

Université de Montréal

Rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation des lymphocytes T CD8

Par
Myriam Ennajimi

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de M. Sc. en
microbiologie et immunologie

Décembre 2020

© Myriam Ennajimi, 2020

Ce mémoire intitulé

Rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation des lymphocytes T CD8

Présenté par
Myriam Ennajimi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Nicolas Chomont
Président-rapporteur

Dr Nathalie Labrecque
Directeur de recherche

Dr Jean-François Gauchat
Membre du jury

Résumé

Au pic de la réponse effectrice des LT CD8, on retrouve deux sous-populations, soit les effecteurs à demi-vie courte (SLEC) ou les effecteurs précurseurs de cellules mémoires (MPEC). La phase de contraction de la réponse effectrice implique l'apoptose des SLEC et la survie des MPEC, qui se différencient en cellules mémoires pour protéger contre une réinfection. La voie Notch est impliquée dans les choix de différenciation binaire et l'interaction ligand-récepteur mène au clivage du domaine intracellulaire de Notch (NICD), qui migrera au noyau afin d'induire l'expression de gènes cibles. Dans un modèle où l'expression des récepteurs Notch1 et Notch2 est absente uniquement dans les LT CD8 (N1N2^{Δ/Δ}), le laboratoire a démontré que l'absence du signal Notch favorisait la différenciation en MPEC et affectait l'expression de 217 gènes. Cette étude visait à 1) identifier les gènes cibles de Notch contrôlant la différenciation SLEC-MPEC, et 2) évaluer si l'absence du signal Notch permet un meilleur contrôle tumoral par les LT CD8. Nous avons priorisé les 217 gènes en fonction de différents critères et identifié *Il2ra* comme une cible importante en aval de la voie Notch. Toutefois, nous avons établis que lors d'une infection aiguë, la surexpression rétrovirale de *Il2ra* dans les LT CD8 N1N2^{Δ/Δ} n'influçait pas la différenciation SLEC-MPEC. Nous avons également déterminé qu'une thérapie adoptive de LT CD8 N1N2^{Δ/Δ} limitait le contrôle de la croissance tumorale et impliquait une diminution des fonctions effectrices des LT CD8 N1N2^{Δ/Δ}, qui étaient moins terminalement différenciés. Une meilleure compréhension du rôle de Notch dans la réponse des LT CD8 permettra de développer de nouvelles stratégies de vaccination et de traitement du cancer.

Mots-clés : Lymphocyte T CD8, voie de signalisation Notch, différenciation cellulaire, cancer, infection aiguë.

Abstract

In response to acute infections, effector CD8 T cells differentiate into short-lived effector cells (SLECs) and memory precursor effector cells (MPECs) capable of generating long-lived memory CD8 T cells. The Notch signaling pathway is a key regulator of cell fate decision. Following ligand-receptor interaction, the Notch intracellular domain (NICD) is cleaved and migrates to the nucleus in order to induce the expression of target genes. In a model in which Notch1 and Notch2 expression is inhibited only in mature CD8 T cells, our team has established that Notch deficiency favors MPEC differentiation in CD8 T cells and influences the expression of 217 genes. This study aims to: 1) identify target genes of the Notch pathway regulating SLEC-MPEC differentiation, 2) evaluate if Notch deficiency can augment tumor control by CD8 T cells. We have prioritized the list of genes differentially expressed in the absence of Notch signaling according to various criteria. We hence identified *Il2ra* as a target gene, but during an acute infection, overexpression of *Il2ra* in Notch deficient CD8 T cell was insufficient to modulate SLEC-MPEC differentiation. In addition, we have established that adoptive therapy with Notch deficient CD8 T cell impaired tumor control and implicated a diminution of effector function in Notch deficient CD8 T cell, which were less terminally differentiated. A better understanding of Notch signaling pathway's role in the CD8 T cell response will allow for improvement of vaccinal strategies and cancer treatment.

Keywords : CD8 T cell, Notch signaling pathway, cell differentiation, cancer, acute infection

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et abréviations	ix
Remerciements	xv
Introduction	17
1. La réponse lymphocytaire CD8 suite à une infection aiguë.....	20
1.1 Phase d'activation.....	20
1.1.1 Signal 1 : TCR-CMH.....	20
1.1.2 Signal 2 : Costimulation	21
1.1.3 Signal 3 : Cytokines.....	21
1.1.3.1 IL-12 et IFN de type 1	21
1.1.3.2 IL-2	22
1.2 Phase d'expansion et de différenciation	23
1.2.1 Expansion des LT CD8.....	23
1.2.2 Différenciation SLEC-MPEC.....	23
1.2.2.1 Molécules impliquées dans la différenciation	24
1.2.2.1.1 Signaux inflammatoires	24
1.2.2.1.2 T-bet, Blimp1 et Bcl6	24
1.2.2.1.3 ID2 et ID3	25
1.2.2.1.4 TCF1 et EOMES	26
1.2.2.1.5 Zeb1 et Zeb2	26
1.2.2.1.6 Bach2 et NR4A3.....	26
1.2.2.1.7 CXCR3	27
1.2.2.2 Étude de la différenciation SLEC-MPEC chez l'humain	28
1.3 Phase de contraction	31
1.4 Phase mémoire.....	33
1.4.1 Sous-types de LT mémoires	34
1.4.1.1 Lymphocytes T circulants (Tcm et Tem)	34

