al., *Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F*. Nature, 2010. **468**(7325): p. 834-8.
277. Boisseau, P., et al., *A new mutation of ANO6 in two familial cases of Scott syndrome*. Br J Haematol, 2018. **180**(5): p. 750-752.
278. Castoldi, E., et al., *Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome*. Blood, 2011. **117**(16): p. 4399-400.
279. Han, T.W., et al., *Chemically induced vesiculation as a platform for studying TMEM16F activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(4): p. 1309-1318.
280. Brunner, J.D., et al., *X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase*. Nature, 2014. **516**(7530): p. 207-12.
281. Dang, S., et al., *Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel*. Nature, 2017. **552**(7685): p. 426-429.
282. Suzuki, J., et al., *Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members*. J Biol Chem, 2013. **288**(19): p. 13305-16.
283. Gyobu, S., et al., *Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(24): p. 6274-6279.
284. Yu, K., et al., *Identification of a lipid scrambling domain in ANO6/TMEM16F*. Elife, 2015. **4**: p. e06901.
285. Grubb, S., et al., *TMEM16F (Anoctamin 6), an anion channel of delayed Ca(2+) activation*. J Gen Physiol, 2013. **141**(5): p. 585-600.
286. Alvadia, C., et al., *Cryo-EM structures and functional characterization of the murine lipid scramblase TMEM16F*. Elife, 2019. **8**.
287. Ishihara, K., J. Suzuki, and S. Nagata, *Role of Ca(2+) in the Stability and Function of TMEM16F and 16K*. Biochemistry, 2016. **55**(23): p. 3180-8.
288. Feng, S., et al., *Cryo-EM Studies of TMEM16F Calcium-Activated Ion Channel Suggest Features Important for Lipid Scrambling*. Cell Rep, 2019. **28**(5): p. 1385.
289. Bethel, N.P. and M. Grabe, *Atomistic insight into lipid translocation by a TMEM16 scramblase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(49): p. 14049-14054.

290. Le, T., et al., *An inner activation gate controls TMEM16F phospholipid scrambling*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1846.
291. Kmit, A., et al., *Calcium-activated and apoptotic phospholipid scrambling induced by Ano6 can occur independently of Ano6 ion currents*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e611.
292. Scudieri, P., et al., *Ion channel and lipid scramblase activity associated with expression of TMEM16F/ANO6 isoforms*. J Physiol, 2015. **593**(17): p. 3829-48.
293. Yang, H., et al., *TMEM16F forms a Ca²⁺-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation*. Cell, 2012. **151**(1): p. 111-22.
294. Taylor, K.A. and M.P. Mahaut-Smith, *A major interspecies difference in the ionic selectivity of megakaryocyte Ca(2+)-activated channels sensitive to the TMEM16F inhibitor CaCCinh-A01*. Platelets, 2019. **30**(8): p. 962-966.
295. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
296. Williamson, P., et al., *Phospholipid scramblase activation pathways in lymphocytes*. Biochemistry, 2001. **40**(27): p. 8065-72.
297. Suzuki, J., et al., *Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells*. Science, 2013. **341**(6144): p. 403-6.
298. Fadok, V.A., et al., *Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1071-7.
299. Barth, N.D., et al., *The "Phagocytic Synapse" and Clearance of Apoptotic Cells*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1708.
300. Sasaki, T., et al., *Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases*. Prog Lipid Res, 2009. **48**(6): p. 307-43.
301. Chang, C.L. and J. Liou, *Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Homeostasis Regulated by Nir2 and Nir3 Proteins at Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions*. J Biol Chem, 2015. **290**(23): p. 14289-301.
302. McLaughlin, S. and D. Murray, *Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 605-11.
303. Czech, M.P., *PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface*. Cell, 2000. **100**(6): p. 603-6.
304. Fairn, G.D., et al., *An electrostatic switch displaces phosphatidylinositol phosphate kinases from the membrane during phagocytosis*. J Cell Biol, 2009. **187**(5): p. 701-14.
305. Auger, K.R., et al., *PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells*. Cell, 1989. **57**(1): p. 167-75.
306. Maehama, T. and J.E. Dixon, *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13375-8.
307. Shenoy, S., et al., *Membrane association of the PTEN tumor suppressor: molecular details of the protein-membrane complex from SPR binding studies and neutron reflection*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e32591.
308. Vance, J.E., *Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells*. Traffic, 2015. **16**(1): p. 1-18.

309. Tanguy, E., et al., *Phosphatidic Acid: From Pleiotropic Functions to Neuronal Pathology*. Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 2.
310. Ma, Y., et al., *A FRET sensor enables quantitative measurements of membrane charges in live cells*. Nat Biotechnol, 2017. **35**(4): p. 363-370.
311. Shan, X., et al., *Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(18): p. 6945-57.
312. Aivazian, D. and L.J. Stern, *Phosphorylation of T cell receptor zeta is regulated by a lipid dependent folding transition*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(11): p. 1023-6.
313. Sigalov, A.B., et al., *Lipid-binding activity of intrinsically unstructured cytoplasmic domains of multichain immune recognition receptor signaling subunits*. Biochemistry, 2006. **45**(51): p. 15731-9.
314. Guo, X., et al., *Lipid-dependent conformational dynamics underlie the functional versatility of T-cell receptor*. Cell Res, 2017. **27**(4): p. 505-525.
315. DeFord-Watts, L.M., et al., *The CD3 zeta subunit contains a phosphoinositide-binding motif that is required for the stable accumulation of TCR-CD3 complex at the immunological synapse*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6839-47.
316. Sekar, R.B. and A. Periasamy, *Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations*. J Cell Biol, 2003. **160**(5): p. 629-33.
317. Chen, T., et al., *Application of Forster Resonance Energy Transfer (FRET) technique to elucidate intracellular and In Vivo biofate of nanomedicines*. Adv Drug Deliv Rev, 2019. **143**: p. 177-205.
318. Gagnon, E., et al., *Local changes in lipid environment of TCR microclusters regulate membrane binding by the CD3epsilon cytoplasmic domain*. J Exp Med, 2012. **209**(13): p. 2423-39.
319. Zhang, H., et al., *Basic residues in the T-cell receptor zeta cytoplasmic domain mediate membrane association and modulate signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(48): p. 19323-8.
320. Li, L., et al., *Ionic CD3-Lck interaction regulates the initiation of T-cell receptor signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(29): p. E5891-E5899.
321. Duchardt, E., et al., *Structure induction of the T-cell receptor zeta-chain upon lipid binding investigated by NMR spectroscopy*. Chembiochem, 2007. **8**(7): p. 820-7.
322. Yang, W., et al., *Dynamic regulation of CD28 conformation and signaling by charged lipids and ions*. Nat Struct Mol Biol, 2017. **24**(12): p. 1081-1092.
323. Chen, X., et al., *Acidic phospholipids govern the enhanced activation of IgG-B cell receptor*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8552.
324. Wan, Z., et al., *PI(4,5)P2 determines the threshold of mechanical force-induced B cell activation*. J Cell Biol, 2018. **217**(7): p. 2565-2582.
325. Martinez-Martin, N., et al., *Cooperativity between T cell receptor complexes revealed by conformational mutants of CD3epsilon*. Sci Signal, 2009. **2**(83): p. ra43.
326. Brazin, K.N., et al., *Constitutively oxidized CXXC motifs within the CD3 heterodimeric ectodomains of the T cell receptor complex enforce the conformation of juxtaposed segments*. J Biol Chem, 2014. **289**(27): p. 18880-92.

327. Das, D.K., et al., *Force-dependent transition in the T-cell receptor beta-subunit allosterically regulates peptide discrimination and pMHC bond lifetime*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(5): p. 1517-22.
328. Lee, M.S., et al., *A Mechanical Switch Couples T Cell Receptor Triggering to the Cytoplasmic Juxtamembrane Regions of CD3zeta*. Immunity, 2015. **43**(2): p. 227-39.
329. Brazin, K.N., et al., *The T Cell Antigen Receptor alpha Transmembrane Domain Coordinates Triggering through Regulation of Bilayer Immersion and CD3 Subunit Associations*. Immunity, 2018. **49**(5): p. 829-841 e6.
330. Swamy, M., et al., *A Cholesterol-Based Allosteric Model of T Cell Receptor Phosphorylation*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 1091-101.
331. Gil, D., et al., *Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation*. Cell, 2002. **109**(7): p. 901-12.
332. Borroto, A., et al., *Relevance of Nck-CD3 epsilon interaction for T cell activation in vivo*. J Immunol, 2014. **192**(5): p. 2042-53.
333. Gil, D., et al., *T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 517-22.
334. Risueno, R.M., et al., *Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses*. Blood, 2005. **106**(2): p. 601-8.
335. Paensuwan, P., et al., *Nck Binds to the T Cell Antigen Receptor Using Its SH3.1 and SH2 Domains in a Cooperative Manner, Promoting TCR Functioning*. J Immunol, 2016. **196**(1): p. 448-58.
336. Sasmal, D.K., et al., *TCR-pMHC bond conformation controls TCR ligand discrimination*. Cell Mol Immunol, 2020. **17**(3): p. 203-217.
337. Stepanek, O., et al., *Coreceptor scanning by the T cell receptor provides a mechanism for T cell tolerance*. Cell, 2014. **159**(2): p. 333-45.
338. Philipsen, L., et al., *De novo phosphorylation and conformational opening of the tyrosine kinase Lck act in concert to initiate T cell receptor signaling*. Science Signaling, 2017. **10**(462).
339. Hartl, F.A., et al., *Noncanonical binding of Lck to CD3epsilon promotes TCR signaling and CAR function*. Nat Immunol, 2020. **21**(8): p. 902-913.
340. Yi, J., et al., *TCR microclusters form spatially segregated domains and sequentially assemble in calcium-dependent kinetic steps*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 277.
341. van Oers, N.S., et al., *Constitutive tyrosine phosphorylation of the T-cell receptor (TCR) zeta subunit: regulation of TCR-associated protein tyrosine kinase activity by TCR zeta*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(9): p. 5771-80.
342. Kersh, E.N., A.S. Shaw, and P.M. Allen, *Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation*. Science, 1998. **281**(5376): p. 572-5.
343. Zimmermann, K., et al., *The cytosolic domain of T-cell receptor zeta associates with membranes in a dynamic equilibrium and deeply penetrates the bilayer*. J Biol Chem, 2017. **292**(43): p. 17746-17759.
344. Feng, Y., et al., *Mechanosensing drives acuity of alphabeta T-cell recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(39): p. E8204-E8213.

345. Liu, B., et al., *Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide-MHC triggers T cell signaling*. Cell, 2014. **157**(2): p. 357-368.
346. Pagon, S.V., et al., *Functional role of T-cell receptor nanoclusters in signal initiation and antigen discrimination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(37): p. E5454-63.
347. Connolly, A. and E. Gagnon, *Electrostatic interactions: From immune receptor assembly to signaling*. Immunol Rev, 2019. **291**(1): p. 26-43.
348. Huang, J., et al., *A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4(+) T cells*. Immunity, 2013. **39**(5): p. 846-57.
349. Itoh, Y., et al., *Serial TCR engagement and down-modulation by peptide:MHC molecule ligands: relationship to the quality of individual TCR signaling events*. J Immunol, 1999. **162**(4): p. 2073-80.
350. Wulfig, C., et al., *Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition*. Nat Immunol, 2002. **3**(1): p. 42-7.
351. Krogsgaard, M., et al., *Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity*. Nature, 2005. **434**(7030): p. 238-43.
352. Yachi, P.P., et al., *Nonstimulatory peptides contribute to antigen-induced CD8-T cell receptor interaction at the immunological synapse*. Nat Immunol, 2005. **6**(8): p. 785-92.
353. Yachi, P.P., et al., *T cell activation enhancement by endogenous pMHC acts for both weak and strong agonists but varies with differentiation state*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2747-57.
354. Li, Q.J., et al., *CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse*. Nat Immunol, 2004. **5**(8): p. 791-9.
355. Zhao, X., et al., *Nonstimulatory peptide-MHC enhances human T-cell antigen-specific responses by amplifying proximal TCR signaling*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2716.
356. Hoerter, J.A., et al., *Coreceptor affinity for MHC defines peptide specificity requirements for TCR interaction with coagonist peptide-MHC*. J Exp Med, 2013. **210**(9): p. 1807-21.
357. Costello, P.S., M. Gallagher, and D.A. Cantrell, *Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1082-9.
358. Le Floch, A., et al., *Annular PIP3 accumulation controls actin architecture and modulates cytotoxicity at the immunological synapse*. J Exp Med, 2013. **210**(12): p. 2721-37.
359. Harriague, J. and G. Bismuth, *Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1090-6.
360. Gawden-Bone, C.M., et al., *PIP5 Kinases Regulate Membrane Phosphoinositide and Actin Composition for Targeted Granule Secretion by Cytotoxic Lymphocytes*. Immunity, 2018. **49**(3): p. 427-437 e4.
361. Sun, Y., et al., *Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate controls T cell activation by regulating T cell rigidity and organization*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27227.
362. Ritter, A.T., et al., *Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse*. Immunity, 2015. **42**(5): p. 864-76.
363. Chouaki-Benmansour, N., et al., *Phosphoinositides regulate the TCR/CD3 complex membrane dynamics and activation*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 4966.
364. Rabinowitz, J.D., et al., *Altered T cell receptor ligands trigger a subset of early T cell signals*. Immunity, 1996. **5**(2): p. 125-35.

365. Quintana, A., et al., *Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation*. EMBO J, 2011. **30**(19): p. 3895-912.
366. Shi, X., et al., *Ca²⁺ regulates T-cell receptor activation by modulating the charge property of lipids*. Nature, 2013. **493**(7430): p. 111-5.
367. Melcrova, A., et al., *The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38035.
368. Hu, Y., et al., *Scramblase TMEM16F terminates T cell receptor signaling to restrict T cell exhaustion*. J Exp Med, 2016. **213**(12): p. 2759-2772.
369. Lin, H., et al., *Temperature-dependent increase in the calcium sensitivity and acceleration of activation of ANO6 chloride channel variants*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 6706.
370. Fischer, K., et al., *Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8⁺ T cells*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4094-101.
371. Dillon, S.R., et al., *Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1322-32.
372. Hammill, A.K., J.W. Uhr, and R.H. Scheuermann, *Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death*. Exp Cell Res, 1999. **251**(1): p. 16-21.
373. Segawa, K., J. Suzuki, and S. Nagata, *Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(48): p. 19246-51.
374. Wu, N., et al., *Critical Role of Lipid Scramblase TMEM16F in Phosphatidylserine Exposure and Repair of Plasma Membrane after Pore Formation*. Cell Rep, 2020. **30**(4): p. 1129-1140 e5.
375. Heng, T.S., M.W. Painter, and C. Immunological Genome Project, *The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(10): p. 1091-4.
376. Mingueneau, M., et al., *The transcriptional landscape of alphabeta T cell differentiation*. Nat Immunol, 2013. **14**(6): p. 619-32.
377. Ross, J.O., et al., *Distinct phases in the positive selection of CD8⁺ T cells distinguished by intrathymic migration and T-cell receptor signaling patterns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(25): p. E2550-8.
378. Zhou, P., et al., *In vivo discovery of immunotherapy targets in the tumour microenvironment*. Nature, 2014. **506**(7486): p. 52-7.
379. Lee, J., M. Sadelain, and R. Brentjens, *Retroviral transduction of murine primary T lymphocytes*. Methods Mol Biol, 2009. **506**: p. 83-96.
380. Best, J.A., et al., *Transcriptional insights into the CD8(+) T cell response to infection and memory T cell formation*. Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 404-12.
381. Zhang, T., et al., *Deciphering the landscape of host barriers to Listeria monocytogenes infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(24): p. 6334-6339.
382. Hanninen, A., et al., *Ly6C supports preferential homing of central memory CD8⁺ T cells into lymph nodes*. Eur J Immunol, 2011. **41**(3): p. 634-44.
383. Kodigepalli, K.M., et al., *Roles and regulation of phospholipid scramblases*. FEBS Lett, 2015. **589**(1): p. 3-14.

384. Bushell, S.R., et al., *The structural basis of lipid scrambling and inactivation in the endoplasmic reticulum scramblase TMEM16K*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3956.
385. Fujii, T., et al., *TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(41): p. 12800-5.
386. Mattheij, N.J., et al., *Survival protein anoctamin-6 controls multiple platelet responses including phospholipid scrambling, swelling, and protein cleavage*. FASEB J, 2016. **30**(2): p. 727-37.
387. Tsuji, T., et al., *Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(27): p. 13368-13373.
388. Bricogne, C., et al., *TMEM16F activation by Ca(2+) triggers plasma membrane expansion and directs PD-1 trafficking*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 619.
389. Roux, K.J., et al., *A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells*. J Cell Biol, 2012. **196**(6): p. 801-10.
390. Varnaite, R. and S.A. MacNeill, *Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID*. Proteomics, 2016. **16**(19): p. 2503-2518.
391. Gagnon, E., et al., *Studying Dynamic Plasma Membrane Binding of TCR-CD3 Chains During Immunological Synapse Formation Using Donor-Quenching FRET and FLIM-FRET*. Methods Mol Biol, 2017. **1584**: p. 259-289.
392. Donnadieu, E., G. Bismuth, and A. Trautmann, *The intracellular Ca²⁺ concentration optimal for T cell activation is quite different after ionomycin or CD3 stimulation*. Pflugers Arch, 1995. **429**(4): p. 546-54.
393. Malvezzi, M., et al., *Ca²⁺-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2367.
394. Bucci, C., et al., *Rab7: a key to lysosome biogenesis*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(2): p. 467-80.
395. James, J.R. and R.D. Vale, *Biophysical mechanism of T-cell receptor triggering in a reconstituted system*. Nature, 2012. **487**(7405): p. 64-9.
396. Shinoda, H., M. Shannon, and T. Nagai, *Fluorescent Proteins for Investigating Biological Events in Acidic Environments*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(6).
397. Jackson, M.P. and E.W. Hewitt, *Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes*. Essays Biochem, 2016. **60**(2): p. 173-180.
398. Fernandes, R.A., et al., *What controls T cell receptor phosphorylation?* Cell, 2010. **142**(5): p. 668-9.
399. Gagnon, E., et al., *Response multilayered control of T cell receptor phosphorylation*. Cell, 2010. **142**(5): p. 669-71.
400. Reinherz, E.L., *The structure of a T-cell mechanosensor*. Nature, 2019. **573**(7775): p. 502-504.
401. Tan, Y.X., et al., *Inhibition of the kinase Csk in thymocytes reveals a requirement for actin remodeling in the initiation of full TCR signaling*. Nat Immunol, 2014. **15**(2): p. 186-94.
402. Zech, T., et al., *Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling*. EMBO J, 2009. **28**(5): p. 466-76.
403. Rudd-Schmidt, J.A., et al., *Lipid order and charge protect killer T cells from accidental death*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 5396.