1.4.1.1. Lymphocytes T résidents mémoires (Trm).....	35
1.4.1.1.2. Rétention des Trm dans les tissus.....	36
1.4.1.1.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la génération des Trm.....	38
1.4.1.1.4 Rôle des Trm dans la réponse antitumorale.....	39
2. La réponse lymphocytaire CD8 dans un contexte chronique	41
2.1 Épuisement lors d'une infection chronique	41
2.1 Les sous-populations de LT CD8 épuisés	42
2.2. Cancer.....	45
2.2.1 Mécanismes d'évasion immunitaire	46
2.2.2 Épuisement des LT CD8 en cancer	47
2.2.3 Infiltration des LT CD8 dans le TME	49
3. Voie de signalisation Notch.....	52
3.1 Mécanismes généraux de la voie Notch	52
3.2 Récepteurs et ligands de la voie Notch.....	52
3.3 Activation de la voie de signalisation Notch	54
7.4 Rôle de la voie de signalisation Notch dans le système immunitaire.....	55
3.4.1. Rôle de la voie de signalisation Notch dans les LT CD4	56
3.4.2. Rôle de la voie de signalisation Notch lors de la réponse CD8.....	57
3.4.2.1 Rôle de la voie Notch dans la réponse antitumorale des LT CD8.....	59
3.4.2.2. Rôle de la voie Notch dans la leucémie lymphoblastique aigüe	59
3.5 Signature génique associée à la voie de la signalisation Notch.....	60
Raisonnement et hypothèse	65
Matériel et méthode	67
1. Souris	68
2. Infection <i>Listeria</i> -OVA	68
3. Stimulation <i>in vitro</i> avec le peptide OVA ₂₅₇₋₂₆₄	69
4. Transfection pour la préparation de surnageant rétroviral.....	69
5. Transduction rétrovirale	70
6. Implantation tumorale.....	70
6.1 Production de LT effecteurs	71
6.2 Thérapie adoptive	71
6.3 Test de localisation	71
7. Isolation des cellules immunitaires pour marquage.....	72
7.1 Marquage	72

8. Analyses statistiques.....	73
Résultats.....	76
1.1 Identification de cibles transcriptionnelles en aval de la voie Notch	77
1.2 Surexpression de CD25 dans les LT CD8 sauvages ou déficients pour Notch1 et Notch2	83
2.1 Impact de la voie Notch dans une thérapie adoptive antitumorale.....	90
2.2 Caractérisation des lymphocytes lors d'une thérapie adoptive en l'absence du signal Notch	92
2.2.1 Infiltration et localisation des LT CD8 transférés adoptivement en l'absence du signal Notch	92
2.2.2 Fonctions effectrices et profil d'épuisement des LT CD8 transférés adoptivement en l'absence du signal Notch.....	99
Discussion.....	105
1. La voie de signalisation Notch dans la différenciation des LT CD8 en SLEC-MPEC ...	106
1.1 La surexpression de CD25 dans les LT CD8 est insuffisante pour rétablir la génération des SLEC	106
1.2 Perspectives sur les gènes cibles priorisés.....	108
2. Rôle de la voie de signalisation Notch dans une thérapie adoptive antitumorale	111
2.1 Différenciation des LT CD8 épuisés	113
Conclusion	115
Références bibliographiques.....	i

Liste des tableaux

Tableau 1. – Composition des milieux utilisés en culture cellulaire	74
Tableau 2. – Anticorps utilisés lors de la cytométrie en flux	75
Tableau 3. – Gènes différentiellement exprimés en l’absence du signal Notch et priorisés en fonction de trois signatures du signal Notch, soit dans les leucémies T-ALL, dans les LT CD4 et lors de l’activation	80

Liste des figures

Figure 1. – Les sous-populations de LT CD8 lors d’une infection aiguë.	19
Figure 2. – Expression différentielle de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation SLEC- MPEC aux différents stades de la réponse effectrice.....	29
Figure 3. – Molécules impliquées dans la différenciation SLEC-MPEC	30
Figure 4. – Phases de la réponse immunitaire des LT CD8 suite à une infection aiguë	32
Figure 5. – Les différents sous-types de LT CD8 mémoires	40
Figure 6. – Les sous-populations de LT CD8 épuisés identifiées par les équipes de Hudson <i>et al.</i> et Zander <i>et al.</i>	45
Figure 7. – Épuisement des LT CD8 dans le TME	51
Figure 8. – Schéma des récepteurs et ligands de la voie de signalisation Notch.	53
Figure 9. – Schéma de la voie de signalisation Notch.	55
Figure 10. – Résumé des trois critères de priorisation	64
Figure 11. – Priorisation des gènes de la signature génique en l’absence du signal Notch sur les LT CD8 tôt lors de la réponse à une infection aiguë	79
Figure 12. – Gènes différentiellement exprimés en l’absence du signal Notch et priorisés en fonction de leur correspondance avec différentes signatures	82
Figure 13. – Approche expérimentale de la transduction rétrovirale et validation <i>in vitro</i> de la surexpression de CD25 par les LT CD8	84
Figure 14. – La surexpression de CD25 ne permet pas de rétablir la génération de SLEC lors de la réponse des LT CD8 déficients pour Notch1 et Notch2	87
Figure 15. – Perte de la surexpression de CD25 chez les LT CD8 transduits avec pMig-CD25 au pic de la réponse aiguë.....	87
Figure 16. – La surexpression de CD25 n’est pas maintenue <i>in vivo</i> lors de la réponse des LT CD8 transférés suite à une infection aiguë	89
Figure 17. – Le signal Notch dans les LT est nécessaire lors d’une thérapie adoptive de LT CD8 pour contrôler la croissance tumorale dans le modèle B16-OVA	91
Figure 18. – La différence de croissance tumorale n’est pas causée par une différence d’infiltration des LT déficients pour Notch dans un modèle B16-OVA	93

Figure 19. – La différence de croissance tumorale n'est pas causée par une différence d'accumulation de LT CD8 Trm déficients pour Notch dans un modèle B16-OVA.....	95
Figure 20. – Suite au transfert adoptif, les LT CD8 déficients pour Notch s'accumulent dans la rate, mais pas dans les ganglions lymphatiques drainants la tumeur.....	96
Figure 21. – Accumulation de Trm dans le foie suite au transfert adoptif de LT CD8 déficients pour Notch dans un modèle B16-OVA	96
Figure 22. – Localisation des LT CD8 effecteurs suite au transfert adoptif dans le modèle B16-OVA	97
Figure 23. – La différence de croissance tumorale est associée à une diminution des fonctions effectrices des LT CD8 transférés déficients pour Notch.....	101
Figure 24. – Les TIL déficients pour Notch expriment plus fortement PD-1 et moins fortement Tim3 et CD39 que les TIL sauvages	101
Figure 25. – Les TIL déficients pour Notch sont moins terminalement différenciés que les TIL sauvages	103
Figure 26. – L'expression de PD-1 par les TIL corrèle avec la taille de la tumeur	104

Liste des sigles et abréviations

Δ/Δ : mutant, déficient pour Notch

-seq : *sequencing*, séquençage

α PD-1 : anticorps bloquants pour PD-1

μ L : microlitre

ψ : séquence d'encapsidation

ADAM : *A Disintegrin and Metalloproteinase*

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

AP-1 : *Activator protein 1*

ATAC-seq: *Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing*

B16-OVA : mélanome B16 exprimant l'antigène OVA

Bach2 : *Broad complex-tramtrack-bric à brac (BTB) And Cap'n'collar(CNC) Homology 2*

Bcl : *B-cell lymphoma*

BCR : Récepteur des cellules B

BFA : Bréfeldine A

BHI : Infusion coeur-cervelle

Blimp1 : *B-lymphocyte-induced maturation protein 1*

Ca²⁺: Calcium

CCL : *C-C chemokine ligand*

CCR : *C-C chemokine receptor*

CD : Clusters de différenciation

CDK8 : *Cyclin C/cyclin-dependant kinase*

CFSE : 5,6-carboxyfluorescein succinimidyl ester

Chip : co-immunoprécipitation de la chromatine

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CREB1 : *CAMP Responsive Element Binding Protein 1*

CTV : *Cell Trace Violet*

CTLA4 : *Cytotoxic T-lymphocyte-Associated protein 4*

CXCR : *CXC chemokine receptor*

DAG : Diacylglycérol
DC : Cellule dendritique/ *Dendritic cell*
DLL : Delta like
DN: Double négatif
DO : Densité optique
DP : Double positif
DSL : Delta, Serrate et Lag
Dtx1 : Deltex E3 Ubiquitin Ligase 1
EGF : Epidermal Growth Factor
EOMES : Eomesodermin
EVA1 : *Epithelial V-like Antigen 1*- protéin du gène *Mpzl2*
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting / Tri cellulaire induit par fluorescence
Fbxw7 : Domaine F-box & WD-40
fl/fl : floxé/floxé - type sauvage
GATA3 : *GATA binding protein 3*
g : gramme
GFP : Protéine Fluorescente verte - *Green Fluorescent Protein*
Gp : glycoprotéine
GrzmB : Granzyme B
GSK3 β : Glycogène synthase β kinase
GVH : Maladie du greffon contre l'hôte / *Graft-versus-host disease*
h : heure
HD :domaine d'hétérodimérisation
HDAC : Histone déacétylase
Id : *Inhibitor Of DNA Binding*
IEL: lymphocytes intraépithéliaux
IFN γ : Interféron gamma
IGS : Inhibiteur de la γ -sécrétase
IL- : Interleukine
IP₃ : inositol 1,4,5-triphosphate
i.v. : intraveineux

JAK-STAT : *Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription*

J : jour

KLRG1 : *Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*

Lag3 : *Lymphocyte-activation gene 3*

LB: Lymphocyte B

Lck : *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*

LCMV : Virus de la chorioméningite lymphocytaire

LCMV Arm : LCMV Armstrong

LCMV CI13: LCMV Clone 13

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

Listeria-OVA : *Listeria monocytogenes* exprimant OVA

LLC : *Lewis Lung Carcinoma* /Laure Le Corre

Lrig1 : *Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1*

Jag: Jagged

LT : Lymphocyte T

MAML: Mastermind-like

MARCKS : *Myristoylated Alanine Rich C-Kinase Substrate*

MDSC : *Myeloïd derived suppressor cells*

MFI : Intensité moyenne de fluorescence

mL : millilitre

MPEC : Effecteurs précurseurs de cellules mémoires -*Memory precursor effector cell*