404. Goyette, J., et al., *How does T cell receptor clustering impact on signal transduction?* J Cell Sci, 2019. **132**(4).
405. Molnar, E., et al., *Cholesterol and sphingomyelin drive ligand-independent T-cell antigen receptor nanoclustering.* J Biol Chem, 2012. **287**(51): p. 42664-74.
406. Yang, W., et al., *Potentiating the antitumour response of CD8(+) T cells by modulating cholesterol metabolism.* Nature, 2016. **531**(7596): p. 651-5.
407. Martin-Blanco, N., et al., *A window of opportunity for cooperativity in the T Cell Receptor.* Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2618.
408. Wang, F., et al., *Inhibition of T cell receptor signaling by cholesterol sulfate, a naturally occurring derivative of membrane cholesterol.* Nat Immunol, 2016. **17**(7): p. 844-50.
409. James, J.R., *Tuning ITAM multiplicity on T cell receptors can control potency and selectivity to ligand density.* Sci Signal, 2018. **11**(531).
410. Niedergang, F., A. Dautry-Varsat, and A. Alcover, *Peptide antigen or superantigen-induced down-regulation of TCRs involves both stimulated and unstimulated receptors.* J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1703-10.
411. Niedergang, F., A. Dautry-Varsat, and A. Alcover, *Cooperative activation of TCRs by enterotoxin superantigens.* J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6054-8.
412. Bachmann, M.F., et al., *Peptide-induced T cell receptor down-regulation on naive T cells predicts agonist/partial agonist properties and strictly correlates with T cell activation.* Eur J Immunol, 1997. **27**(9): p. 2195-203.
413. Bonefeld, C.M., et al., *TCR comodulation of nonengaged TCR takes place by a protein kinase C and CD3 gamma di-leucine-based motif-dependent mechanism.* J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3003-9.
414. Vardhana, S., et al., *Essential role of ubiquitin and TSG101 protein in formation and function of the central supramolecular activation cluster.* Immunity, 2010. **32**(4): p. 531-40.
415. Naramura, M., et al., *c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation.* Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1192-9.
416. Wang, H.Y., et al., *Cbl promotes ubiquitination of the T cell receptor zeta through an adaptor function of Zap-70.* J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26004-11.
417. Kaksonen, M. and A. Roux, *Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(5): p. 313-326.
418. Borroto, A., et al., *The CD3 epsilon subunit of the TCR contains endocytosis signals.* J Immunol, 1999. **163**(1): p. 25-31.
419. Martinez-Martin, N., et al., *T cell receptor internalization from the immunological synapse is mediated by TC21 and RhoG GTPase-dependent phagocytosis.* Immunity, 2011. **35**(2): p. 208-22.
420. Schamel, W.W., et al., *Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response.* J Exp Med, 2005. **202**(4): p. 493-503.
421. Kumar, R., et al., *Increased sensitivity of antigen-experienced T cells through the enrichment of oligomeric T cell receptor complexes.* Immunity, 2011. **35**(3): p. 375-87.
422. Brameshuber, M., et al., *Monomeric TCRs drive T cell antigen recognition.* Nat Immunol, 2018. **19**(5): p. 487-496.

423. Allison, K.A., et al., *Affinity and dose of TCR engagement yield proportional enhancer and gene activity in CD4+ T cells*. *Elife*, 2016. **5**.
424. Favier, B., et al., *TCR dynamics on the surface of living T cells*. *Int Immunol*, 2001. **13**(12): p. 1525-32.
425. Deford-Watts, L.M., et al., *The cytoplasmic tail of the T cell receptor CD3 epsilon subunit contains a phospholipid-binding motif that regulates T cell functions*. *J Immunol*, 2009. **183**(2): p. 1055-64.
426. Hansen, S.B., *Lipid agonism: The PIP2 paradigm of ligand-gated ion channels*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1851**(5): p. 620-8.
427. Ye, W., et al., *Phosphatidylinositol-(4, 5)-bisphosphate regulates calcium gating of small-conductance cation channel TMEM16F*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(7): p. E1667-E1674.
428. Yu, K., et al., *A network of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding sites regulates gating of the Ca(2+)-activated Cl(-) channel ANO1 (TMEM16A)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019. **116**(40): p. 19952-19962.
429. Tembo, M., et al., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) and Ca(2+) are both required to open the Cl(-) channel TMEM16A*. *J Biol Chem*, 2019. **294**(33): p. 12556-12564.
430. Le, S.C., et al., *Molecular basis of PIP2-dependent regulation of the Ca(2+)-activated chloride channel TMEM16A*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 3769.
431. Ishikawa, F., et al., *Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice*. *Blood*, 2005. **106**(5): p. 1565-73.
432. Bartelt, R.R., et al., *Comparison of T cell receptor-induced proximal signaling and downstream functions in immortalized and primary T cells*. *PLoS One*, 2009. **4**(5): p. e5430.
433. Freeburn, R.W., et al., *Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors*. *J Immunol*, 2002. **169**(10): p. 5441-50.
434. Davey, G.M., et al., *Preselection thymocytes are more sensitive to T cell receptor stimulation than mature T cells*. *J Exp Med*, 1998. **188**(10): p. 1867-74.
435. Lucas, B., et al., *Divergent changes in the sensitivity of maturing T cells to structurally related ligands underlies formation of a useful T cell repertoire*. *Immunity*, 1999. **10**(3): p. 367-76.
436. Salmond, R.J., et al., *The tyrosine phosphatase PTPN22 discriminates weak self peptides from strong agonist TCR signals*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(9): p. 875-883.
437. Wu, J., et al., *Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(16): p. 11002-10.
438. Li, Q.J., et al., *miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection*. *Cell*, 2007. **129**(1): p. 147-61.
439. Fu, G., et al., *Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(8): p. 848-56.
440. Zvezdova, E., et al., *Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability*. *Sci Signal*, 2016. **9**(428): p. ra51.
441. Choi, S., et al., *THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1*. *Nat Immunol*, 2017. **18**(4): p. 433-441.

442. Brzostek, J., et al., *T cell receptor and cytokine signal integration in CD8(+) T cells is mediated by the protein Themis*. Nat Immunol, 2020. **21**(2): p. 186-198.
443. Mehta, M., et al., *Themis-associated phosphatase activity controls signaling in T cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(48): p. E11331-E11340.
444. Melichar, H.J., et al., *Distinct temporal patterns of T cell receptor signaling during positive versus negative selection in situ*. Sci Signal, 2013. **6**(297): p. ra92.
445. Au-Yeung, B.B., et al., *Quantitative and temporal requirements revealed for Zap70 catalytic activity during T cell development*. Nat Immunol, 2014. **15**(7): p. 687-94.
446. Klein, L., et al., *Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 377-91.
447. Azzam, H.S., et al., *CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2301-11.
448. Voisinne, G., A. Gonzalez de Peredo, and R. Roncagalli, *CD5, an Undercover Regulator of TCR Signaling*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2900.
449. Kisielow, P., et al., *Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes*. Nature, 1988. **333**(6175): p. 742-6.
450. Yu, B., et al., *Epigenetic landscapes reveal transcription factors that regulate CD8(+) T cell differentiation*. Nat Immunol, 2017. **18**(5): p. 573-582.
451. Kakaradov, B., et al., *Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8(+) T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing*. Nat Immunol, 2017. **18**(4): p. 422-432.
452. Au-Yeung, B.B., et al., *A sharp T-cell antigen receptor signaling threshold for T-cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(35): p. E3679-88.
453. Lee-Sayer, S.S.M., et al., *Hyaluronan-binding by CD44 reduces the memory potential of activated murine CD8 T cells*. Eur J Immunol, 2018. **48**(5): p. 803-814.
454. Tomura, M., K. Itoh, and O. Kanagawa, *Naive CD4+ T lymphocytes circulate through lymphoid organs to interact with endogenous antigens and upregulate their function*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4646-53.
455. Surh, C.D. and J. Sprent, *Homeostasis of naive and memory T cells*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 848-62.
456. Goldrath, A.W., et al., *The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(48): p. 16885-90.
457. Betts, M.R. and R.A. Koup, *Detection of T-cell degranulation: CD107a and b*. Methods Cell Biol, 2004. **75**: p. 497-512.
458. Mohammed, R.N., et al., *ADAM17-dependent proteolysis of L-selectin promotes early clonal expansion of cytotoxic T cells*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 5487.
459. Link, M.A., et al., *The role of ADAM17 in the T-cell response against bacterial pathogens*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0184320.
460. Sommer, A., et al., *Extracellular sphingomyelinase activity impairs TNF-alpha-induced endothelial cell death via ADAM17 activation and TNF receptor 1 shedding*. Oncotarget, 2017. **8**(42): p. 72584-72596.
461. Veit, M., et al., *Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018. **1865**(11 Pt A): p. 1598-1610.

462. Bleibaum, F., et al., *ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry*. J Mol Cell Biol, 2019. **11**(11): p. 979-993.
463. Sommer, A., et al., *Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11523.
464. Le Gall, S.M., et al., *ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 22): p. 3913-22.
465. Brehm, M.A., K.A. Daniels, and R.M. Welsh, *Rapid production of TNF-alpha following TCR engagement of naive CD8 T cells*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5043-9.
466. Reading, J.L., et al., *The function and dysfunction of memory CD8(+) T cells in tumor immunity*. Immunol Rev, 2018. **283**(1): p. 194-212.
467. Rafiq, S., C.S. Hackett, and R.J. Brentjens, *Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2020. **17**(3): p. 147-167.
468. Morello, A., M. Sadelain, and P.S. Adusumilli, *Mesothelin-Targeted CARs: Driving T Cells to Solid Tumors*. Cancer Discov, 2016. **6**(2): p. 133-46.
469. Suzuki, T., J. Suzuki, and S. Nagata, *Functional swapping between transmembrane proteins TMEM16A and TMEM16F*. J Biol Chem, 2014. **289**(11): p. 7438-47.
470. Namkung, W., P.W. Phuan, and A.S. Verkman, *TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(3): p. 2365-74.
471. Pedemonte, N. and L.J. Galletta, *Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins)*. Physiol Rev, 2014. **94**(2): p. 419-59.
472. Davenport, A.J., et al., *Chimeric antigen receptor T cells form nonclassical and potent immune synapses driving rapid cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(9): p. E2068-E2076.
473. Huang, A.C., et al., *T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response*. Nature, 2017. **545**(7652): p. 60-65.

Annexes

Annexe 1: Complément de résultats pour le Chapitre 2

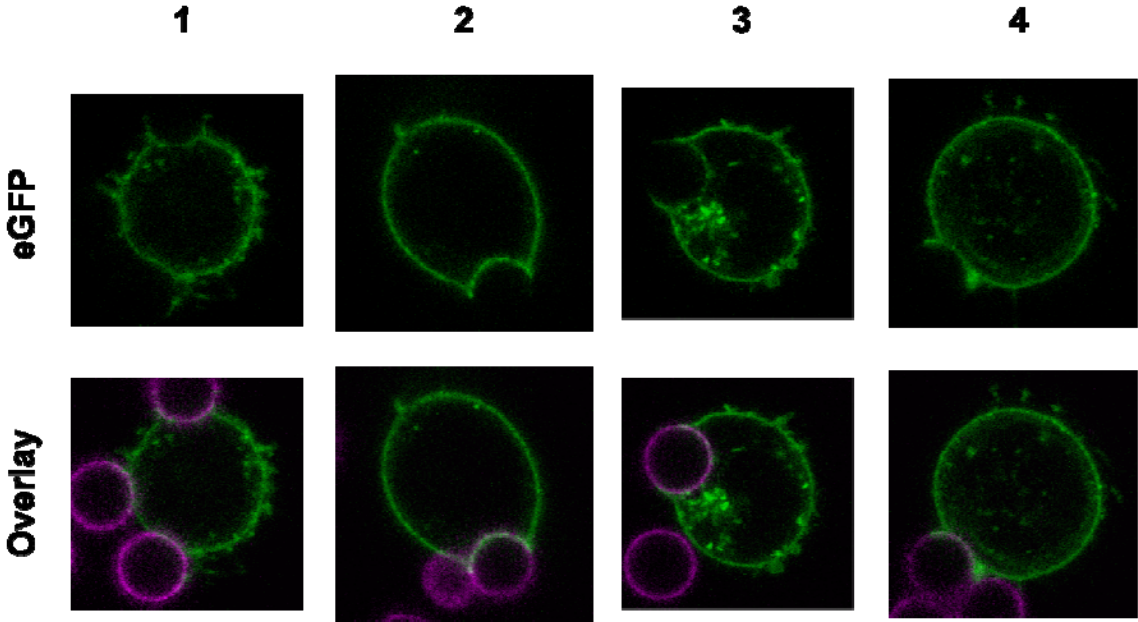
Annexe 2: Western blot de la phosphorylation du TCR non-engagé

Annexe 3: Article de revue: Electrostatic Interactions: from Immune Receptor Assembly to Signaling

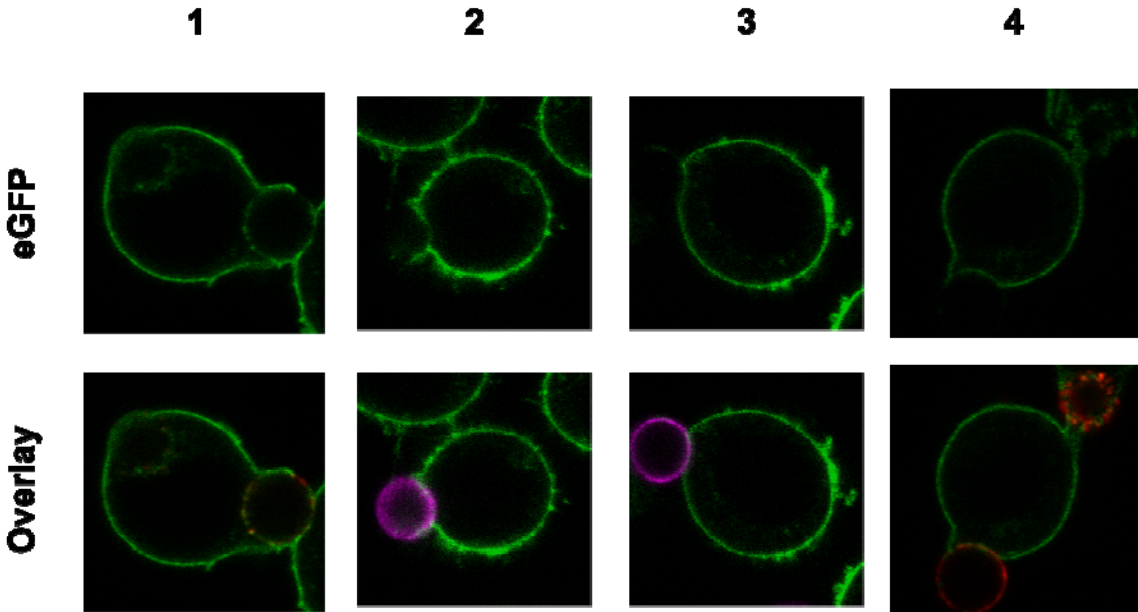
Annexe 1

Expériences de synapses en microscopie reliées aux Figures 1G-H, S1G et S5I

TMEM16F WT eGFP

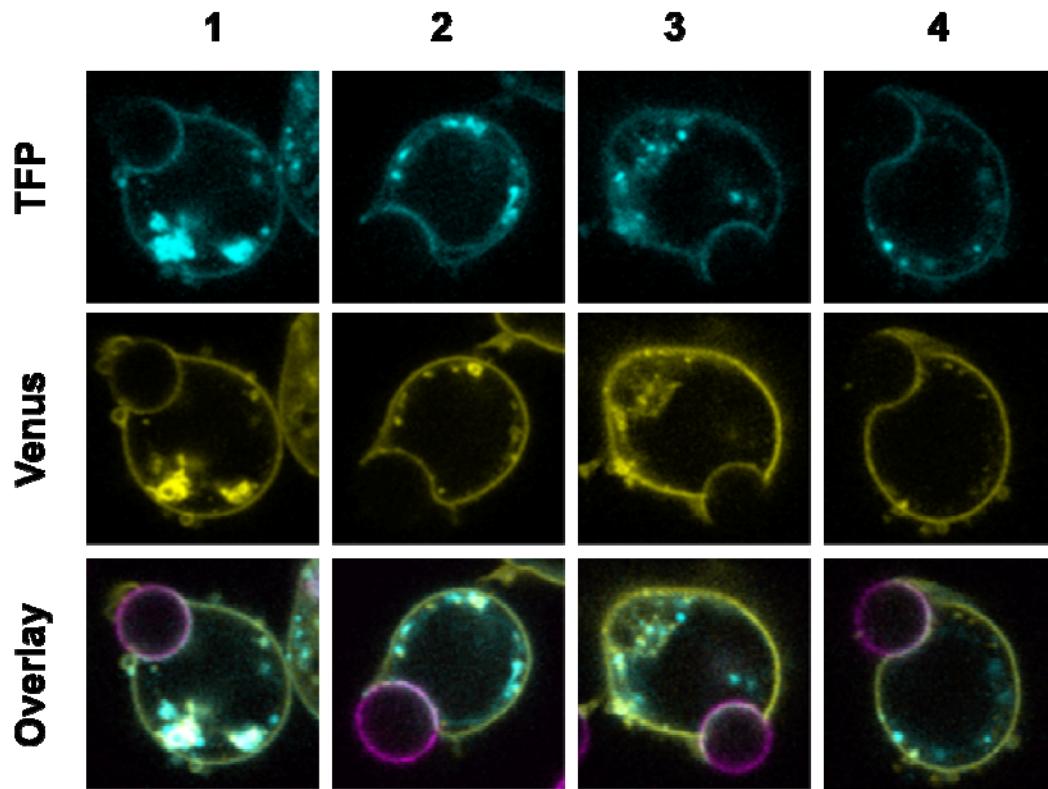


TMEM16F Mut eGFP

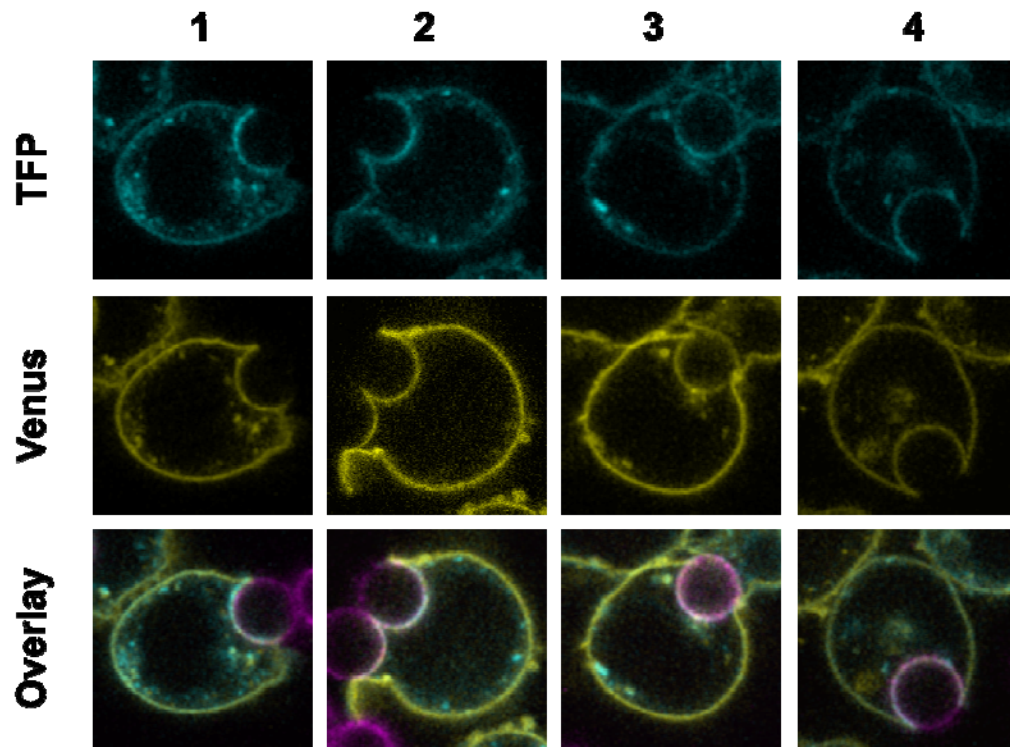


Expériences de synapses en microscopie reliées aux Figures 3A-B et 6A-B, S3B et S6A