Mpzl2 : *Myelin Protein Zero Like 2*

MZB : Lymphocyte B de la zone marginale

NFAT : *Nuclear factor of activated T-cells*

NF κ B : *Nuclear Factor κ B*

NICD: Domaine intracellulaire de Notch

NK : Cellule *Natural killer*

NLS : Signal de localisation nucléaire

NT : Non traité

NR4A3 : *Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 3*

NRR : Domaines de régulation négative riches en cystéine

OLS : Organe lymphoïde secondaire
OT-I : LT CD8 spécifiques au peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ par l'expression d'un TCR transgénique restreint au CMH de classe I H-2Kb
OVA : Ovalbumine
OVA₂₅₇₋₂₆₄ : peptide SIINFEKL de l'ovalbumine
PBS : *Phosphate buffered saline*
PD-1 : *Program death 1*
PD-L1 : *Program death ligand 1*
PEST : Domaine riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine
PIP₂ : Phosphatidylinositol (4,5)biphosphate
PKC: Protéine Kinase C
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate
pMig : Vecteur vide
pMig-CD25 : Vecteur codant pour le gène de l'*Il2ra*
Prdm1 : *PR domain zinc finger protein 1*
RAM : Domaine servant à la liaison avec RBPJκ
RBPJκ: Protéine de liaison du signal de recombinaison pour la région J de l'immunoglobuline kappa
RORC : *RAR-related orphan receptor C*
RPMI_c : RPMI complet
S1 : site 1
SHP-2 : Tyrosine phosphatase 2 contenant une région homologue Src-2
shRNA : Petit ARN en épingle à cheveux
SIP : Sphingosine 1-phosphate
SlamF6 : *Signaling lymphocytic activation molecule family 6*
SLEC : Effecteur à demi-vie courte / *Short lived effector cell*
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
TAD : Domaine de transactivation
T-ALL : Leucémie lymphoblastique aiguë
T-bet : *T-box expressed in T cells*
Tcm : Lymphocyte T centrale mémoire

TCR : Récepteur des cellules T

Tcf: *T cell factor*

Tem: Lymphocyte T effecteur mémoire

Tep : LT épuisé

Tep^{int} : LT épuisés intermédiaire TCF1-CD69-

Tep^{prog1} : LT progéniteur épuisé TCF1+CD69+

Tep^{prog2} : LT progéniteur circulant TCF1+CD69-

Tep^{term} : LT épuisé terminalement TCF1-CD69-

Tfh : T folliculaires *helper*

TGFβ : *Transforming Growth Factor beta*

Th: Lymphocyte T auxiliaire/ *T helper*

TIGIT : *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*

TIL : Lymphocyte T infiltrant la tumeur

Tim3 : *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*

TME : Microenvironnement tumoral

TNM : Tumeur, Nodule, Métastase

TNFα : *Tumor Necrosis Factor alpha*

Treg : LT CD4 régulateur

Trib2 : *Tribbles homolog 2*

Trm : Lymphocyte T résident mémoire

UFC : Unité formant des colonies

Zeb : *Zinc finger E-box binding homeobox*

Je suis devenue ce que je devais être.
Élie Yaffa

Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Nathalie Labrecque, pour tout son temps, son attention, ses corrections, sa patience et sa bienveillance. Surtout, je lui suis reconnaissante de m'avoir inculqué une rigueur scientifique et m'avoir appris à me méfier de moi-même. Je remercie les membres du jury pour avoir accepté de corriger mon mémoire.

À mes collègues de laboratoires, qui ont tous pris le temps de me former et qui m'ont appuyée tout au long de mon parcours. Les mots ne suffisent pas pour témoigner de toute la reconnaissance et l'amitié que j'ai envers eux et elles. Ces gens ont été pour moi comme une famille pendant les deux années de ma maîtrise. À Salix Boulet, toujours là pour répondre à une question et pour pousser la réflexion plus loin et pour sa présence apaisante. À Dave De Sousa, qui m'a fait rire quand je voulais pleurer. À Jean-François Daudelin, mon jumeau qui m'a appris la patience. À Livia Odagiu, la force tranquille du laboratoire qui avait toujours une parole juste, toujours disponible pour m'apporter une aide précieuse dans la réalisation de mes expériences et pour son accompagnement dans la partie cancer du projet. Et à Laure Le Corre, ma complice et ma confidente.

Je remercie évidemment ma famille pour tout leur appui. À Zohra, Elmekki, Youssef et Hajar, merci. Je tiens également à remercier mes ami.es pour leurs encouragements et leur support moral. En particulier, Philippe, pour son aide inestimable, il m'a aidé de la première figure à la pagination, Hubert pour sa solidarité et ma colocataire Roxo, qui m'a littéralement supportée à toutes les étapes du processus de rédaction.

Je vous aime tous beaucoup, merci.