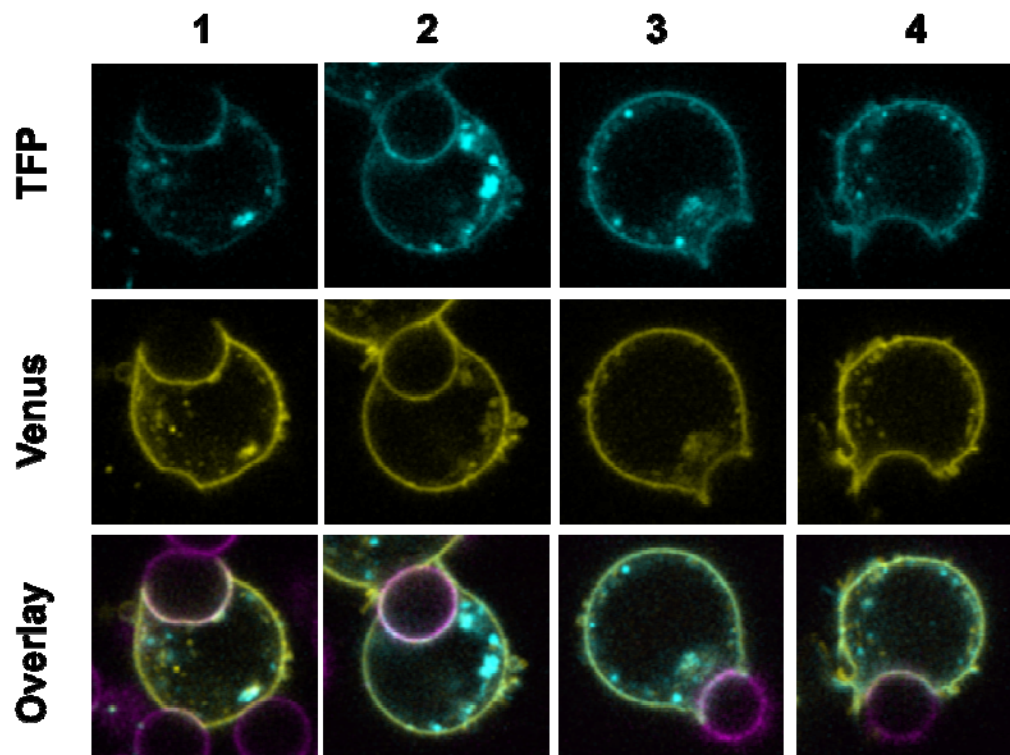
3-TFP



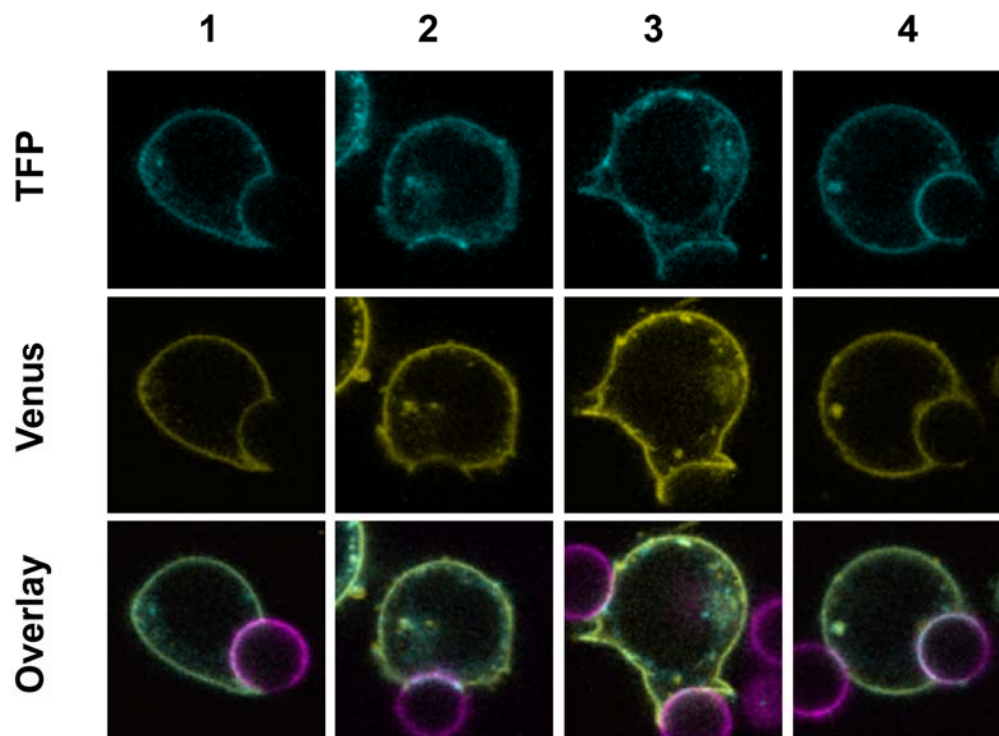
shScr



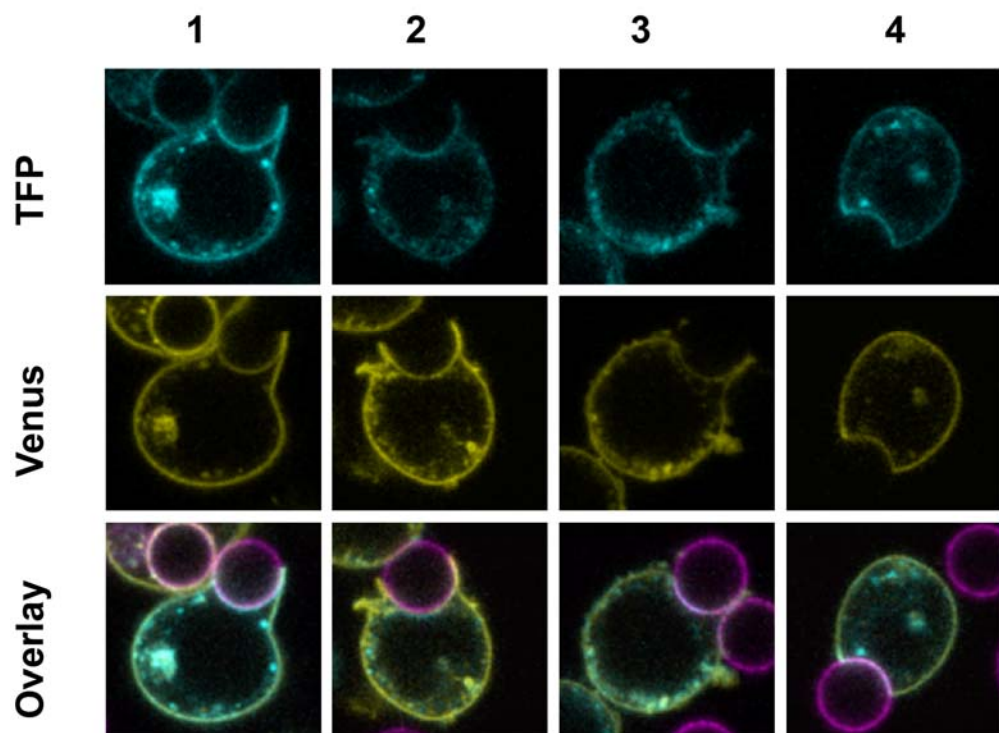
shTMEM16F



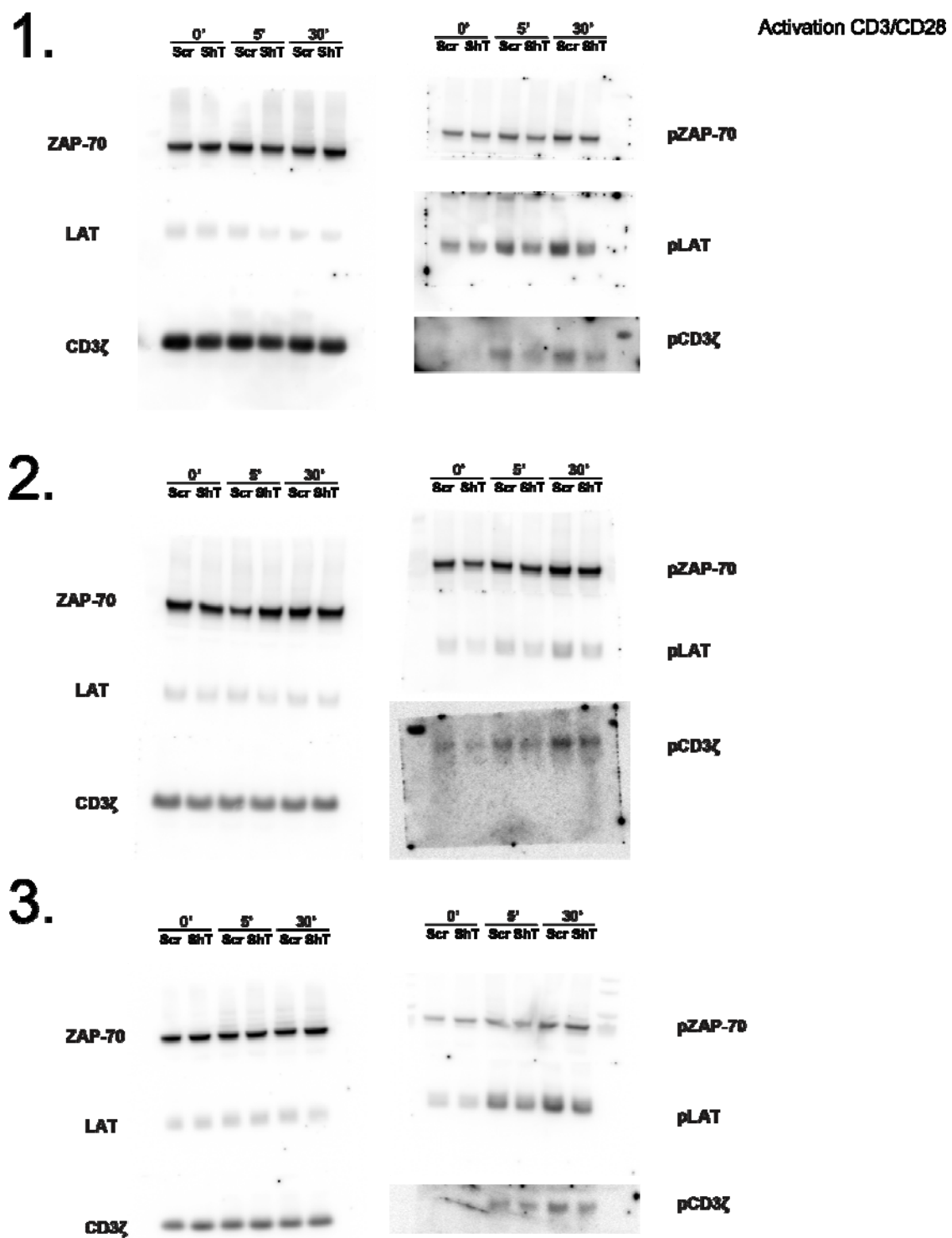
TMEM16F WT



TMEM16F mut



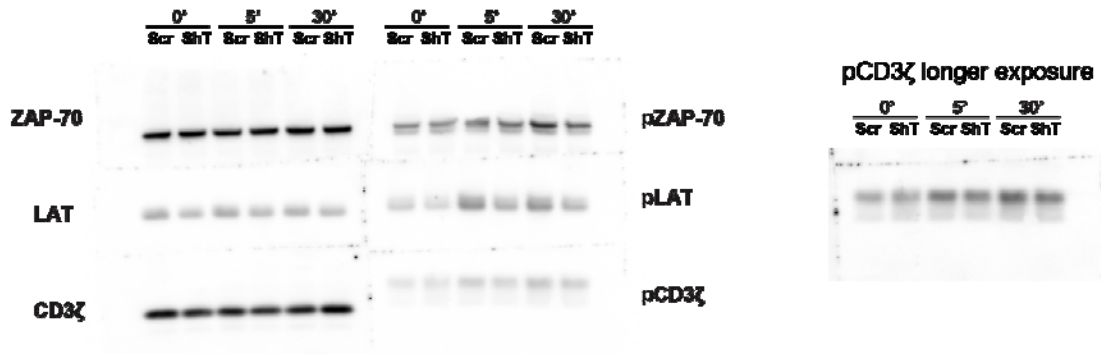
Western blots des expériences d'activation reliés à la Figure 3C



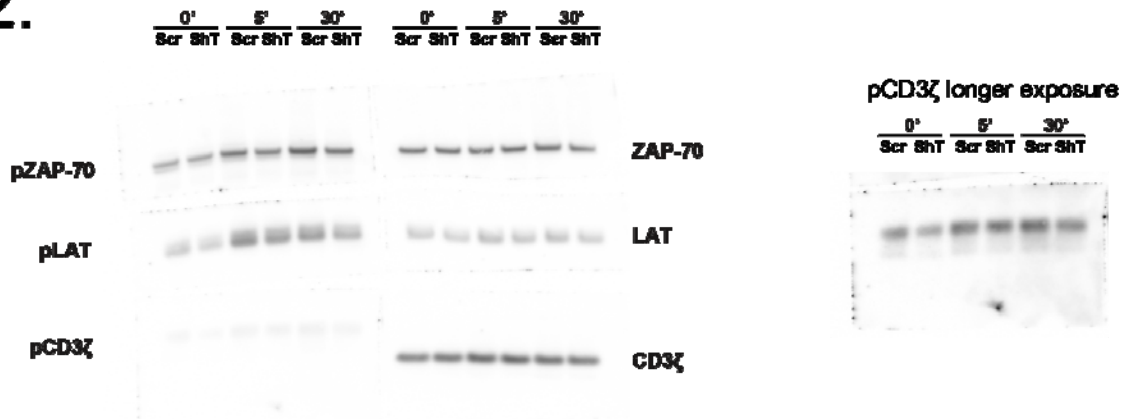
Western blots des expériences d'activation reliés à la Figure S3C

1.

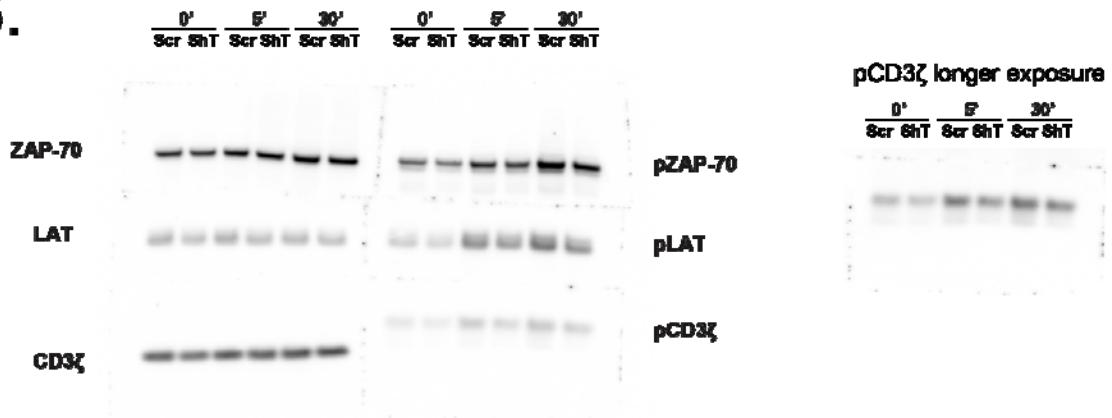
PHA activation 10 μ g/mL



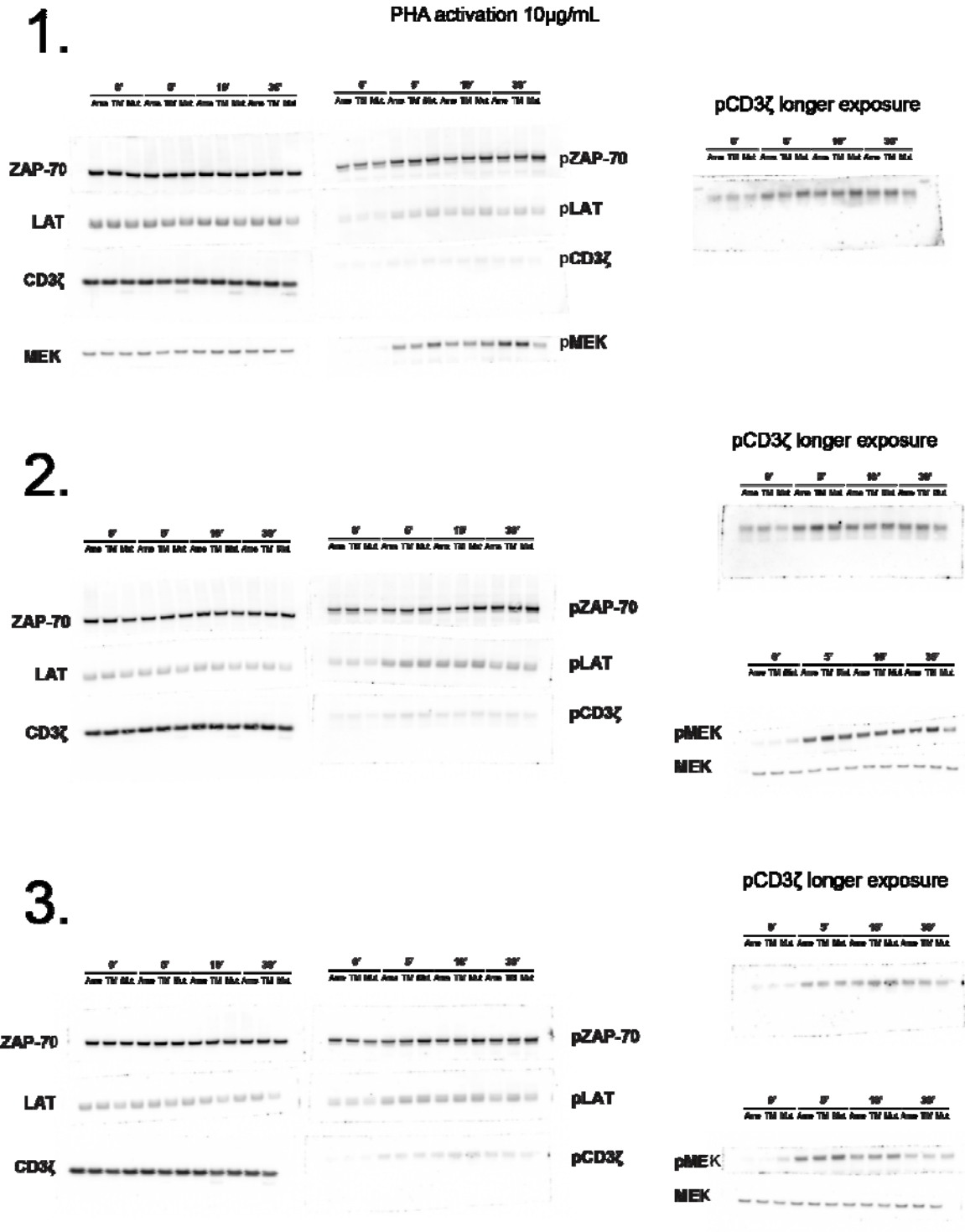
2.



3.



Western blots des expériences d'activation reliés à la Figure 6C



Annexe 2

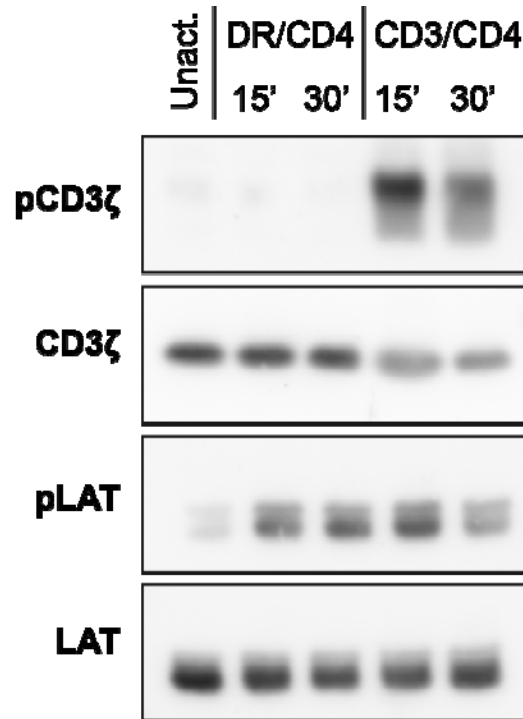


Figure 1. – Phosphorylation des molécules TCR-proximales chez les cellules exprimant la chimère DR $\epsilon\delta$ suivant leur activation avec l'anti-DR/CD4 ou l'anti-CD3/CD4

Matériel et méthodes :

2.5 μ g/mL d'anticorps anti-DR et anti-CD4, ou anti-CD3 et anti-CD4, ont été opsonisés durant la nuit sur une plaque 24 puits à fond plat. 2 x 10⁶ cellules par conditions ont été activées à 37° pendant 15 (15') ou 30 (30') minutes. Comme contrôle négatif d'activation, des cellules ont été incubées à 37° dans un puit sans anticorps opsonisés (Unact.). Les cellules ont été lysées pendant 30 minutes à 4° dans du tampon de lyse pour protéines phosphorylées (voir section 2.5.8 du Chapitre 2). Les protéines ont été isolées par la méthode de précipitation méthanol-chloroforme

et ont été resuspendue dans du tampon LDS 1X avec 10mM de DTT. Le Western blot a été réalisé tel que décrit à la section 2.5.8 du Chapitre 2 en révélant l'entièreté des protéines LAT et CD3ζ, ainsi que leur forme phosphorylée. Les résultats représentent trois expériences indépendantes.