Introduction

Le système immunitaire forme un réseau complexe en charge de défendre l'organisme contre les agents pathogènes. Il peut être catégorisé en fonction de sa spécificité au pathogène. Le système immunitaire inné est non spécifique et constitue la première ligne de défense pour limiter la progression d'une infection. La reconnaissance des patrons moléculaires associés aux pathogènes par les cellules du système inné, comme les neutrophiles ou les macrophages, permet d'initier rapidement la réponse immunitaire. Il y a ainsi production de différentes cytokines et l'induction de l'inflammation, ce qui permet le recrutement des cellules dendritiques (DC), représentant un pont entre le système inné et le système adaptatif. Ces cellules, capables de présentation antigénique, permettent la mise en place d'une réponse spécifique menant d'une part à l'élimination de l'agent infectieux, et d'autre part, à l'établissement d'une mémoire immunitaire protégeant l'organisme d'une réinfection. L'immunité adaptative implique deux types de réponses, soit la réponse humorale médiée par les lymphocytes B (LB) et la réponse cellulaire, médiée par les LT (LT) CD4 et CD8. Lors d'une infection aiguë, l'activation efficace des lymphocytes T (LT) naïfs requiert trois signaux; l'interaction du récepteur des cellules T (TCR) avec l'antigène présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les signaux de costimulation et les signaux cytokiniques. Suite à l'activation des LT, il s'ensuit une phase d'expansion massive impliquant une prolifération rapide des effecteurs et leur différenciation en deux sous-populations, soit les effecteurs à demi-vie courte (SLEC) ou les effecteurs précurseurs de cellules mémoires (MPEC). Le contrôle de l'infection et l'élimination de l'antigène coïncident avec une phase de contraction de la réponse CD8 impliquant la mort cellulaire programmée de 90% des cellules effectrices, soit les SLEC. Les MPEC survivent et se différencient en cellules mémoires, maintenues à long terme pour protéger contre une potentielle réinfection. Ces cellules mémoires peuvent être catégorisées en fonction de l'expression de marqueur de surface, leur fonctionnalité, leur localisation et leur capacité à recirculer. Les LT centrales mémoires (Tcm) sont capables de recirculer, mais sont localisées préférentiellement dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) alors que les LT effecteurs mémoires (Tem) patrouillent dans les organes non lymphoïdes et se retrouve aussi dans la circulation. Les LT résidents mémoires (Trm) ne sont pas capables de recirculer et sont restreints au tissu initialement infecté afin de générer une réponse rapide en cas de réinfection. Ces sous-populations de cellules mémoires jouent différents rôles garantissant à l'organisme une protection à long terme. Toutefois, il existe des lacunes dans les connaissances concernant les mécanismes moléculaires régulant la différenciation des LT CD8.

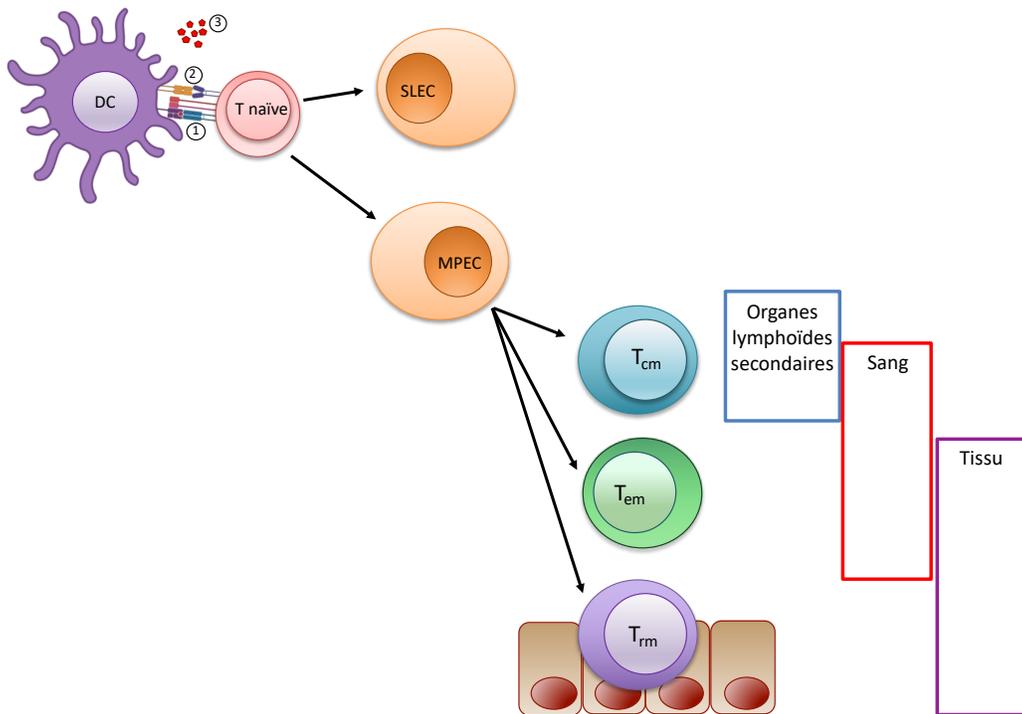


Figure 1. – Les sous-populations de LT CD8 lors d'une infection aiguë.

L'activation des LT CD8 requiert trois signaux : 1) l'interaction du TCR avec l'antigène présenté par le CMH ; 2) la costimulation et 3) les cytokines. Les LT CD8 activés vont se différencier en SLEC ou en MPEC afin de contrôler l'infection. Suite à l'élimination de l'antigène, les MPEC sont maintenues et peuvent se différencier en T_{cm}, T_{em} ou en T_{rm}. Les T_{cm} et les T_{em} ont accès à la circulation, tandis que les T_{rm} sont restreints au tissu.

1. La réponse lymphocytaire CD8 suite à une infection aiguë

1.1 Phase d'activation

1.1.1 Signal 1 : TCR-CMH

Lors d'une infection, des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les DC, présentent l'antigène aux LT naïfs situés dans les ganglions lymphatiques. L'antigène est présenté via le CMH de classe I aux LT CD8 alors que la présentation aux LT CD4 se fait via le CMH de classe II. Le LT CD8 reconnaît l'antigène de manière spécifique grâce au complexe TCR-CD3, composé du TCR $\alpha\beta$ et des sous-unités CD3 γ , δ et ζ . L'engagement du TCR avec le complexe CMH-Ag implique un changement de conformation des chaînes CD3 qui permet le recrutement de protéines tyrosine kinase comme Lck qui sera associé au co-récepteur CD8¹⁻³. Le co-récepteur CD8 vient stabiliser l'interaction^{4,5}. Ainsi, la phosphorylation par Lck des domaines ITAM situés sur la portion intracellulaire des chaînes CD3 permet le recrutement de la kinase Zap70 qui assure la phosphorylation de plusieurs cibles en aval^{6,7}. Une de ses cibles clés est la protéine adaptatrice LAT, dont les résidus tyrosines phosphorylées serviront de sites de liaisons entre autres au domaine SH2 de la phospholipase C1 (PLC γ 1)^{8,9}. PLC γ 1 est responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol (4,5)biphosphate (PIP₂) en inositol 1,4,5-triphosphate(IP₃) et en diacylglycérol (DAG). La liaison de IP₃ à son récepteur permet la libération du calcium (Ca²⁺) contenu dans le réticulum endoplasmique, ce qui permet l'influx extracellulaire de Ca²⁺ par des canaux membranaires^{10,11}. DAG demeure à la membrane et va activer la protéine kinase C (PKC) et la voie Ras¹²⁻¹⁵. La transmission du signal via ces seconds messagers mène ultimement à la translocation au noyau de différent facteur de transcription, tel que NF κ B, NFAT et AP-1¹⁶⁻¹⁹. Ceux-ci permettent la transcription de gènes responsable de l'activation, de la prolifération et de la différenciation des cellules T. Par exemple, NFAT et AP-1 lient tous deux la région promotrice du gène de l'IL-2 pour induire la transduction du gène, tandis que la liaison sans AP-1 induit l'anergie des LT CD8^{20,21}.

1.1.2 Signal 2 : Costimulation

Les signaux de costimulation fournis par les CPA sont essentiels à l'activation des LT CD8, sans quoi ceux-ci deviennent anergiques et ainsi inaptes à générer une réponse effectrice efficace. Un des signaux les mieux décrits est l'interaction de CD28 sur les LT avec ses ligands CD80 et CD86. Ces ligands sont induits sur les CPA par les signaux de danger générés lors d'une infection. L'activation de CD28 permet l'amplification du signal TCR, contribuant à la transcription des gènes impliqués dans l'activation des LT, tels que le gène de l'*IL2*²².

1.1.3 Signal 3 : Cytokines

L'activation optimale des LT CD8 requiert un troisième signal, soit la présence de cytokines. Toutefois, le milieu cytokinique influence non seulement l'activation, mais également la taille de la réponse ainsi que les événements de différenciation des LT CD8.

1.1.3.1 IL-12 et IFN de type 1

L'IL-12 et les IFN de type I, soit l'IFN α et β , sont deux cytokines pro-inflammatoires qui peuvent être produites par les DC et les macrophages. Ces cytokines optimisent l'expansion clonale en augmentant l'expression de gènes associés à la division cellulaire, ce qui promeut l'accumulation de LT CD8 lors de la réponse effectrice. En effet, ces cytokines permettent l'expression soutenue de CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2, une cytokine mitogène essentielle entre autres à la prolifération suite à l'activation²³. Toutefois, la réponse effectrice est modulée par le contexte inflammatoire spécifique à l'infection, c'est-à-dire les différentes cytokines induites par un pathogène donné. Ainsi, en fonction du modèle infectieux utilisé, l'expansion clonale des LT CD8 sera plutôt limitée par l'absence du récepteur aux IFN de type I, du récepteur à l'IL-12 ou de leur combinaison²⁴⁻²⁷.