Annexe 3

Electrostatic Interactions: from Immune Receptor Assembly to Signaling.

Audrey Connolly^{1,2} and Etienne Gagnon^{1,2,3}

1. Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie / Institute for Research in Immunology and Cancer.
2. Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montréal, Québec, CANADA, H3T1J4.
Tel : +1 514-343-6702 Fax : +1 514-343-5839
3. Corresponding author : etienne.gagnon@umontreal.ca

Immunological Reviews

Vol. 291, p.26-43

2019

287

RUNNING TITLE: Charge interactions regulate immune receptors.

SUMMARY:

Our ability to mount a long lasting and protective immune response relies on a variety of immune receptors that enable the recognition of ongoing infections, which triggers the adaptation of a myriad of immune cells. The organization of several immune receptors, such as the T cells receptor and several NK cell receptors, utilizes different modules for ligand recognition and signaling. These receptors require specific recognition mechanisms between the different modules in order to ensure proper assembly and function. Once assembled, immune receptors must remain inactive in the absence of ligand to prevent the onset of unwanted immune responses. Indeed, several mechanisms exist to prevent aberrant immune receptor signaling in the absence of ligand to avert the initiation of uncontrolled autoimmunity. However, once ligand is recognized, immune receptors must rapidly and specifically engage kinases to initiate highly regulated signaling cascades that lead to the initiation of transcriptional programs that dictate the immune response. Over the last decade, compelling evidence has been presented which suggest that electrostatic interactions are critical for many aspects of immune receptor functions. In the work that follows, we present an overview of the literature that have provided evidence that illustrate how electrostatic interactions regulate immune receptor assembly, inactive state, triggering, and signaling.

KEY WORDS: T cells receptor, anionic lipids, signaling, immune receptors, electrostatic interactions.

1- INTRODUCTION

Our ability to mount a protective and long-lasting immune response depends on the intervention of key receptors expressed on a variety of cells within the immune system. These receptors enable the communication between immune cells and their immediate environment (comprised either of adjacent cells or pathogens), thereby enabling the initiation of complex signaling cascades that lead to the initiation of transcriptional programs that regulate immune cell differentiation and effector functions. While highly diverse in their structure and ligands, these immune receptors share several features and follow similar rules in their ability to assemble into multi-subunit protein complexes as well as the mechanisms that regulate receptor signaling [1].

Indeed, immune receptors are built off a disulfide-bonded extracellular architecture that form Immunoglobulin-like domains (Ig) conferring rigidity and resistance to proteolysis [2]. Moreover, modular immune receptors such as the T cell receptor (TCR), the B cell receptor (BCR) and several activating receptors expressed in NK cells do not directly signal from the ligand-interacting chains [3, 4]. Rather, they signal through dimeric accessory proteins that contain signaling motifs termed Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) comprised of the canonical amino acid sequence $YxxI/Lx_{(6-8)}YxxI/L$ [5]. Once ligand bound, ITAM-bearing immune receptors first aggregate to form clusters then are phosphorylated by kinases of the Src family, such as Lck, and then become docking sites for Src-homology domain 2 (SH2)-containing proteins part of the non-receptor kinase family (NRTK), such as ZAP70 in T cells [6]. NRTKs in turn phosphorylate downstream effectors to trigger several signaling routes that lead to the activation and translocation of key transcription factors such as Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT), Nuclear Factor kappa-light chain of activated B cells (NFκB) and activator protein 1 (AP-1) of that regulate cell fate and function [7, 8].

The convergence in signaling steps observed in immune receptors strongly suggest common mechanisms that govern receptor assembly, triggering and signal initiation. Here we present that electrostatic interactions, provided by oppositely charged partners such as amino acids, lipids or

ions play a critical role in all aspects of immune receptor functions. Indeed, in the last decade, several studies have provided compelling evidence that demonstrate the role of charge-charge interaction in regulating immune receptor assembly, triggering and signaling. We will present these findings according to the various aspects of immune receptor functions.

2. ELECTROSTATIC INTERACTION-DRIVEN IMMUNE RECEPTOR ASSEMBLY

Assembly of activating immune receptors has been the subject of several studies over the past decades and remains an ongoing endeavor. Many of these receptors share a distinctive molecular backbone whereby a variety of ligand-recognition scaffolds assemble with signaling modules in a non-covalent fashion. For many of these receptors, electrostatic interactions between key amino acids within their transmembrane (TM) domain dictate specific or promiscuous receptor assembly [4]. Whereas single amino acid driven electrostatic interactions are typically weak in terms of specificity and strength in solution, the unique environment provided by the hydrophobic nature of the inner lipid bilayer leads to strong and highly specific interactions where soluble ionic competitors are absent [9]. Accordingly, following Coulomb's Law, opposite charges separated by 4\AA interact with an energy of approximately 1kcal per mole in solution, while the same interaction in a hydrophobic environment results in a dramatic increase to 40kcal energy per mole leading to an interaction strength nearing that of biotin and streptavidin [9, 10]. This results in the highly stable and specific assembly of immune receptors with varying degrees of complexities.

2.1 The T cell receptor

The most studied, and perhaps the most complex of these receptors is the TCR. It is composed of a central heterodimer containing highly variable chains (α/β or γ/δ) that form the initial scaffold onto which three distinct dimeric CD3 accessory complexes (ϵ/δ , ϵ/γ , and $\zeta\zeta$) are non-covalently linked. The assembly of the individual dimers $\text{TCR}\alpha\beta$, $\text{CD3}\epsilon\delta$, $\text{CD3}\epsilon\gamma$ are dependent on interactions provided by their extracellular domain, while the assembly of the $\text{CD3}\zeta\zeta$ homodimers is primarily driven by the formation of a membrane proximal disulfide bond [11-13]. However, the complete assembly of the $\alpha\beta\text{TCR}$ within the endoplasmic reticulum is a highly organized event that requires the presence of charged amino acids within the TCR-CD3 TM domains suggesting that

electrostatic interactions were part of its assembly mechanism [14-17] (**Fig. 1**). The underlying molecular underpinnings of TCR assembly was later demonstrated with an *in vitro* protein translation approach using purified B cell microsomes. Indeed, Call *et al.*, showed that the assembly of the signaling dimers with the $\alpha\beta$ TCR core occurred in a preferential sequence ($\epsilon/\delta > \epsilon/\gamma > \zeta/\zeta$) resulting in intermediates that could be purified using non-denaturing sequential immunoprecipitation (IP) experiments using two differently tagged TCR components at a time [18-19]. Using this approach in combination with specific densitometric quantification of the components, the authors were also able to establish for the first time the stoichiometry of the fully assembled TCR, which had been a debate at the time [18, 20-22]. Much of the debate was centered on the observation a net charge imbalance within the TM domains of the fully assembled TCR. Indeed, while each of the α/β or γ/δ TCR TMs contained a net positive charge of +3 (+2 in α and δ , +1 in β and γ) the net charge of the CD3 accessory chains was of +6, which suggested that in order to balance the charges, 2 α/β or γ/δ TCR backbone was present in the final assembly. However, these assumptions are made based on observations that basic and acidic residues form pairwise interactions in aqueous solution. However, results provided by the Call *et al.* study clearly identified the requirement of two acidic residues to one basic residue correctly positioned within the TM domains of the TCR-CD3 components [19].

In addition, mutational analyses demonstrated that transmembrane electrostatic charges are the main driver of TCR assembly. The assembly of the TCR complex requires the interaction between basic residues in the transmembrane domain of TCR α and TCR β , and specific acidic residues within the transmembrane domain of each CD3 chain. Indeed, the association of the CD3 ϵ/δ heterodimer required the presence of their negatively charged aspartic acid (D) and a positively charged lysine (K) within the third helix of the TCR α chain, while the extracellular portion of TCR α was completely dispensable [18]. A lysine within the third helix in TCR β was required for the association of the CD3 ϵ/γ dimer through electrostatic interactions with the negatively charged aspartate and glutamate found within the TM domains of CD3 ϵ and γ respectively. Similarly, the CD3 ζ/ζ association with the TCR α was driven by electrostatic interaction between the arginine (R) within the second helix of TCR α -TM and the aspartates

residing in each of the CD3 ζ TMs. Recently, a study published by the Reinherz group reassessed the role of the basic residues residing in TCR α (R251, and K256). Their study posits that rather than enabling the assembly of the $\alpha\beta$ TCR-CD3, K256 was involved in regulating membrane depth of TCR α TM segment using both NMR and electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) approaches. Moreover, the $\alpha\beta$ TCR-CD3 TCR was expressed at normal levels when R251 and K256 were mutated to non-polar amino acid leucine (L) when compared to WT, although it no longer associated with the CD3 $\epsilon\delta$ heterodimer [23]. However, immunoprecipitation and cytokine secretion studies revealed severe defects in $\alpha\beta$ TCR-CD3 assembly and signaling when R251 and K256 were mutated individually or simultaneously corroborating previous studies in the requirement of fully assembled TCRs for efficient expression and functions [18, 24].

2.2 Antibody Fc Receptors

One aspect of the adaptive immune response is the ability to produce and secrete antigen-specific antibodies through the Th2 CD4+ T cell/B cell axis [25]. Although antigen cross-linking of IgM and IgG families of antibodies can by itself trigger the lysis of the target through the activation of the complement pathway, this does not necessarily lead to an enhancement of the adaptive cellular response. Fc receptors, termed in this manner for their ability to bind the crystallizable fragment (Fc) region of the antibody, form a bridge that link the humoral response to the cytotoxic cellular response [26]. Heterodimeric in nature containing both an alpha (α) and beta (β) chain, many of the Fc receptors contain ITAMs within their corresponding α chain. However, a subgroup of these receptors (namely Fc ϵ RI, Fc α RI, Fc γ RI and Fc γ RIII) assemble with ITAM-containing accessory proteins [27]. Interestingly, only Fc α RI is thought to assemble with Fc ϵ RI γ (herein termed FcR γ) through TM-driven electrostatic interactions due to the presence of charge residues within its TM domain (**Fig. 1**). It is important to note however, that the molecular requirements and steps leading to the assembly of the other FcRs are still poorly understood.

2.3 The Natural Killer cell receptors

Natural Killer (NK) cells express a myriad of activating and inhibitory receptors that dictate the functions of these innate effector cells. Four families of receptors, highly diverse in both structure

and arrangement, are known to assemble through electrostatic interaction between basic and acidic amino acids positioned within their TM domains in similar fashion as those described for the TCR [3]. What differentiates the NK cell receptors from the TCR in terms in the mechanisms of receptor assembly is the promiscuity by which some of these receptors pair with their accessory proteins (**Fig. 1**). While the $\alpha\beta$ TCR, and by extension $\gamma\delta$ TCR, strictly assembles with pre-determined pairs of CD3 ϵ/δ , CD3 ϵ/γ and CD3 ζ/ζ ; several NK cell receptors can either assemble with DAP10, or DAP12 as well as CD3 ζ or Fc γ R homodimers [28]. The NK cell activating receptors can be classified by at least 4 families: the NKG, KIR, Ly49 and NKp families of genes. While NKp members of this family are strictly activating receptors, the NKG, KIR, and Ly49 families contain both activating and inhibitory receptors.

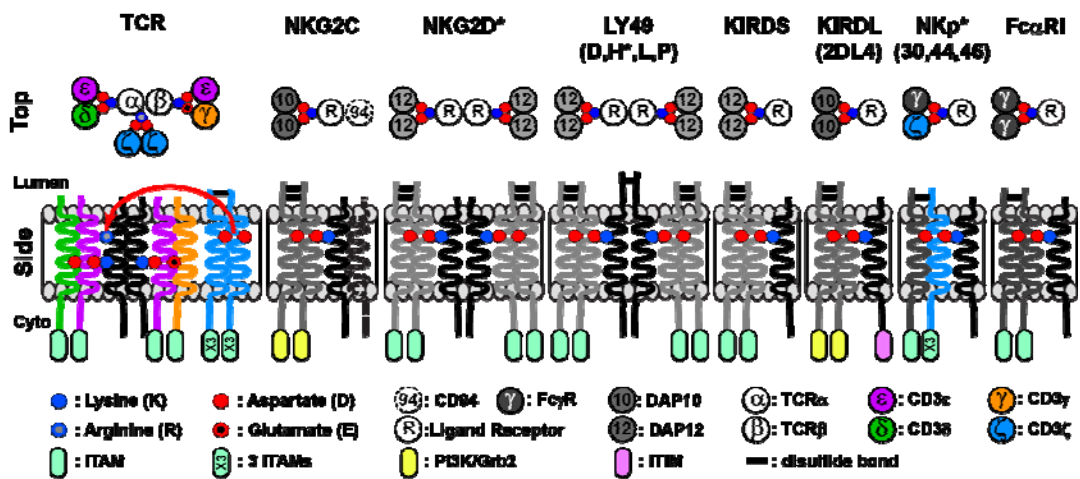


Figure 1. – Organization of modular immune receptors via electrostatic TM interactions.

Schematic representation of immune receptors described in section 2. The T cells receptors (TCR), NK cell receptors (NKG2C, NKG2D, LY49, KIRDS, KIRDL and NKp) as well as Fc receptors are presented. The putative organisation and position of electrostatic interactions within the TM are illustrated as top and side views. Basic residues are in blue, while acidic residues are in red. Asterisks denote the presented immune receptor can also assemble with other accessory protein other than the one depicted. In order to simplify the figure, ligand specific receptor chains, other than the TCR, are depicted as ligand receptor. The accessory signaling chains are also color-coded.

The NKG family of receptors are type II transmembrane proteins that contain a C-type lectin binding domain for ligand recognition and can be subdivided into two groups based on their requirement of accessory, chaperone-like protein CD94 (KLRD1). Inhibitory NKG2 receptors, A-B, do not contain acidic residues within their TM, while activating receptors NKG2C, E and F contain a lysine residue. While both groups require the association with CD94 for surface expression, NKG2C, E, and F also associate with DAP12 through electrostatic interactions provided by a lysine positioned within their TM domains. The activating receptor NKG2D differs from the latter in that does not associate with CD94, but rather forms homodimers [29]. In addition, it primarily associates with DAP10 driven by electrostatic interaction through its TM-located arginine and an aspartate residue within the DAP10 TM domain [30]. Interestingly, a truncated NKG2D expressed in activated NK cells has been shown to also associate with DAP12 [31]. Although not yet demonstrated, this could lead to the possibility that this isoform could potentially form hexameric receptors containing both DAP10 and DAP12, thereby providing more diverse signaling cues.

The Ly49 family of NK cell receptors (Ly49A-W) is a very diverse group of disulfide-linked homodimeric type-II transmembrane proteins expressed in murine NK cells containing both inhibitory and activating receptors [32]. While inhibitory receptors recognize MHC-I via their lectin-binding domains, activating receptors (Ly49D, H, L, and P) are capable of recognizing specific viral peptides [32, 34]. These receptors also associate with DAP12 through TM-driven electrostatic interactions [35]. Of these, Ly49H has also been shown to associate with DAP10, which may provide here again the formation of hexameric receptors containing both signaling routes [36].

The killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) form a diverse group of type-I inhibitory (KIRDL) and activating (KIRDS) which recognize members of the extended MHC-I family as ligands [37]. They are subdivided based on the number of extracellular Ig domains they contain (KIR2 or KIR3). All activating KIRDS receptors contain short cytoplasmic tails and assemble with signaling accessory DAP12 dimers through TM-driven electrostatic interactions, while all KIRDL receptors possess extended cytoplasmic chains that contain the canonical Immunotyrosine Inhibitory Motif

(ITIM) that recruit phosphatases such as SHP-1. The balance between activating and inhibitory receptors expressed by NK cells, has been suggested to be at the heart of their ability to discriminate targets [38]. Interestingly, it has been shown that KIR2DL4, an inhibitory receptor, can also assemble with FcR γ through its TM-located arginine, which ascribes its primary function as activating receptor [39].

The natural cytotoxic receptors (NKp30, NKp44, and NKp46) regroup receptors that were originally identified for their ability to engage cytotoxic functions of NK cells towards tumor cells *in vitro* [40-43]. However, these similarities end there as little to no sequence or structural similarities are identified other than their ability to associate with the non-canonical CD3 ζ /FcR γ heterodimer through TM-driven electrostatic interactions [44]. NKp receptors are somewhat promiscuous, as NKp30 has been shown to also associate with CD3 ζ / ζ homodimers, while NKp44 can associate with DAP12. Interestingly, similar to KIR2DL4 described above, NKp44 also contains an ITIM within its extended cytoplasmic domain. The NKp receptors recognize a wide variety of ligands spanning from self, bacterial and viral illustrating the diversity of signaling cues potentially provided following the type of receptor engaged by its ligand [43].

3. ELECTROSTATIC INTERACTION-DRIVEN LIPID BINDING.

Electrostatic and hydrophobic interactions are implicated in the membrane targeting and regulation of many proteins and receptors [45]. The membrane association of charged proteins is driven by the overall negative membrane charge of the cytosolic leaflet of the plasma membrane (PM) with a charge potential of -30mV [46]. This is mainly due to high concentrations of different species of acidic phospholipids, mainly phosphatidylserine (PS) and various species of phosphoinositides (PPI) are almost exclusively found on the cytosolic side of the PM. The cytoplasmic domains of many immune and non-immune receptors are enriched in basic residues, which provides an oppositely charged electrostatic potential capable of engaging anionic lipids of the inner leaflet of the plasma membrane.

3.1 Electrostatic potential of the plasma membrane.

The cytoplasmic leaflet of the plasma membrane (PM) possesses the most negative charge compared to other endomembranes as observed by preferential localization of polycationic probes [47, 48]. Maintenance of the plasma membrane negative charge is the result of exclusive maintenance of PS and phosphoinositides (PPI) on the cytosolic side of the PM [49]. With a net charge of (-1) at physiological pH, PS is by far the most abundant negatively charged phospholipid within the inner leaflet of the PM where it constitutes 20-30% of the phospholipids. PI(4,5)P₂ has a net charge of -4 at neutral pH and consists of approximately 0.5-3% of inner leaflet lipids, while PI(3,4,5)P₃ consists less than 1% but has a net charge of -6 [50]. Contrary to PS, PPI abundance and diversity is highly dynamic and changes according to cell type and state making it difficult to ascertain their impact of PM electrostatic potential [45, 51, 52].