1.1.3.2 IL-2

L'activation des LT par le signal TCR et les molécules de costimulation permet d'induire la production d'IL-2 et l'expression du récepteur à l'IL-2. La principale source d'IL-2 provient des LT CD4, mais dans une moindre mesure il peut également être produit par les LT CD8, les cellules NKT, les DC activées ainsi que les mastocytes²⁸. Le récepteur à l'IL-2 est présent sous trois formes, chacune présentant différents niveaux d'affinités pour l'IL-2. D'abord, la chaîne α (CD25) forme le récepteur monomérique IL-2R α , qui peut lier l'IL-2 avec une faible affinité et est incapable de transduire le signal. Ensuite, les chaînes β (CD122) et γ (CD132) peuvent former un dimère, l'IL-2R $\beta\gamma$, qui lie l'IL-2 avec une affinité intermédiaire et possèdent un domaine cytoplasmique capable de transduire le signal²⁹. Le récepteur hétérotrimérique IL-2R $\alpha\beta\gamma$ est formé lors de l'activation des LT et possède la plus haute affinité avec l'IL-2. La découverte de la structure cristalline du récepteur a mis en évidence un modèle selon lequel la liaison de l'IL-2 avec l'IL-2R α promeut l'association de ce complexe avec l'IL-2R β , puis le recrutement de la chaîne γ , permettant ainsi la transduction du signal^{30,31}. Celle-ci s'effectue via la voie JAK-STAT, menant ultimement à la translocation au noyau des formes phosphorylées de STAT5A-B afin d'induire la transcription de gènes cibles³². Suite à l'activation des LT CD8, l'expression de CD25 est induite par différents facteurs de transcription en aval du TCR et puisque STAT5 peut se lier dans la région du promoteur de CD25, la signalisation par l'IL-2 crée une boucle de rétroaction positive amplifiant encore plus l'expression de CD25³³. L'expression de CD25 est augmentée dans les 24h suivant l'activation, mais elle commence à diminuer au jour 3.5 (J3.5), donnant lieu à une expression bimodale du récepteur. L'expression de CD25 peut également être augmentée par une augmentation de la biodisponibilité de l'IL-2³⁴.

L'interaction de l'IL-2 avec son récepteur contribue significativement à l'expansion clonale et au développement des LT effecteurs. D'une part, l'usage de chimères hématopoïétiques mixte a démontré que suite à infection aiguë, l'expansion clonale des LT CD8 déficients pour CD25 était très réduite par rapport à l'expansion des LT CD8 sauvages et ce, autant au niveau de la réponse primaire que secondaire^{35,36}. D'autre part, l'utilisation d'un modèle *in vitro* où les LT CD8 activés étaient exposés soit à des niveaux faibles ou élevés d'IL-2 a permis de mettre en lumière que la quantité d'IL-2 présente dans l'environnement influence les fonctions effectrices. En effet, de hauts niveaux d'IL-2 favorisent l'expression de molécules effectrices comme la

perforine, via le facteur de transcription EOMES. Le niveau de liaison de pSTAT5 et EOMES au promoteur de la perforine est dicté par la quantité d'IL-2; plus la concentration d'IL-2 est faible, moins il y a de liaison³⁷. L'IL-2 peut influencer d'autres fonctions effectrices, en induisant l'expression de l'IFN γ ou en stimulant l'expression de la granzyme B (GrzmB)³⁷⁻⁴¹.

1.2 Phase d'expansion et de différenciation

1.2.1 Expansion des LT CD8

Selon certaines estimations, la souris contiendrait de 10 à 3000 précurseurs de LT CD8 naïfs spécifiques pour un épitope donné, tandis que chez l'humain, ce chiffre s'élève de 10 000 à 600 000⁴²⁻⁴⁵. Cela représente une fréquence allant jusqu'à un LT naïf spécifique pour 164 000 LT CD8, chez la souris comme chez l'humain⁴². Bien que la fréquence de précurseurs pour un antigène donné soit faible, les LT naïfs recirculent continuellement entre les différents OLS, ce qui augmente la probabilité pour ces LT de rencontrer une CPA présentant leur antigène spécifique. De plus, suite à leur activation, les LT CD8 spécifiques à un antigène donné vont effectuer de 15 à 20 divisions et ainsi s'expandre plus de 10 000 fois par rapport à leur abondance originelle⁴⁶⁻⁴⁸.

1.2.2 Différenciation SLEC-MPEC

En parallèle à l'expansion clonale des LT CD8, il y a également une phase de différenciation des LT naïfs en LT effecteurs. Suite à l'élimination de l'antigène, la majorité des LT CD8 spécifiques à l'antigène vont entrer en apoptose, mais une partie de ces effecteurs sera maintenue à long terme afin de se différencier en LT mémoire et protéger l'organisme d'une potentielle réinfection. Au début des années 2000, les chercheurs se questionnaient à savoir comment distinguer les cellules effectrices qui avaient le potentiel de se différencier en LT mémoire de celles qui entreraient en apoptose. Initialement, il a été déterminé que lors d'une infection et en l'absence du récepteur à l'IL-7 (CD127), les LT pouvaient proliférer durant la phase d'expansion de manière adéquate, mais ce, sans la formation subséquente de cellules mémoires⁴⁹. Par la suite, il a été constaté qu'il y avait une expression différentielle de CD127 au sein de la population de LT effecteurs et qu'une forte expression de CD127 corrélait avec la survie au stade mémoire. De plus, en effectuant le transfert adoptif d'un nombre cellulaire identique d'effecteurs CD127^{hi} ou CD127^{lo} généré lors d'une infection aigüe par la souche Armstrong du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV Arm), on constate que suite à une réinfection par *Listeria*

monocytogenes modifiée pour exprimer un épitope de LCMV (*Listeria*-Gp33), le développement de cellules mémoire et le déploiement d'une réponse secondaire robuste n'est possible qu'avec le transfert d'effecteurs CD127^{hi}, indiquant que ces derniers sont des précurseurs de cellules mémoires (MPEC)⁵⁰. Des études d'expression génique ont démontré que *Klrg1* était le gène le plus positivement différentiellement exprimé en comparant les effecteurs CD127^{lo} par rapport aux CD127^{hi}⁵¹. Le transfert adoptif des effecteurs KLRG1^{hi}CD127^{lo} dans des souris infectées démontre que ces cellules ne persistent pas lors la phase mémoire, indiquant leur demi-vie courte (SLEC)^{51,52}(Fig. 3). Ces deux populations sont fonctionnellement semblables, excluant une production d'IL-2 plus élevée chez les MPEC^{51,52}.