Indeed, the balance between PPI species at the PM is a highly regulated process, which involves the intricate balance between lipid kinases and phosphatases (**Fig.2A**). Three separate classes of phosphoinositide-3-kinases regulate the phosphorylation of PtdIns and PPIs on the 3-position of the inositol ring to generate PI(3)P, PI(3,4)P₂, and PI(3,4,5)P₃ [53]. PI(3,4)P₂, and PI(3,4,5)P₃ are not found at the plasma membrane of resting cells and are produced by class I PI3K after stimulation. Generation of PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, and PI(3,4,5)P₃ create a molecular platform enabling the recruitment of cationic proteins at the PM through its charge, but also proteins that contain PPI-specific pleckstrin homology (PH) domains [52]. Electrostatically bound proteins to PPIs can be dislodged from the PM through charge competition from bivalent ions mobilized during activation and replaced by PH-containing proteins. Indeed, the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) is rich in polybasic residues and associates to acidic phospholipids at the PM such as PI(4,5)P₂, which can be released through calcium/calmodulin binding to its polybasic cluster following calcium influx, thus create charge repulsion between MARCKS and acidic phospholipids [54]. MARCKS release is followed by translocation of a fluorescent PH-PLC δ 1 reporter from the cytoplasm to the PM, indicating increase in free PI(4,5)P₂ at the PM. The phosphatase and tensin homolog (PTEN) and SH-containing inositol phosphatase 1 (SHIP1) counterbalances PI3K and PIPKI activation respectively by dephosphorylating PI(3,4,5)P₃ to generate PI(4,5)P₂ and then PI(4)P [55]. Finally, phospholipases C (PLCs) can

hydrolyze PI(4,5)P₂ to generate inositol 1,4,5, triphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG) which can in turn be used to generate phosphatidic acid (PA) through diacylglycerol kinases [52].

Contrastingly, PS concentrations within the PM is more constant and regulated via several mechanisms, and can found in other organelles such as the endoplasmic reticulum, the Golgi, mitochondria and endosomes [56]. Similar to PPI, PS abundance and its charge can be modulated by modification to its lipid headgroup through decarboxylation by the phosphatidylserine decarboxylase (PSD) to yield phosphatidylethanolamine (PE). In turn, PE can be used as precursor to directly replenish PS through phosphatidylserine synthase 1 (PSS1) activity or indirectly via PSS2, which requires prior conversion of PE to phosphatidylcholine (PC) through methyl transferase activity (PEMT) (**Fig.2B**) [57]. Unlike PPI however, PS density within the inner leaflet can also be regulated through its transient redistribution between both leaflets of the PM by scramblases (PSCR) and ATP-dependent aminophospholipid translocases (APLT) (**Fig.2C**) [58]. APLTs transport both PS and PE from the outer leaflet towards the inner PM leaflet. Scramblases, on the other hand, mediate bi-directional lipid transport between both leaflets of membranes in an ATP-independent, but calcium-dependent manner [58]. Following scramblase activation at the PM, PS and phosphatidylethanolamine are externalized, while phosphatidylcholine and sphingomyelin are internalized [58, 59]. Externalization of PS towards the outer PM leaflet is a rare but important event during blood coagulation by regulating clotting factor activation and is also involved in the recognition and uptake of apoptotic cells by macrophages [60].

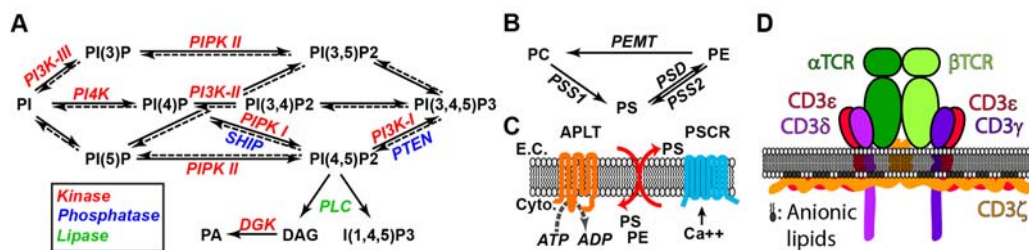


Figure 2. – Metabolism and dynamics of anionic lipids of the plasma membrane.

A) Schematic representation phosphoinositide diversity and regulation by lipid kinases, phosphatases and lipases. **B)** Schematic representation of phosphatidylserine (PS) metabolism in mammalian cells. **C)** Schematic representation of the regulation of PS distribution across inner

and outer plasma membrane leaflets in mammalian cells. **D)** The “Safety ON” model as proposed by Khuns *et al.*, which depicts the TCR with its CD3 ϵ and ζ chains dynamically associated with the anionic lipids of the inner leaflet of the plasma membrane, while CD3 δ and γ and solvent exposed in the cytoplasm.

The relative contribution of each of the acidic phospholipids as well as their role in regulating binding of cationic proteins has yet to be established. Inhibition of PI3K activity with wortmannin did not result in changes in membrane charge, while modulation of either PS, through APLT inhibition, or PI(4,5)P2 lead to significant reduction in PM electrostatic potential leading to the dissociation of cationic probes [47]. This suggests that PS and PI(4,5)P2 may be more important could be due to their higher abundance within the PM. However, it has been established that proteins containing polybasic domain bind to these lipids with affinities that correlate with charge (PI(3,4,5)P3 > PI(4,5)P2 > PS) probably due to stronger electrostatic interactions [61]. In addition, *in vitro* studies have shown that the CD3 ϵ cytoplasmic chains binds preferentially to monophosphorylated lipids such as PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, and PA when compared to more anionic lipids such as PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 [62]. Similarly, the CD3 ζ cytoplasmic chain was also shown to preferentially bind to PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, and PI(3,4)P2 *in vitro* [63]. How lipid identity, abundance and charge differentially regulate cationic protein binding dynamics in live cell has yet to be elucidated.

3.2 Electrostatic interactions drive TCR-CD3 chains binding to lipids.

The hypothesis that the TCR-CD3 chains dynamically associate with anionic lipids was first described in a study by the Stern group [64]. Using large unilamellar vesicles (LUVs) composed of either zwitterionic or anionic lipids, the study showed that the cytoplasmic tail of CD3 ζ (CD3 ζ_{CT}) preferentially bound to the latter. Membrane binding was primarily driven by basic amino acids rich sequences (BRS) interspaced between the three separate ITAMs. *In vitro*, the BRS region found between the first and second ITAM bound the most strongly to acidic phospholipids, and mutation of the basic residues within that BRS abrogated binding of CD3 ζ_{CT} to acidic phospholipid, indicating that it was the primary driver of lipid binding. Acidic lipid binding was also observed, albeit less strongly, for the third BRS found between the second and third ITAM. Finally, little to

no lipid binding was observed for the first BRS, which consists of the membrane-proximal basic residues of CD3 ζ _{CT}, and corroborated a previous study that showed little lipid binding for the first ITAM domain of CD3 ζ _{CT} [63, 65].

The initial study by the Stern group also demonstrated using circular dichroism, CD, that CD3 ζ _{CT} was primarily unstructured in solution and in presence of zwitterionic LUVs. However, CD3 ζ _{CT} adopted a partially folded alpha helical structure in presence of different species of acidic LUVs including a mix of phospholipids aimed at mimicking the environment of the cytosolic side of the PM [64]. In depth investigation using NMR suggested that the second and third CD3 ζ ITAMs adopted the partial alpha helical structure in presence of acidic lipid micelles, while the first ITAM remained unstructured, although the actual lipid-bound structures of the ITAMs were left unresolved [65]. Lipid-induced CD3 ζ _{CT} conformational change has come under scrutiny from studies looking into the nature of acidic phospholipid used (DMPG versus POPG) suggesting that although electrostatic interactions were still a requirement, only conformational “inducers” such as LMPG and DMPG, and not POPG, enabled CD3 ζ _{CT} conformational change [66]. How these lipids relate to biological phospholipids is not known, but point to the possibility that other components of the phospholipid, other than the acidic head group, may be involved in regulating immune receptor binding dynamics and function. Remarkably, lipid association to any acidic, but not zwitterionic, phospholipids prevented CD3 ζ _{CT} phosphorylation by a recombinant Scr kinase in an *in vitro* assay and was due to deep embedding of the side chains within the bilayer [64, 67]. This led the authors to postulate for the first time a model in which the phosphorylation of CD3 ζ chains of the TCR was prevented by sequestering the ITAM from kinases through electrostatic interaction-driven dynamic membrane binding.

Electrostatic interactions between CD3 ϵ _{CT} and anionic lipids *in vitro* was first described in a study also performed by the Stern group [68]. CD3 ϵ _{CT} has a net charge of +11 while CD3 ζ _{CT} has a net charge of +5 which leads to stronger binding anionic lipids [68]. On the other hand, both CD3 δ and CD3 γ do not possess a BRS and so fail to bind to anionic lipids *in vitro* [68]. Mutational analyses revealed that TM-proximal basic residues of CD3 ϵ _{CT} were the main driver behind lipid binding *in vitro* using microdialysis equilibrium [69]. Binding of CD3 ϵ _{CT} was also observed for LUVs containing

lipid mixtures that mimicked the composition of the inner leaflet of the PM [69]. Another study highlighted that the CD3 ϵ _{CT} BRS primarily bound to monophosphorylated phosphatidylinositides (PI(3)P, PI(4)P, and PI(5)P) and PA *in vitro* and was required for proper T cells development in the thymus [62]. Similar to CD3 ζ _{CT}, CD3 ϵ _{CT} association with anionic lipids (DMPG) induced partial conformational changes as observed by CD, as well as prevented phosphorylation by Lck [69]. Conformational changes were shown to be dependent on the interplay between basic and hydrophobic residues within the ITAM.

Interestingly, inhibition of CD3 ϵ _{CT} phosphorylation occurred even in the presence of non-conformational “inducer” anionic lipid POPG, suggesting that conformational change and ITAM sequestration could occur in these conditions. Confirmation of this came with NMR studies using bicelles containing a mix of POPG or POPE with DHPC, which demonstrated that indeed the cytoplasmic tail of CD3 ϵ adopts an alpha-helical conformation when associated to non-conformation “inducer” acidic phospholipid POPG with the peptide backbone residing within the hydrophobic/hydrophilic interface [69, 70]. This structure also highlighted that the two ITAM tyrosines, although dynamic, had their side chains deeply embedded within the lipid hydrophobic core, thereby validating the ITAM sequestration hypothesis [69].

A remaining question was whether lipid binding of the CD3 ϵ and CD3 ζ cytoplasmic tails occurred in live T cells. Membrane binding was studied through FRET experiments using a chimeric protein consisting of the KIR2DL3 extracellular and transmembrane domains, the cytoplasmic tail of CD3 ϵ and a C-terminal TFP tag (KIR-CD3 ϵ -TFP). FRET efficiency was determined between the KIR-CD3 ϵ -TFP molecule and the plasma membrane dye R18. To determine PM binding, the FRET efficiency of KIR-CD3 ϵ -TFP was compared to that of controls consisting of replacing the CD3 ϵ _{CT} with a short (3 a.a.) or intermediate (25 a.a.) or long (50 a.a.) flexible linker to mimic fully associated, partially associated or fully dissociated CD3 ϵ _{CT} respectively [69]. This approach confirmed that CD3 ϵ _{CT} was fully associated with the inner leaflet of the PM suggesting the ITAM may also be sequestered in cells, which was confirmed by lack of basal phosphorylation of the KIR-CD3 ϵ -TFP construct. Membrane association of CD3 ϵ _{CT} was abrogated when the BRS was mutated, confirming the importance of electrostatic interactions in driving membrane

binding [69, 71]. A similar approach was used to confirm CD3 ζ _{CT} plasma membrane binding through electrostatic interactions with anionic lipids although the contribution of each CD3 ζ BRS motifs was not assessed [72]. As expected, the cytoplasmic tails of CD3 δ and CD3 γ do not associate electrostatically to the PM due to their lack of BRS [73].

These findings refined our view of the resting state of the TCR with its CD3 ϵ and ζ chains dynamically associated with the inner leaflet of the plasma membrane, thereby sequestering the functional tyrosines within the ITAMs from kinases and providing protection from spontaneous phosphorylation [74]. This inhibitory state or conformation, termed the “Safety ON” conformation (**Fig. 2D**), provides an added layer of regulation to those previously described for CD45 and Lck [75]. However, a question remained pertaining to the state of CD3 δ and γ with their inability to bind the PM all the while retaining their non-phosphorylated state. This aspect will be discussed in section 5.

3.3 Membrane association of other immune receptors.

Similar to modular immune receptor assembly, many immune receptors that assemble with accessory signaling modules share similar molecular signatures within their cytoplasmic tails to those described for the CD3 ϵ and CD3 ζ . Indeed, several studies have shown that the cytoplasmic tails of mouse IgG B cell receptor (mIgG-BCR), Fc γ R, DAP10 and DAP12 contain polybasic regions that enable electrostatic interaction with anionic lipids [76].

The B cell receptor (BCR) is a hexameric protein complex composed of the prototypical antigen-recognizing core immunoglobulin, containing a pair of TM-anchored heavy chains that each associate with light chains through covalent disulfide coupling, which associates with the CD79a and CD79b signaling heterodimer [77, 78]. Naïve B cells typically express IgM and IgD BCRs and generate a low affinity antibody response upon antigen ligation. BCR triggering also leads to class-switching of the BCR to IgG, which allows the production of high titers of high affinity antibodies [79]. While the IgM cytoplasmic tail of the BCR is very short and is not implicated in BCR signaling, the mouse IgG-BCR cytoplasmic tail contains membrane-proximal basic residues and is highly hydrophobic, and recruits Grb2 when ligand-bound (**Fig.3**) [80, 81]. FRET studies have shown that the IgG cytoplasmic tail is associated to the plasma membrane in resting B cells through

electrostatic interactions provided by the membrane-proximal basic as well as hydrophobic residues [77, 82]. In quiescent B cells, IgG-BCR membrane microdomains are specifically enriched in PI(4,5)P₂, while PI(3,4,5)P₃, PS and PA are neither enriched nor depleted but may also provide charge for PM binding [82]. Similarly to the CD3 ϵ cytoplasmic tail, NMR studies have showed that the IgG tail adopts an alpha helical structure in presence of acidic phospholipids (POPG bicelles) leading to deep insertion of the immunoglobulin tail tyrosine (ITT) within the hydrophobic core pointing to a general feature of membrane association and mode of activation for ITAM and ITAM-like bearing receptors [77]. On the other hand, both CD79a and CD79b possess overall acidic cytoplasmic tails resulting in absence of PM binding in quiescent cells and sequestration of the ITAM tyrosines. How this feature relates to the lack of basal phosphorylation will be discussed in section 5.

The common Fc γ accessory signaling homodimer assembles with Fc α RI through electrostatic interactions, while the molecular underpinning driving its associations with other FcRs has yet to be determined [4]. Interestingly, the cytoplasmic tail of Fc γ shares molecular features with CD3 ϵ and contains a TM-proximal BRS as well as interspaced charged residues within the ITAM, and electrostatic interaction-driven lipid binding to anionic lipids was shown *in vitro* (**Fig.3**) [68]. Although PM-binding *in vivo* has yet to be shown, its similarities in molecular signature to CD3 ϵ , as well as an isoelectric point of its cytoplasmic tail similar to that of CD3 ζ , makes it highly likely that Fc γ is also dynamically bound to the inner leaflet of the PM through electrostatic interactions. Similarly, both DAP10 and DAP12 possess high isoelectric points and overall positive net charge, and are also very likely to associate with the PM through electrostatic interactions although has yet to be verified (**Fig.3**).

3.3 Membrane association of T cell co-receptors

In addition to modular immune receptors, many co-stimulatory receptors also share molecular features within their cytoplasmic tail to CD3 ϵ and CD3 ζ , which potentially mediate electrostatic interaction-driven binding to the inner leaflet of the PM. Indeed, FRET studies showed that the T cell co-stimulatory receptor CD28 interacts with acidic phospholipids at the PM through two clusters of basic residues in its cytoplasmic tail [83]. NMR studies showed that association of the

CD28 cytoplasmic tail to acidic phospholipids lead to deep insertion of its functional tyrosines inside the membrane hydrophobic core [84]. Mutational analysis of the CD28_{CT} BRS revealed that membrane association was directly correlated with the isoelectric point and position of the mutations, which was in line with previous findings linking isoelectric point and strength of interaction with anionic lipids [68]. Interestingly, mutation of the central BRS more strongly inhibited membrane binding than mutation of the membrane-proximal BRS suggesting that both BRS may act in concert in order to promote PM association of the CD28_{CT} in its entirety. Intriguingly, PM-dissociation of CD28_{CT} was not restricted to triggering of CD28 using CD80 tetramers, as engagement of TCR in the absence of CD28 engagement also resulted in the PM dissociation of CD28_{CT} pointing to a generalized change in the electrostatic strength of the PM following TCR engagement [83, 84]. Additionally, CD28 signaling leads to its co-localization with signaling TCRs within microclusters during immunological synapse formation [85, 86]. Indeed, upon initial IS formations, signaling CD28 and TCRs are found within the same microclusters as they migrate towards the center of the contact site. Intriguingly however, CD28 dissociates from TCR microclusters at the periphery of the central super molecular activation cluster (sSMAC). Co-localization of TCR and CD28 within the same microcluster upon initial signaling may point a shared mechanism of regulation for receptor signaling, which will be discussed in sections 4 and 5.

Intriguingly, the presence of cytoplasmic BRS is a signature found in other T cell co-receptors. Similar to CD28, these co-receptors accumulate at the cell-cell interface with many of them also co-localizing with TCRs within microclusters during immunological synapse formation [87-90]. Although membrane association of all of these receptors in T cells has not yet been shown, similarities of the molecular signatures of their cytoplasmic tails to CD3 ϵ and CD3 ζ point to the possibility that they are dynamically bound to the PM through electrostatic interactions. Inducible T cell co-stimulator (**ICOS**) is part of the CD28 superfamily expressed on T cells following activation, and it regulates T cell survival when interacting with ICOSL [87, 91]. Like CD28, with whom it shares many similar molecular features (**Fig.3**), it is involved in PI3K signaling [92]. Contrastingly, unlike CD28, it also binds to TBK1 through a TRAF-like motif involving the TM-proximal KKKY sequence [93]. However, the molecular mechanisms regulating TM-proximal

function of ICOS have yet to be identified [94]. **CD5** is a negative regulator of T cell signaling and contains an Immuno-Tyrosine Inhibitory Motif (ITIM) [88]. This motif is phosphorylated by src family kinases such as Lck and FYN which enables the recruitment of the phosphatase SHP-1 following receptor engagement with its ligand (CD72 and/or CD5). While the underlying mechanisms regulating the phosphorylation of CD5 are still unknown, its cytoplasmic molecular signature and BRS positioning share a striking resemblance to that of CD3 ϵ (**Fig.3**). **CD2** is a co-stimulatory adhesion molecule, which binds to CD58 expressed on APCs [95]. It has been shown to maintain elevated cytoplasmic calcium levels when engaged. Its interaction with the CD2 associated protein (CD2AP) is primarily regulated through its proline-rich SH3-binding domains. Interestingly, its electrostatic signature shares many molecular features with CD3 ζ in that it contains several BRS with its functional serines and threonines, as well as SH3 binding sites, spaced between them (**Fig.3**). **4-1BB** (CD137) is part of the tumor necrosis factors receptor super family (TNFR), with its expression induced following initial activation of naïve T cells. It is involved in dictating the effector and memory functions through the ligation of 4-1BBL, and initiates NF κ B, c-Jun and ATF2 transcriptional activity through TRAF1/2 recruitment [87, 90, 96, 97]. It is important to note that 4-1BB is unique in its CT signature in that its PM-proximal BRS is followed by a rigid stretch of amino acids before its acidic amino acid stretch. This could confer structural rigidity between the two charged domains, not enabling them to fold back onto one another (**Fig.3**). Interestingly, lysine 63 (K63), which sits within the BRS, is intimately linked with receptor signaling and internalization and is post-translationally modified by ubiquitination and regulates TRAF2 association [98]. Whether membrane association of the 4-1BB occurs in cells and how its BRS is linked to receptor activity has yet to be determined.

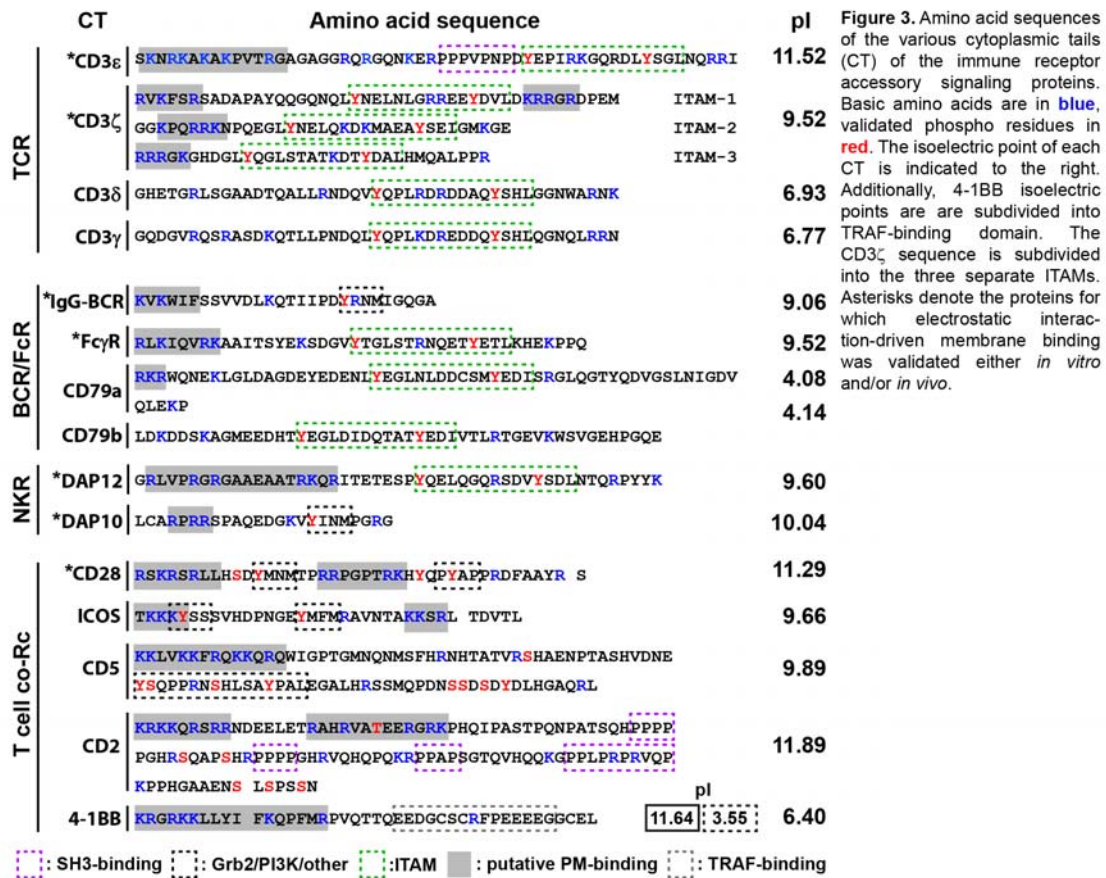


Figure 3. – Amino acid sequences of the various cytoplasmic tails of the immune receptor accessory signaling modules.

Basic amino acids are in blue, validated phospho residues in red. The isoelectric point of each CT is indicated to the right. Additionally, 4-1BB isoelectric point (pl) are subdivided into BRS (solid outlined box) and TRAF-binding (dotted outlined box) domain. The CD3 ζ sequence is subdivided into the three separate ITAMs. Asterisks denote the proteins for which electrostatic interaction-driven membrane binding was validated either *in vitro* and/or *in vivo*.

4. MODULATION OF ELECTROSTATIC INTERACTIONS IN IMMUNE RECEPTOR TRIGGERING.

Current assessment of the conformational state of the resting TCR posits that the CD3 ϵ and ζ chains are dynamically bound to the plasma membrane through electrostatic interactions enabling the sequestration of the ITAM from the kinase Lck by insertion of the functional tyrosines within the hydrophobic core of the PM (**Fig. 4**) [64, 69, 74]. Such a state requires a conformational change that results in the dissociation of the cytoplasmic tails of CD3 ϵ and ζ from the PM in order for Lck to gain access to the tyrosines within ITAM [70, 74, 76]. Interestingly, stimulation of thymocytes or peripheral T cells with pMHC induces the exposure of its proline rich sequence (PRS) domain at the synapse interface, indicative of conformational change and potential PM dissociation [99-101]. Conformational change of CD3 ϵ could be achieved through modulating the electrostatic interactions between the CD3-BRS and the anionic lipids part of the inner leaflet of the PM.

The development of novel imaging technologies such as artificial antigen-presenting lipid bilayers and total internal reflection (TIRF) microscopy enabled the visualization the immunological synapse with high spatial and temporal resolution, which had not yet been achieved in previous studies [102]. In addition, the development of novel fluorescent probes to monitor ion influx, membrane charge or specific subsets of phospholipids have enabled the advancements of several hypotheses in regards to the potential mechanisms by which the TCR-CD3 chains, and by extension all cytoplasmic domains that associate with lipids through electrostatic interactions, dissociate from the PM.

4.1 Differential lipid partitioning

Upon pMHC recognition, the TCRs aggregate to form clusters, which in turn recruit Lck in order to initiation signaling. TCR clustering occurs prior to signaling, as inhibition of Lck by PP2 did not inhibit TCR clustering *in vitro* [103]. Biochemical analyses of TCR signaling show that at resting state, the TCR resides within a cholesterol poor environment, but that it rapidly redistributed within cholesterol rich environment shortly after ligand recognition [104]. These results strengthen the idea that the efficiency by which TCR signaling occurred was through the repartitioning of the TCR within a lipid environment shown to contain high levels of CD4 and Lck,

which would promote phosphorylation. Microscopy analyses demonstrated that indeed the TCR partitioned within condensed lipid environment during immunological synapse formation using Laurdan, a lipid dye which monitors lipid phase transitions as well as alterations in membrane fluidity [105, 106].

Interestingly, it was shown that the membrane potential of the PM within newly-formed TCR microclusters was reduced when compared to membrane sections outside of microclusters [71]. Interestingly, an overall reduction in PM electrostatic potential was also observed throughout the entire synapse interface [46, 71]. With the use of a fluorescent probes which recognizes PS in a calcium independent manner (LactC2-RFP), the authors showed that PS levels were also reduced in TCR-containing microclusters suggesting its exclusion occurred through repartitioning of TCR microclusters within PS poor environment [47, 48, 71]. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments further showed that lateral diffusion of PS was reduced at the immunological synapse [71]. Reduction in the electrostatic potential and PS within microclusters coincide with the dissociation of the CD3 ϵ _{CT}, which did not require phosphorylation of the ITAMs as a mutant where the ITAM tyrosines were mutated to phenylalanines also dissociated from the PM at the synapse [71]. Similar to TCR clustering, PS exclusion was also shown to occur even if Lck activity was inhibited by PP2 indicating that lipid repartitioning, such as clustering, occurred upstream of TCR signaling. Although it is well established that TCR clustering upon pMHC recognition is at the core of signal initiation, whether TCR clustering enables repartitioning within PS poor lipid environment or vice-versa is not known (**Fig. 4**) [107]. Finally, it was suggested that clustering itself may potentially lead to the dissociation of the TCR-CD3 chain though either local crowding leading to mechanical dissociation, or through electrostatic charge imbalance cause by the local accumulation of the many BRS located in the TCR-CD3_{CT} [64].

4.2 Phosphoinositide turnover and dynamics.

Initial TCR engagement triggers a myriad of changes in phosphoinositide (PPI) abundance and diversity, which may affect PM electrostatic potential (**Fig.2**). Following TCR phosphorylation, PI3K-I is recruited to phosphorylated linker of activated T cells (LAT) and SH2 domain-containing

leukocyte protein of 76 kDa (SLP-76) complex and CD28 cytoplasmic tail through its SH2 domain [85, 108]. Activation of PI3K occurs through Ras, which is present at the PM through myristoylation and palmitoylation and activation by binding to DAG [109]. Activation of PI3K-I leads to the phosphorylation of PI(4,5)P2 into PI(3,4,5)P3. Imaging of the immunological synapse using fluorescent probes composed of the PH domains of Akt, PKB or RasGRP1, specific for PI(3,4,5)P3, indicated rapid and sustained accumulation of PI(3,4,5)P3 at the synapse interface [110-112]. With the use of planar lipid bilayers containing cognate pMHC and ICAM-1, work from the Huse lab showed PI(3,4,5)P accumulation at the synapse interface occurred primarily within the (pSMAC) through PI3K-IA [113]. Interestingly, although substantial accumulation of PI(3,4,5)P3 at the interface would ultimately result in an increase in electrostatic potential, several studies have shown a reduction [45, 46, 71].

Concomitantly to PI(3,4,5)P3 dynamics, imaging of PI(4,5)P2 dynamics using fluorescent probes composed of the PH domain of PLC δ (PH-PLC δ) showed low-level co-localization with TCR within microclusters shortly after initial synapse formation on a planar lipid bilayer loaded with pMHC and ICAM-1 [71]. The presence of the PH-PLC δ probe during early immunological synapse formation contrasts with the observation that PI(4,5)P2 is hydrolyzed by PLC γ within seconds following TCR triggering, and suggests constant turnover of phosphoinositide species at the synapse [114]. Other studies have shown transient PI(4,5)P2 accumulation at the synapse shortly after initiation, but was progressively lost during synapse maturation leading to full depletion at the cSMAC within minutes after T cell-APC contact [115-117]. PI(4,5)P2 turnover was faster at the cSMAC compared to the pSMAC which has been shown to enable actin recruitment to the PM through ERM proteins [116].

The interplay between acidic phospholipids and the electrostatic membrane potential at the synapse has also been confirmed through dissociation of the type I PI 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) from the PM [117]. PIP5K [450] catalyzes the phosphorylation of PI(4)P into PI(4,5)P2 and requires negative membrane charge for its recruitment at the PM through electrostatic interactions [118]. Reduction of the negative membrane charge through modulation of either PS or PI(4,5)P2 levels leads to dissociation of PIP5K from the PM [118]. It has been hypothesized that PI(4,5)P2 hydrolysis by PLC γ 1 would lead to a reduction in membrane charge at the synapse,

causing PIP5K dissociation and prevent PI(4,5)P2 replenishment. Reduction in PI(4,5)P2 at the cSMAC would prevent actin recruitment and thus allow proper recruitment and secretion of cytotoxic granule [117]. Finally, ectopic expression the PI(4,5)P2 phosphatase Inp54p at the PM reduced the inner leaflet electrostatic membrane potential and induced CD3 ϵ dissociation as well as increased CD3 ζ phosphorylation after pMHC engagement [46, 119].

4.3 Ion influx

TCR triggering induces a complex signaling cascade that leads to transcription factor translocation to the nucleus and gene transcription for cell fate decision. An important checkpoint of T cell activation is cytosolic ion influx. TCR stimulation leads to the phosphorylation of the ITAM domains of the TCR-CD3 chains by Src kinases such as Lck. Phosphorylated ITAMs recruit Zap-70 through its tandem SH2 domains. Zap-70 is activated by Lck, and will phosphorylate LAT and SLP-76 scaffold proteins. The LAT-SLP-76 complex recruits and activates PLC γ which hydrolyzes PI(4,5)P2 into IP3 and DAG. IP3 acts as a second messenger in the cytosol, binding the IP3 receptor at the ER leading to calcium release from ER stores. Additional second messengers are involved in increasing cytosolic calcium following T cell activation. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) and cyclic adenosine 5'-diphosphate-ribose (cADPR) bind to ryanodine receptors (RYRs) at the ER to cause calcium release in the cytoplasm. NAADP is produced early after TCR activation, and calcium release through RYR1 is thought to facilitate activation of IP3 receptor for further calcium release by the ER within seconds of activation [120-122]. In the minutes following activation, cADPR will bind RYRs for calcium release and is proposed to sustain calcium signaling in T cells [123].

Reduction in ER calcium concentration triggers extracellular calcium entry through calcium-release activated channels (CRAC). In T cells, Stromal interaction molecule 1 (STIM1) senses ER calcium depletion and translocate to the PM where it interacts with ORAI1 at ER-PM junctions and the synapse, and mediate store-operated calcium entry [124]. The cytosolic calcium concentration in resting T cells is maintained at 100nM, while extracellular calcium is around 2mM. Fast imaging studies of T cells activated with anti-CD3-coated beads or peptide pulsed APCs have shown that calcium microdomains are formed at the synapse within 1 second after T cell-

bead contact, while overall increase in cytosolic calcium was observed within seconds following synapse initiation [121, 124, 125].

Calcium influx through CRAC channels at the synapse increases the cytosolic calcium concentration tenfold where it is suggested to compete with the TCR-CD3_{CT} for electrostatic interactions with anionic lipids by neutralizing the charge of the phosphate groups of acidic phospholipids such as the phosphoinositides (**Fig. 4**) [126]. FRET studies have shown that treatment of cells with the calcium ionophore ionomycin induces the dissociation of the CD3 ϵ , CD28 and IgG-BCR cytoplasmic tails (**Fig.4**) [77, 84, 126]. These studies also provide NMR data that show that disruption of the interactions between the CD3 ϵ , CD28 or IgG-BCR chains and acidic phospholipid by calcium leads to changes in the alpha helical content of the ITAMs and functional tyrosines embedding within the hydrophobic core of the lipid bilayer. Interestingly, robust influx of strontium, an unrelated bivalent ion, also lead to dissociation of CD3 ϵ when treated with ionomycin suggesting that the positive charge of calcium, and not calcium specifically, was responsible for modulating the electrostatic potential of the PM and CD3 ϵ dissociation [126]. Moreover, calcium ions have also been shown to bind to different sites on PS: the phosphate, the carboxylate group and the lipid chain carbonyl group providing a molecular explanation how charge neutralization occurs, which ultimately reduces the PM inner leaflet membrane potential at the synapse [127]. Although the minimal concentration of calcium required for neutralization of membrane potential has yet to be determined, T cells activated in absence of extracellular calcium show reduced phosphorylation of the CD3 chains and TCR-proximal signaling molecules [84, 126]. However, because calcium is a well-described co-factor for kinase activity and protein folding, ascribing the impact of calcium depletion in T cell signaling exclusively to that of modulating PM electrostatic potential is strenuous. Finally, calcium rapidly diffuses from its initial entry site to the rest of the cytoplasm within seconds. Whether local entry of calcium at the synapse only transiently promotes charge neutralization or whether calcium binding to lipid has a long lasting effect has not been established [126].

4.4 Phosphatidylserine redistribution:

Disruption of PS asymmetry and redistribution to the outer leaflet of the PM has been observed in non-apoptotic B cells following BCR crosslinking [128]. In addition, PS is transiently exposed on the surface of live human CD8⁺ T cells after activation through inhibition of aminophospholipid translocase activity or through activation of scramblase activity [129]. The specific role of transient and non-apoptotic phosphatidylserine exposure following activation in B and T lymphocytes has not yet been fully understood. However, exposure of PS has been shown to stimulate L-selectin shedding and migration of T cells by modulating the sheddase activity of the Disintegrin and Metalloproteinase protein 17 (ADAM17) [130]. Regulation of ADAM17 function through surface PS exposure is thought to occur via a cluster of basic residues in its extracellular membrane-proximal domain shown to bind phosphatidylserine *in vitro*. Mutation of three basic residues in this cluster abrogates ADAM17 sheddase function [131]. In T and B cells, the main calcium-activated scramblase is TMEM16F, which is part of the TMEM16 family of calcium-gated chloride channels and/or calcium-activated phospholipid scramblases [132, 133]. TMEM16F has a dual function as a scramblase and ion channel [133]. Interestingly, B cells from Scott syndrome patients, which lack TMEM16F activity, showed reduced L-selectin shedding following treatment with a calcium ionophore [121]. Downregulation of TMEM16F expression in normal B cells also lead to a decrease in shedding of ADAM17 substrates following treatment with a calcium ionophore. Meanwhile, cells expressing a constitutively active form of TMEM16F showed increased basal ADAM17 shedding activity [134].

In T cells, TMEM16F activity has been shown to be involved in TCR signaling by promoting the formation of late endosomes for the termination of TCR signaling in a mouse knockout model [135]. Intriguingly, activation of *TMEM16F*^{-/-} T cell lead to an increase in ZAP-70 and LAT recruitment at the IS, and correlated with an increase in phosphorylation of TCR-proximal molecules following activation. Absence of TMEM16F in mice promoted T cell exhaustion after chronic infection with lymphocytic choriomeningitis virus [135]. However, how absence of TMEM16F affected PM electrostatic potential in this model was not assessed. Contrastingly, our work tends to indicate that TMEM16F is involved in regulating the electrostatic potential at the immunological synapse, thereby regulating bystander TCR-CD3 chain dissociation (*manuscript in revision*). In Jurkat and primary mouse T cells, absence of TMEM16F lead to a complete inhibition

of PS exposure following calcium influx via calcium ionophore treatment [59, 135]. Lack of TMEM16F also inhibited PM-dissociation of CD3 ϵ _{CT} following ionomycin treatment (*manuscript in revision*). Interestingly, similar to CD28, bystander CD3 ϵ present at the immunological synapse also dissociates from the PM following cognate TCR engagement suggesting again that the PM electrostatic potential at the synapse interface is reduced (**Fig. 4**) [126]. Absence of TMEM16F lead to the inhibition of bystander CD3 ϵ _{CT} PM dissociation at the synapse, which resulted in a decrease in T cell activation (*manuscript in revision*). This suggests that TMEM16F and PS redistribution at the synapse interface controls the electrostatic potential at the PM, thereby regulating the lipid association of the TCR-CD3 chains, and perhaps co-stimulatory proteins such as CD28. Interestingly, *in vitro* studies showed that in addition to calcium, murine TMEM16F channel activity is also triggered by strontium, but not magnesium ions [136]. Similarly, divalent cation selectivity is observed for fungal homologues of TMEM16 family scramblases, which also show scrambling activity in presence of strontium, albeit with a lower efficacy than calcium ions [137, 138]. These findings shed a new light on the possible mechanisms by which CRAC-dependent calcium influx regulate the electrostatic potential at the PM in T cells.

Presumably, calcium is unlikely to be involved in the dissociation of the initial pMHC-bound TCR as calcium influx is a distal event from initial TCR phosphorylation. It is more likely to play a role in signal amplification following the engagement of a few TCRs capable of generating enough of a signal to engage the activation of PLC γ to generate DAG and IP3. In this case, calcium influx would enable the dissociation of other TCRs present at the synapse interface but not engage to cognate pMHC and enable signal amplification through phosphorylation [45, 126]. However, there is also the possibility that calcium indirectly affects PM electrostatic potential by modulating the localization of acidic phospholipids such as PS. This is discussed hereafter.

Similarly, it is unlikely that TMEM16F-dependent PS redistribution contributes to dissociation of the initial pMHC-bound TCR as it requires calcium influx, which is downstream from TCR phosphorylation. However, it may nevertheless be involved in signal amplification by enabling the phosphorylation of bystander TCRs at the immunological synapse. Indeed several studies point to a crucial role of bystander TCR signaling (coagonism) in amplifying the activation signals provided by a few TCRs that recognize cognate pMHCs [139-141]. Other than the involvement of CD8, or

CD4, in enabling the phosphorylation of bystander TCRs, the molecular underpinnings of these events are still ill defined. However, engagement of TMEM16F function at the synapse following CRAC-dependent calcium influx would enable the dissociation of the bystander TCRs, which would in turn become phosphorylated by Lck recruited at the synapse through CD4 or CD8 in order to participate in T cell signaling (**Fig.4**).

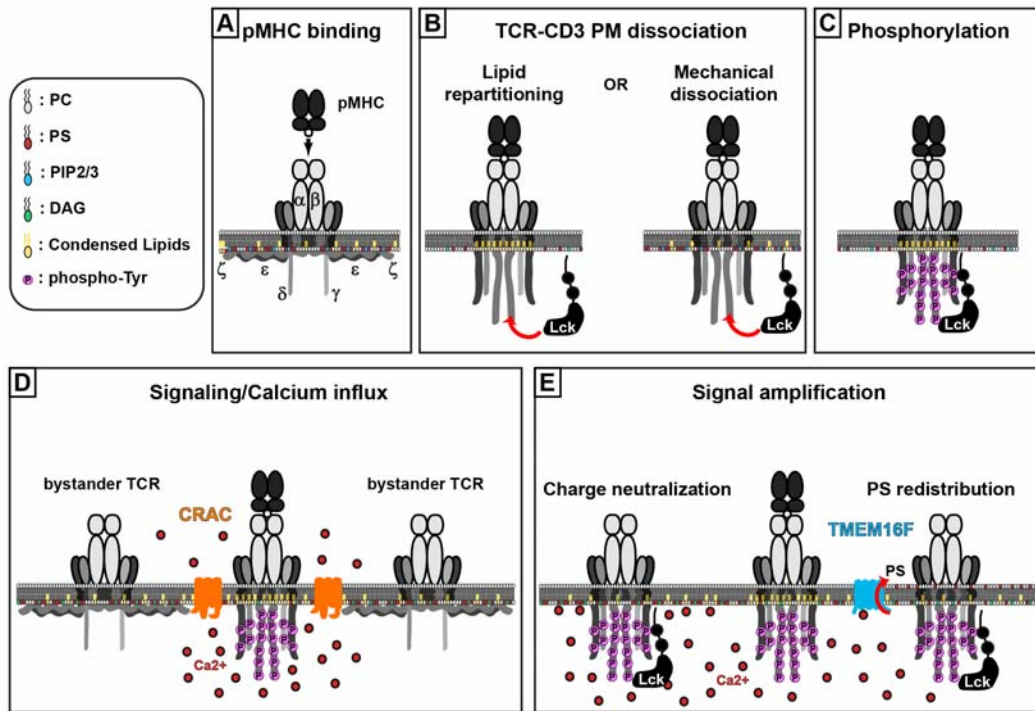


Figure 4. – Proposed mechanisms that regulate TCR triggering through modulation of electrostatic interactions.

A) Prior to engaging cognate pMHC, the resting state of the TCR has its CD3 ϵ and ζ chains dynamically associated with the PM through electrostatic interactions between positively charged amino acid rich sequences (BRS) with the cytoplasmic tails of CD3 ϵ and γ . CD3 δ and γ , which lack BRS, are solvent exposed in the cytoplasm but remain unphosphorylated. Binding of the TCR-CD3 chains to the PM is said to sequester the ITAMs from kinases such as Lck. **B)** Engagement of the TCR to cognate pMHC promotes the dissociation of the CD3 ϵ and ζ chains from the plasma membrane, thereby providing access of Lck to the ITAMs. Dissociation of the TCR-CD3 chains shown to occur through repartitioning of the TCR within lipid environments that

are poor in anionic lipids such as PS and PIP2, but are enriched in cholesterol and condensed lipids. Work with the BCR proposes that dissociation of the membrane bound cytoplasmic domain occurs through the propagation of mechanical force provided by antigen binding. **C)** Access of the CD3 ϵ and ζ ITAMS results in the efficient phosphorylation of the TCR-CD3 chains. **D)** Phosphorylation of the TCR initiates complex signaling axes resulting in the activation of the CRAC channels and extracellular calcium influx. **E)** Calcium influx is proposed to promote bystander TCR dissociation at the synapse interface through either direct electrostatic competition or by engaging the scramblase activity of TMEM16F, which redistributes PS to the outer leaflet of the PM and affects its electrostatic potential.

5. ELECTROSTATIC INTERACTION-DRIVEN IMMUNE RECEPTOR SIGNALING.

TCR-based signaling entails a highly complex but well-orchestrated series of events initiated and propagated by various kinases and adaptor proteins leading to the translocation of transcription factors that dictate T cell differentiation outcomes and/or effector functions [8]. Once TCR bound to cognate pMHC, Lck phosphorylates the TCR-CD3 ITAMs and enables the recruitment of ZAP70 via its tandem SH2 domains. Binding of ZAP70 to phosphorylated ITAMs leads to a conformational change in ZAP70 thereby enabling the phosphorylation of its activating tyrosines (Tyr315/319/493) by Lck [142]. In turn, phosphorylated ZAP70 phosphorylates LAT and SLP-76, which initiates signal amplification through various adaptor proteins [143]. While both Lck and ZAP70 are potent tyrosine kinases, Lck is incapable of phosphorylating LAT, and ZAP70 is unable to phosphorylate the TCR-CD3 ITAMs [144]. Interestingly, several studies have shown a link between substrate electrostatic potential and kinase specificity.

Indeed, a bacterial display study demonstrated that Lck targets were shown to be enriched in basic residues while ZAP-70 targets were enriched in acidic residues [144]. A similar approach was used to demonstrate that two closely related Src kinases, Lck and c-Src, show divergent substrate selectivity. While Lck favors substrates containing positively charged residues, c-Src favors negatively charged peptides, similarly to Zap-70 [145]. The electrostatic discrimination of Lck and

Zap-70 would allow for regulated sequential phosphorylation of targets following TCR triggering (Fig. 5).

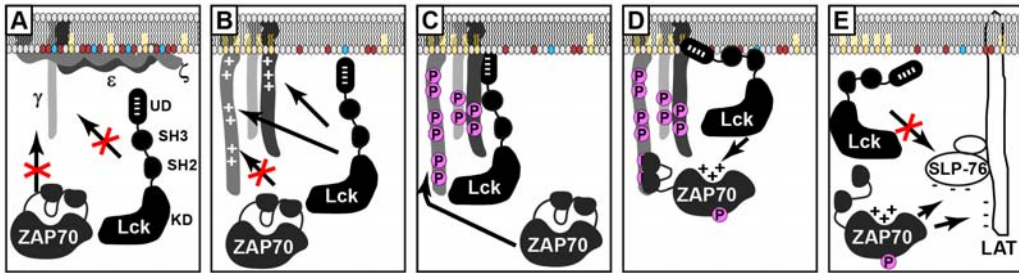


Figure 5. – Electrostatic interactions regulate immune receptor signaling.

Schematic representation of the initial signaling steps. In resting state, the TCR associated CD3 ϵ and ζ are dynamically associated to the plasma membrane through electrostatic interactions, while CD3 δ and γ and solvent exposed in the cytoplasm. However, the CD3 δ and γ chains remain unphosphorylated due to lack of a BRS, which prevents efficient Lck interactions and by the fact that ZAP70 is present in an inactive form. **B)** TCR binding to pMHC results in a conformational change in CD3 ϵ and ζ enabling PM dissociation. The preference of Lck to positively charged substrate recruits the kinase to the CD3 ϵ and ζ BRS. ZAP70 is unable to phosphorylate CD3 ϵ and ζ because it remains in an inhibited conformation. **C)** Recruited Lck phosphorylates the TCR-CD3 ITAMs, which in turn recruit ZAP70 through the binding of its tandem SH2 domains. **D)** Binding of ZAP70 to phosphorylated ITAMs causes a conformational change within its activation loop, which promotes its phosphorylation by Lck and becomes active. **E)** Active ZAP70 has a preference for acidic substrates and is thereby capable of propagating signaling beyond the TCR by phosphorylating the LAT-SLP76 platform which contain acidic patches of amino acids. Lck is unable to achieve this as its displays a preference for positively charged substrates. Electrostatic interaction preferences for Lck and ZAP70 regulate sequential phosphorylation of substrates downstream of the TCR.

5.1 Regulation of TCR signaling through Lck electrostatic interactions.

The current model for the resting TCR posits that the CD3 ζ and CD3 ϵ are electrostatically associated with the PM, thereby enabling the ITAM tyrosines to reside within the lipid bilayer, sequestered from Lck. The model also proposes that the chains must first dissociate from the PM prior to phosphorylation. This would not only render the ITAMs accessible to kinases, but also the BRS within the CD3 ϵ and ζ cytoplasmic chains [71, 76]. The role of the BRS in the regulation of TCR triggering was initially controversial due to experiments showing a lack of CD3 ϵ phosphorylation after TCR crosslinking in Jurkat cells when the BRS was mutated, and the ITAMs accessible to Lck known to be, in part, present in its activated state at the PM [146, 147]. In addition, the lack of phosphorylation of the CD3 δ and CD3 γ chains in resting T cells, which are not associated to the PM due to a lack of BRS motif, complicated our understanding of how electrostatic binding of CD3 ϵ and ζ to the PM through the BRS was involved in regulating TCR triggering and signaling [74, 146]. The finding that mutation of the six TM-proximal basic residues within the CD3 ϵ BRS to serines abrogated phosphorylation by Lck in vitro and in cells suggested a dual role for the BRS in regulating TCR signaling [75].

Using the CD3 $\epsilon^{-/-}$ mouse model, which show a block in thymocyte development, it was shown that re-introducing only the CD3 ϵ BRS in CD3 ϵ knockout mice was sufficient to restore the double negative (DN) to double positive transition, while mutation of the BRS in full-length CD3 ϵ_{CT} lead to several T cell developmental defects [148]. Contrastingly, a study by the vanOers group presented that mutation or truncation of the CD3 ϵ BRS did not significantly alter thymocyte differentiation frequencies, but lead to reduced thymic cellularity and surface TCR expression. Interestingly, displacing the BRS to the CD3 ϵ C-terminus lead to a developmental arrest at the DN stage [62]. Another study performed in a retrogenic mouse model reconstituted with CD3 ϵ BRS-mutant presented conflicting results. While CD3 ϵ BRS-mutant reconstituted mice displayed reduced thymic cellularity, the authors observed an increase in DN3 to DN4 transition with and DN4 cells displaying high levels TCR signaling activity as monitored by CD5 expression. However, when TCR signaling was assessed in peripheral T cells, the CD3 ϵ BRS-mutants displayed significant defects in TCR-proximal phosphorylation profiles, similar to what had been observed in previous

studies [62, 149]. The discrepancies in the defects observed in thymocytes and peripheral T cells may be explained by differences in the strength or the duration of TCR engagement in each setting as well as the added effects of co-stimulatory signals provided by cytokines within the environment [150, 151]. In addition, the presence of CD3 ζ , which also contains several BRS motifs, may compensate the lack of the CD3 ϵ BRS in some cases although this aspect has never been directly investigated.

The requirement of the CD3 ϵ BRS for Lck recruitment was confirmed through biolayer interferometry and NMR experiments [73]. The electrostatic recruitment of Lck to CD3 ϵ was shown to occur through the Lck Unique domain (Lck-UD), which bears an acidic-rich motif enabling the electrostatic association with the CD3 ϵ and CD3 ζ BRS through ionic interactions. Mutation of one of the Lck-UD acidic residues abrogated binding to the CD3 ϵ BRS and its phosphorylation, while kinase activity of Lck remained unaffected *in vitro*, as well as reduced Lck recruitment to the TCR at the immunological synapse [73]. Interestingly, biolayer interferometry experiments showed that Lck-UD associates more strongly to CD3 ϵ compared to CD3 ζ , and *in vitro* phosphorylation of CD3 ζ was slightly reduced when its BRS was mutated, indicating that the CD3 ζ BRS partially mediates Lck recruitment *in vitro*, but had deleterious effects in cells [73]. Contradicting results regarding the requirement of the BRS to promote efficient CD3 ζ phosphorylation may highlight a requirement for cellular context for Lck recruitment and phosphorylation of CD3 ζ through electrostatic interactions, but may be dispensable *in vitro*.

Consequently, electrostatic recruitment of Lck to the CD3 ϵ and CD3 ζ BRS during T cell activation and its preference for positively charge substrates may provide an explanation for the lack of basal phosphorylation of CD3 δ and CD3 γ in resting T cells. *In vitro* assays demonstrated that both CD3 δ and γ did not bind to Lck-UD, which resulted in poor phosphorylation by Lck [73]. Substitution of the TM-proximal domain of either CD3 δ and γ to that of CD3 ϵ rescued phosphorylation by Lck, confirming the role of electrostatic interactions promoting substrate recognition and/or kinase activity. Finally, this study also presented evidence that Lck became more efficient in phosphorylating both CD3 δ and γ when CD3 ϵ was within proximity suggesting that their phosphorylation required prior recruitment to CD3 ϵ in order to engage CD3 δ and γ

phosphorylation in trans. These findings present an intriguing model in which phosphorylation of CD3 δ and γ , which are poor substrates for Lck, require the presence of adjacent CD3 ϵ in order to recruit the kinase within proximity to engage in their phosphorylation. However, how these interactions occur in the more complex setting of the fully assembled TCR has yet to be determined, but provides a credible explanation for the lack of basal phosphorylation of CD3 δ and γ although their ITAMs are not sequestered from Lck.

5.2 Regulation of CD28 signaling through Lck electrostatic interactions.

Similarly, the CD28 BRS is required for Lck recruitment and phosphorylation, but requires the presence of CD28_{CT} dimers *in vitro* [83]. In addition, mutation of either the membrane-proximal or central BRS resulted in PM dissociation in cells, but lead to a significant reduction in Lck phosphorylation *in vitro* as well as *in vivo* providing additional arguments to the dual role of the BRS in regulating receptor signaling. Intriguingly, surface plasmon resonance (SPR) experiments showed that the kinase domain, rather than its UD domain of Lck, was required for binding to unphosphorylated CD28_{CT}. Following stimulation of by peptide-pulsed APCs, Lck binding to CD28 was significantly reduced in the BRS-mutants, but was unaffected when mutating the PYAP to PFAP, thereby inhibiting CD28 phosphorylation motif indicating that SH2 binding of Lck to phosphorylated CD28 was dispensable. These results further indicated that following ligand binding, CD28_{CT} dissociated from the PM in a phosphorylation independent fashion thus allowing Lck recruitment to the BRS motifs. Reduced Lck binding to CD28 through mutation of BRS abrogated PCK θ recruitment to the CD28-Lck complex and resulted in a significant impairment in the generation of thymic and peripheral CD25⁺/FoxP3 Tregs in a bone marrow transplant experiment [83].

5.3 Electrostatic regulation of IgG-BCR signaling

Naïve B cells that express the IgM-BCR respond more slowly to antigen while isotype-switched memory B cell that are responsible for fast recall response after antigen re-exposure [152, 153]. Memory B cells that express the IgG-BCR require much weaker mechanical force provided though antigen binding in order to initiate signaling when compared to IgM-BCR expressing naive B cells. The low mechanical force threshold of IgG-BCR is dependent on its cytoplasmic tail, as switching

the IgG cytoplasmic tail to the IgM molecule reduced the force threshold of IgM-BCR for activation [154]. As mentioned earlier, the IgG-BCR is membrane associated in resting memory B cells through electrostatic interactions, and has been implicated in restraining BCR signaling after stimulation [77]. Membrane association of the BCR IgG tail and sequestering of the Y21 tyrosine acts as safety mechanism to control receptor phosphorylation, as expression of a solvent-exposed IgG tail by insertion of a linker between the transmembrane and cytoplasmic domain caused increased BCR-proximal phosphorylation and calcium mobilization following receptor cross-linking in B cell lines. Consequently, expression of the solvent-exposed IgG tail lead to hyper proliferation after activation in primary B cells [77].

Additional studies have provided evidence that the IgG-BCR cytoplasmic tail basic residues, but not the hydrophobic residues, are required for the low mechanical force threshold of the IgG-BCR. The basic residues in the IgG tail interact with PI(4,5)P2 at the PM, and abrogation of this interaction through mutation of the basic residues lead to dissociation of from the PM, albeit without evident spontaneous signaling [77]. Basic residue mutations also reduced the enrichment between PI(4,5)P2 and the IgG-BCR microdomains and reduction of PI(4,5)P2 at the PM through enzymatic manipulation confirmed that the interaction between the IgG-BCR_{CT} and PI(4,5)P2 is required for the low mechanical force threshold observed for the activation of the IgG-BCR [82]. The lower sensitivity of IgG isotype-switched memory B cells to force due to electrostatic interactions between IgG basic residues and PI(4,5)P2 reveals how memory B cells show fast antigen recall responses. However, these studies did not investigate the role of the electrostatic interactions that regulate kinase recruitment to and/or phosphorylation of both the IgG-BCR and CD97a/b accessory signaling heterodimer [77, 82].

6. CONCLUDING REMARKS

Modular immune receptors represent an exquisitely diverse array of components that highlight the various evolutionary changes that occurred in the immune system to adapt to the continuously changing landscape of potential infectious threats. Perhaps in order to optimize energy spent assembly such receptors, evolution has devised simple yet effective mechanisms to

specifically enable specific and high affinity association between the different immune receptor modules by way of positioning charged residues at precise locations within the TM domains, thereby promoting electrostatic interaction-driven assembly. Other commonalities in immune receptor signaling such as receptor aggregation following ligand recognition and the nature of receptor proximal kinases suggest common regulatory mechanisms in controlling receptor triggering and signaling. Several immune receptors assemble with accessory signaling dimeric modules that contain polybasic stretches with dual functions. First, they restrict access to kinases at the resting state by engaging the plasma membrane through electrostatic interactions, thereby sequestering kinase specific moieties such as tyrosines, but dissociate once the receptor is bound to ligand and promote the recruitment of the signal initializing kinases, such as Lck, also through charge-charge interactions. The propensity for different kinases to engage and phosphorylate substrate based on charge preferences represents a simple yet effective way to ensure sequential phosphorylation events.

The demonstration that other receptors such as CD28, which do not assemble as modular receptors but share many features with immune receptors such as cytoplasmic chain constitution, receptor clustering and kinase preference allows us to extend our observations on the critical role of electrostatic interactions in regulating the immune response as a whole. There are still many unanswered questions pertaining to the underlying mechanisms of immune receptor assembly and signaling for those receptors that do not share in the molecular features described here, but signal through similar fashion. The observation that polybasic stretches enable the recruitment of kinases that promote the phosphorylation of neighboring signaling receptors that do not contain such electrostatic features may provide an additional avenue of research in understanding the complexity of immune receptor triggering and signal initiation.

ACKNOWLEDGMENTS:

This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR grant #MOP-313603), the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and the

Leukemia and Lymphoma Society of Canada (LLSC). EG is supported by the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS) Junior II stipend.

CONFLICT OF INTEREST:

The authors declare no conflict of interest.

References:

1. Call ME, Wucherpfennig KW. Common themes in the assembly and architecture of activating immune receptors. *Nature reviews Immunology*.2007;7:841-850.
2. Dwek RA, Sutton BJ, Perkins SJ, Rademacher TW. Structure-function relationships in immunoglobulins. *Biochem Soc Symp*.1984;49:123-136.
3. Feng J, Call ME, Wucherpfennig KW. The assembly of diverse immune receptors is focused on a polar membrane-embedded interaction site. *PLoS Biol*.2006;4:e142.
4. Berry R, Call ME. Modular Activating Receptors in Innate and Adaptive Immunity. *Biochemistry*.2017;56:1383-1402.
5. Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature*.1989;338:383-384.
6. Courtney AH, Lo WL, Weiss A. TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends in biochemical sciences*.2018;43:108-123.
7. Cho JH, Sprent J. TCR tuning of T cell subsets. *Immunological reviews*.2018;283:129-137.
8. Sundrud MS, Nolan MA. Synergistic and combinatorial control of T cell activation and differentiation by transcription factors. *Curr Opin Immunol*.2010;22:286-292.
9. Engelman DM. Electrostatic fasteners hold the T cell receptor-CD3 complex together. *Mol Cell*.2003;11:5-6.
10. Gilson MK, Honig BH. Energetics of charge-charge interactions in proteins. *Proteins*.1988;3:32-52.
11. Weissman AM, Samelson LE, Klausner RD. A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex. *Nature*.1986;324:480-482.

12. Sun ZJ, Kim KS, Wagner G, Reinherz EL. Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer. *Cell*.2001;105:913-923.
13. Sun ZY, Kim ST, Kim IC, Fahmy A, Reinherz EL, Wagner G. Solution structure of the CD3epsilon delta ectodomain and comparison with CD3epsilon gamma as a basis for modeling T cell receptor topology and signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.2004;101:16867-16872.
14. Alcover A, Mariuzza RA, Ermonval M, Acuto O. Lysine 271 in the transmembrane domain of the T-cell antigen receptor beta chain is necessary for its assembly with the CD3 complex but not for alpha/beta dimerization. *The Journal of biological chemistry*.1990;265:4131-4135.
15. Blumberg RS, et al. Assembly and function of the T cell antigen receptor. Requirement of either the lysine or arginine residues in the transmembrane region of the alpha chain. *The Journal of biological chemistry*.1990;265:14036-14043.
16. Cosson P, Lankford SP, Bonifacino JS, Klausner RD. Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature*.1991;351:414-416.
17. Manolios N, Bonifacino JS, Klausner RD. Transmembrane helical interactions and the assembly of the T cell receptor complex. *Science*.1990;249:274-277.
18. Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*.2002;111:967-979.
19. Call ME, Pyrdol J, Wucherpfennig KW. Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*.2004;23:2348-2357.
20. San Jose E, Sahuquillo AG, Bragado R, Alarcon B. Assembly of the TCR/CD3 complex: CD3 epsilon/delta and CD3 epsilon/gamma dimers associate indistinctly with both TCR alpha and TCR beta chains. Evidence for a double TCR heterodimer model. *Eur J Immunol*.1998;28:12-21.
21. Fernandez-Miguel G, et al. Multivalent structure of an alphabeta T cell receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.1999;96:1547-1552.

22. Thibault G, Bardos P. Compared TCR and CD3 epsilon expression on alpha beta and gamma delta T cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three CD3 epsilon chains in the TCR/CD3 complex. *Journal of immunology*.1995;154:3814-3820.
23. Brazin KN, et al. The T Cell Antigen Receptor alpha Transmembrane Domain Coordinates Triggering through Regulation of Bilayer Immersion and CD3 Subunit Associations. *Immunity*.2018;49:829-841 e826.
24. Sommers CL, et al. Function of CD3 epsilon-mediated signals in T cell development. *The Journal of experimental medicine*.2000;192:913-919.
25. Boom WH, Liano D, Abbas AK. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. II. Effects of interleukin 4- and interleukin 2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*.1988;167:1350-1363.
26. Mellman I, et al. Structure and function of Fc receptors on macrophages and lymphocytes. *J Cell Sci Suppl*.1988;9:45-65.
27. Daeron M. Fc receptor biology. *Annual review of immunology*.1997;15:203-234.
28. Feng J, Garrity D, Call ME, Moffett H, Wucherpfennig KW. Convergence on a distinctive assembly mechanism by unrelated families of activating immune receptors. *Immunity*.2005;22:427-438.
29. Bastidas-Legarda LY, Khakoo SI. Conserved and variable natural killer cell receptors: diverse approaches to viral infections. *Immunology*.2019;156:319-328.
30. Garrity D, Call ME, Feng J, Wucherpfennig KW. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.2005;102:7641-7646.
31. Rosen DB, Araki M, Hamerman JA, Chen T, Yamamura T, Lanier LL. A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. *Journal of immunology*.2004;173:2470-2478.
32. Berry R, Rossjohn J, Brooks AG. The Ly49 natural killer cell receptors: a versatile tool for viral self-discrimination. *Immunol Cell Biol*.2014;92:214-220.
33. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*.2002;296:1323-1326.

34. Brown MG, et al. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science*.2001;292:934-937.
35. Smith KM, Wu J, Bakker AB, Phillips JH, Lanier LL. Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *Journal of immunology*.1998;161:7-10.
36. Orr MT, et al. Ly49H signaling through DAP10 is essential for optimal natural killer cell responses to mouse cytomegalovirus infection. *The Journal of experimental medicine*.2009;206:807-817.
37. Moretta A, et al. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine*.1995;182:875-884.
38. Manser AR, Weinhold S, Uhrberg M. Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunological reviews*.2015;267:178-196.
39. Kikuchi-Maki A, Catina TL, Campbell KS. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *Journal of immunology*.2005;174:3859-3863.
40. Pende D, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine*.1999;190:1505-1516.
41. Sivori S, et al. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol*.1999;29:1656-1666.
42. Cantoni C, et al. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *The Journal of experimental medicine*.1999;189:787-796.
43. Hecht ML, et al. Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J Proteome Res*.2009;8:712-720.
44. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J*.2004;23:255-259.

45. Ma Y, Poole K, Goyette J, Gaus K. Introducing Membrane Charge and Membrane Potential to T Cell Signaling. *Frontiers in immunology*.2017;8:1513.
46. Ma Y, et al. A FRET sensor enables quantitative measurements of membrane charges in live cells. *Nat Biotechnol*.2017;35:363-370.
47. Yeung T, et al. Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. *Science*.2006;313:347-351.
48. Yeung T, Gilbert GE, Shi J, Silvius J, Kapus A, Grinstein S. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*.2008;319:210-213.
49. Fadeel B, Xue D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*.2009;44:264-277.
50. Milne S, Ivanova P, Forrester J, Alex Brown H. Lipidomics: an analysis of cellular lipids by ESI-MS. *Methods*.2006;39:92-103.
51. Forrester JS, Milne SB, Ivanova PT, Brown HA. Computational lipidomics: a multiplexed analysis of dynamic changes in membrane lipid composition during signal transduction. *Mol Pharmacol*.2004;65:813-821.
52. Schink KO, Tan KW, Stenmark H. Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*.2016;32:143-171.
53. Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr Opin Immunol*.2004;16:314-320.
54. McLaughlin S, Murray D. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*.2005;438:605-611.
55. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry*.1998;273:13375-13378.
56. Fairn GD, et al. High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. *J Cell Biol*.2011;194:257-275.
57. Vance JE, Steenbergen R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res*.2005;44:207-234.
58. Williamson P. Phospholipid Scramblases. *Lipid Insights*.2015;8:41-44.

59. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*.2010;468:834-838.
60. Leventis PA, Grinstein S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys*.2010;39:407-427.
61. Heo WD, et al. PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science*.2006;314:1458-1461.
62. Deford-Watts LM, et al. The cytoplasmic tail of the T cell receptor CD3 epsilon subunit contains a phospholipid-binding motif that regulates T cell functions. *Journal of immunology*.2009;183:1055-1064.
63. DeFord-Watts LM, et al. The CD3 zeta subunit contains a phosphoinositide-binding motif that is required for the stable accumulation of TCR-CD3 complex at the immunological synapse. *Journal of immunology*.2011;186:6839-6847.
64. Aivazian D, Stern LJ. Phosphorylation of T cell receptor zeta is regulated by a lipid dependent folding transition. *Nat Struct Biol*.2000;7:1023-1026.
65. Duchardt E, Sigalov AB, Aivazian D, Stern LJ, Schwalbe H. Structure induction of the T-cell receptor zeta-chain upon lipid binding investigated by NMR spectroscopy. *Chembiochem*.2007;8:820-827.
66. Sigalov AB, Hendricks GM. Membrane binding mode of intrinsically disordered cytoplasmic domains of T cell receptor signaling subunits depends on lipid composition. *Biochemical and biophysical research communications*.2009;389:388-393.
67. Zimmermann K, et al. The cytosolic domain of T-cell receptor zeta associates with membranes in a dynamic equilibrium and deeply penetrates the bilayer. *The Journal of biological chemistry*.2017;292:17746-17759.
68. Sigalov AB, Aivazian DA, Uversky VN, Stern LJ. Lipid-binding activity of intrinsically unstructured cytoplasmic domains of multichain immune recognition receptor signaling subunits. *Biochemistry*.2006;45:15731-15739.
69. Xu CQ, et al. Regulation of T Cell Receptor Activation by Dynamic Membrane Binding of the CD3 epsilon Cytoplasmic Tyrosine-Based Motif. *Cell*.2008;135:702-713.

70. Wucherpfennig KW, Gagnon E, Call MJ, Huseby ES, Call ME. Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*2010;2:a005140.
71. Gagnon E, Schubert DA, Gordo S, Chu HH, Wucherpfennig KW. Local changes in lipid environment of TCR microclusters regulate membrane binding by the CD3epsilon cytoplasmic domain. *The Journal of experimental medicine.*2012;209:2423-2439.
72. Zhang H, Cordoba SP, Dushek O, van der Merwe PA. Basic residues in the T-cell receptor zeta cytoplasmic domain mediate membrane association and modulate signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*2011;108:19323-19328.
73. Li L, et al. Ionic CD3-Lck interaction regulates the initiation of T-cell receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*2017;114:E5891-E5899.
74. Kuhns MS, Davis MM. The Safety on the TCR Trigger. *Cell.*2008;135:594-596.
75. Gagnon E, et al. Response multilayered control of T cell receptor phosphorylation. *Cell.*2010;142:669-671.
76. Wu W, Yan C, Shi X, Li L, Liu W, Xu C. Lipid in T-cell receptor transmembrane signaling. *Prog Biophys Mol Biol.*2015;118:130-138.
77. Chen X, et al. Acidic phospholipids govern the enhanced activation of IgG-B cell receptor. *Nature communications.*2015;6:8552.
78. Brezski RJ, Monroe JG. B-cell receptor. *Adv Exp Med Biol.*2008;640:12-21.
79. Patel B, Banerjee R, Samanta M, Das S. Diversity of Immunoglobulin (Ig) Isotypes and the Role of Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) in Fish. *Mol Biotechnol.*2018;60:435-453.
80. Engels N, et al. Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nature immunology.*2009;10:1018-1025.
81. Engels N, et al. The immunoglobulin tail tyrosine motif upgrades memory-type BCRs by incorporating a Grb2-Btk signalling module. *Nature communications.*2014;5:5456.
82. Wan Z, et al. PI(4,5)P2 determines the threshold of mechanical force-induced B cell activation. *J Cell Biol.*2018;217:2565-2582.

83. Dobbins J, et al. Binding of the cytoplasmic domain of CD28 to the plasma membrane inhibits Lck recruitment and signaling. *Sci Signal*.2016;9:ra75.
84. Yang W, et al. Dynamic regulation of CD28 conformation and signaling by charged lipids and ions. *Nat Struct Mol Biol*.2017;24:1081-1092.
85. Yokosuka T, et al. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity*.2008;29:589-601.
86. Yokosuka T, Saito T. Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunological reviews*.2009;229:27-40.
87. Fos C, et al. ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *Journal of immunology*.2008;181:1969-1977.
88. Brossard C, Semichon M, Trautmann A, Bismuth G. CD5 inhibits signaling at the immunological synapse without impairing its formation. *Journal of immunology*.2003;170:4623-4629.
89. Kaizuka Y, Douglass AD, Vardhana S, Dustin ML, Vale RD. The coreceptor CD2 uses plasma membrane microdomains to transduce signals in T cells. *J Cell Biol*.2009;185:521-534.
90. Stephan MT, et al. T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nat Med*.2007;13:1440-1449.
91. Simpson TR, Quezada SA, Allison JP. Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS). *Curr Opin Immunol*.2010;22:326-332.
92. Chen H, et al. CD4 T cells require ICOS-mediated PI3K signaling to increase T-Bet expression in the setting of anti-CTLA-4 therapy. *Cancer Immunol Res*.2014;2:167-176.
93. Pedros C, et al. A TRAF-like motif of the inducible costimulator ICOS controls development of germinal center TFH cells via the kinase TBK1. *Nat Immunol*.2016;17:825-833.
94. Leconte J, Bagherzadeh Yazdchi S, Panneton V, Suh WK. Inducible costimulator (ICOS) potentiates TCR-induced calcium flux by augmenting PLCgamma1 activation and actin remodeling. *Mol Immunol*.2016;79:38-46.
95. Singleton K, et al. A large T cell invagination with CD2 enrichment resets receptor engagement in the immunological synapse. *J Immunol*.2006;177:4402-4413.

96. Wang C, Lin GH, McPherson AJ, Watts TH. Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunol Rev.*2009;229:192-215.
97. Sanchez-Paulete AR, et al. Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.*2016;46:513-522.
98. Martinez-Forero I, et al. T cell costimulation with anti-CD137 monoclonal antibodies is mediated by K63-polyubiquitin-dependent signals from endosomes. *Journal of immunology.*2013;190:6694-6706.
99. Gil D, Schamel WW, 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.*2002;109:901-912.
100. Gil D, Schrum AG, Alarcon B, Palmer E. T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes. *The Journal of experimental medicine.*2005;201:517-522.
101. Risueno RM, Gil D, Fernandez E, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood.*2005;106:601-608.
102. Dustin ML. Supported bilayers at the vanguard of immune cell activation studies. *J Struct Biol.*2009;168:152-160.
103. Campi G, Varma R, Dustin ML. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *The Journal of experimental medicine.*2005;202:1031-1036.
104. Horejsi V. The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunological reviews.*2003;191:148-164.
105. Gaus K, Chklovskaja E, Fazekas de St Groth B, Jessup W, Harder T. Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation. *J Cell Biol.*2005;171:121-131.
106. Anton OM, Andres-Delgado L, Reglero-Real N, Batista A, Alonso MA. MAL protein controls protein sorting at the supramolecular activation cluster of human T lymphocytes. *Journal of immunology.*2011;186:6345-6356.

107. Goyette J, Nieves DJ, Ma Y, Gaus K. How does T cell receptor clustering impact on signal transduction? *J Cell Sci.*2019;132.
108. Shim EK, Jung SH, Lee JR. Role of two adaptor molecules SLP-76 and LAT in the PI3K signaling pathway in activated T cells. *Journal of immunology.*2011;186:2926-2935.
109. Mor A, et al. The lymphocyte function-associated antigen-1 receptor costimulates plasma membrane Ras via phospholipase D2. *Nat Cell Biol.*2007;9:713-719.
110. Harriague J, Bismuth G. Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells. *Nature immunology.*2002;3:1090-1096.
111. Huppa JB, Gleimer M, Sumen C, Davis MM. Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nature immunology.*2003;4:749-755.
112. Costello PS, Gallagher M, Cantrell DA. Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nature immunology.*2002;3:1082-1089.
113. Le Floc'h A, et al. Annular PIP3 accumulation controls actin architecture and modulates cytotoxicity at the immunological synapse. *The Journal of experimental medicine.*2013;210:2721-2737.
114. Huse M, et al. Spatial and temporal dynamics of T cell receptor signaling with a photoactivatable agonist. *Immunity.*2007;27:76-88.
115. Singleton KL, et al. Spatiotemporal patterning during T cell activation is highly diverse. *Sci Signal.*2009;2:ra15.
116. Sun Y, Dandekar RD, Mao YS, Yin HL, Wulfig C. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate controls T cell activation by regulating T cell rigidity and organization. *PloS one.*2011;6:e27227.
117. Gawden-Bone CM, Frazer GL, Richard AC, Ma CY, Strege K, Griffiths GM. PIP5 Kinases Regulate Membrane Phosphoinositide and Actin Composition for Targeted Granule Secretion by Cytotoxic Lymphocytes. *Immunity.*2018;49:427-437 e424.
118. Fairn GD, et al. An electrostatic switch displaces phosphatidylinositol phosphate kinases from the membrane during phagocytosis. *J Cell Biol.*2009;187:701-714.
119. Chouaki-Benmansour N, et al. Phosphoinositides regulate the TCR/CD3 complex membrane dynamics and activation. *Sci Rep.*2018;8:4966.

120. Gasser A, Bruhn S, Guse AH. Second messenger function of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate revealed by an improved enzymatic cycling assay. *The Journal of biological chemistry*.2006;281:16906-16913.
121. Wolf IM, et al. Frontrunners of T cell activation: Initial, localized Ca²⁺ signals mediated by NAADP and the type 1 ryanodine receptor. *Sci Signal*.2015;8:ra102.
122. Trebak M, Kinet JP. Calcium signalling in T cells. *Nature reviews Immunology*.2019;19:154-169.
123. Guse AH, et al. Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature*.1999;398:70-73.
124. Lioudyno MI, et al. Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.2008;105:2011-2016.
125. Diercks BP, et al. ORAI1, STIM1/2, and RYR1 shape subsecond Ca(2+) microdomains upon T cell activation. *Sci Signal*.2018;11.
126. Shi X, et al. Ca²⁺ regulates T-cell receptor activation by modulating the charge property of lipids. *Nature*.2013;493:111-115.
127. Melcrova A, et al. The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers. *Sci Rep*.2016;6:38035.
128. Dillon SR, Mancini M, Rosen A, Schlissel MS. Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation. *Journal of immunology*.2000;164:1322-1332.
129. Fischer K, Voelkl S, Berger J, Andreesen R, Pomorski T, Mackensen A. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8⁺ T cells. *Blood*.2006;108:4094-4101.
130. Elliott JJ, et al. Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol*.2005;7:808-816.
131. Sommer A, et al. Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nature communications*.2016;7:11523.

132. Pedemonte N, Galletta LJ. Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiol Rev.*2014;94:419-459.
133. Yu K, Whitlock JM, Lee K, Ortlund EA, Cui YY, Hartzell HC. Identification of a lipid scrambling domain in ANO6/TMEM16F. *Elife.*2015;4:e06901.
134. Veit M, et al. Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.*2018;1865:1598-1610.
135. Hu Y, et al. Scramblase TMEM16F terminates T cell receptor signaling to restrict T cell exhaustion. *The Journal of experimental medicine.*2016;213:2759-2772.
136. Yang H, et al. TMEM16F forms a Ca²⁺-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. *Cell.*2012;151:111-122.
137. Brunner JD, Lim NK, Schenck S, Duerst A, Dutzler R. X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature.*2014;516:207-212.
138. Malvezzi M, et al. Ca²⁺-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel. *Nature communications.*2013;4:2367.
139. Yachi PP, Ampudia J, Gascoigne NR, Zal T. Nonstimulatory peptides contribute to antigen-induced CD8-T cell receptor interaction at the immunological synapse. *Nature immunology.*2005;6:785-792.
140. Zhao X, et al. Nonstimulatory peptide-MHC enhances human T-cell antigen-specific responses by amplifying proximal TCR signaling. *Nature communications.*2018;9:2716.
141. Krogsgaard M, Li QJ, Sumen C, Huppa JB, Huse M, Davis MM. Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature.*2005;434:238-243.
142. Yan Q, et al. Structural basis for activation of ZAP-70 by phosphorylation of the SH2-kinase linker. *Mol Cell Biol.*2013;33:2188-2201.
143. Lo WL, et al. Lck promotes Zap70-dependent LAT phosphorylation by bridging Zap70 to LAT. *Nature immunology.*2018;19:733-741.
144. Shah NH, et al. An electrostatic selection mechanism controls sequential kinase signaling downstream of the T cell receptor. *Elife.*2016;5.
145. Shah NH, Lobel M, Weiss A, Kuriyan J. Fine-tuning of substrate preferences of the Src-family kinase Lck revealed through a high-throughput specificity screen. *Elife.*2018;7.

146. Fernandes RA, Yu C, Carmo AM, Evans EJ, van der Merwe PA, Davis SJ. What controls T cell receptor phosphorylation? *Cell*.2010;142:668-669.
147. Nika K, et al. Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity*.2010;32:766-777.
148. Brodeur JF, Li S, da Silva Martins M, Larose L, Dave VP. Critical and multiple roles for the CD3epsilon intracytoplasmic tail in double negative to double positive thymocyte differentiation. *Journal of immunology*.2009;182:4844-4853.
149. Bettini ML, et al. Membrane association of the CD3epsilon signaling domain is required for optimal T cell development and function. *Journal of immunology*.2014;193:258-267.
150. Hosokawa H, Rothenberg EV. Cytokines, Transcription Factors, and the Initiation of T-Cell Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.2018;10.
151. Gascoigne NR, Rybakin V, Acuto O, Brzostek J. TCR Signal Strength and T Cell Development. *Annu Rev Cell Dev Biol*.2016;32:327-348.
152. Jumaa H. Tuning B cell responsiveness by antigen receptor isotype. *Oncotarget*.2015;6:32311-32312.
153. Hobeika E, Maity PC, Jumaa H. Control of B Cell Responsiveness by Isotype and Structural Elements of the Antigen Receptor. *Trends in immunology*.2016;37:310-320.
154. Wan Z, et al. The activation of IgM- or isotype-switched IgG- and IgE-BCR exhibits distinct mechanical force sensitivity and threshold. *Elife*.2015;4.