1.2.2.1 Molécules impliquées dans la différenciation

1.2.2.1.1 Signaux inflammatoires

Les signaux inflammatoires jouent un rôle crucial dans l'induction de l'expression de facteurs de transcription régulant la différenciation SLEC – MPEC (Fig. 3). L'activation des voies JAK-STAT par les cytokines comme l'IL-2 ou l'IL-12 permet d'induire un gradient d'expression de ces facteurs de transcription, dépendant de la quantité de cytokine présentent dans l'environnement. Le transfert adoptif de LT CD8 CD25^{hi}, plus réceptifs au signal de l'IL-2 ou de CD25^{lo} lors d'une infection LCMV Arm a permis de déterminer que les cellules CD25^{hi} prolifèrent plus et se différencient plutôt en SLEC. Les cellules recevant moins de signaux IL-2, soit les CD25^{lo}, se différencient plutôt en MPEC et, suite au contrôle de l'infection, en LT mémoires⁵³.

1.2.2.1.2 T-bet, Blimp1 et Bcl6

T-bet et Blimp1 sont deux facteurs de transcription pouvant être régulés par l'IL-12 et/ou l'IL-2. Ils coopèrent dans l'élaboration d'un programme transcriptionnel contribuant à la différenciation des SLEC et réprimant la différenciation en MPEC^{51,54,55}. En effet, lors d'une infection par LCMV, la délétion de *Tbx21*, codant pour le facteur de transcription T-bet, empêche la formation des SLEC sans nuire à la formation des MPEC. Or, la surexpression de T-bet dans les LT déficients pour *Tbx21* permet de restaurer la formation des SLEC. De plus, leur génération dépend positivement du gradient d'expression de T-bet, indiquant que ce facteur de transcription joue un rôle clé dans la différenciation en SLEC⁵¹.

De plus, suite à l'activation des LT, il y a augmentation de la transcription de *Prdm1*, codant pour le répresseur transcriptionnel Blimp1^{56,57}. Cette augmentation est plus élevée dans les SLEC que dans les MPEC, et la délétion de Blimp1 compromet la différenciation en SLEC et favorise la différenciation en MPEC sans toutefois générer une réponse mémoire efficace^{57,58}. De plus, un traitement permettant d'augmenter la biodisponibilité de l'IL-2 *in vivo* augmente la différenciation en SLEC, mais l'effet est amoindri en l'absence de Blimp1, indiquant l'existence d'un axe IL-2-Blimp1 dans le choix de différenciation^{37,55,59}.

La délétion de Blimp1 dans les LT CD8 permet également une augmentation de l'expression de Bcl6⁵⁸, un facteur de transcription nécessaire à la différenciation en MPEC. En effet, Bcl6 est requis pour la génération d'une réponse secondaire efficace et de cellules mémoires, mais dispensable pour leur maintien⁶⁰⁻⁶². Toutefois, il a été démontré que Bcl6 pouvait directement réprimer l'expression de *Prdm1* dans les LB⁶³, indiquant un mode d'action possiblement antagoniste dans l'expression de Blimp1 et Bcl6.

1.2.2.1.3 ID2 et ID3

Id2 limite la formation de cellules mémoires et la génération d'une réponse secondaire efficace et son absence abolit la différenciation en SLEC. D'une part, il agit en contribuant au programme transcriptionnel effecteur en restreignant la différenciation mémoire, via une répression du gène E2A de manière dose-dépendante⁶⁴. D'autre part, il contribue à la survie des effecteurs en régulant l'expression de facteurs proapoptotiques et anti-apoptotiques, comme Bim et Bcl2⁶⁵⁻⁶⁷.

Bien qu'appartenant à la même famille de facteurs de transcription et possédant des fonctions similaires, ID3 possèdent un rôle différent d'ID2. *Id3* a été identifié comme un gène régulateur maître de l'expression de gènes impliqués dans la survie et Blimp1 peut se lier à son promoteur afin de réprimer son expression, contribuant à l'apoptose des SLEC lors de la phase de contraction⁶⁸. ID3 est plutôt exprimé dans les MPEC et son absence empêche le maintien des LT lors du stade mémoire.

1.2.2.1.4 TCF1 et EOMES

Dans différents modèles d'infection aiguë, il a été démontré que le facteur de transcription TCF1, en aval de la voie Wnt, est nécessaire à la prolifération des LT CD8 lors des phases d'expansion primaire et secondaire. La déficience en TCF1 implique ainsi une limitation de la génération de MPEC et de la différenciation en Tcm^{69,70}.

EOMES ne régule pas la différenciation SLEC-MPEC et n'est pas essentiel au développement de la mémoire. Néanmoins, il joue un rôle dans la persistance des Tcm, en leur donnant un avantage compétitif pour leur maintien dans la niche périphérique⁷¹. De plus, il contribue à l'acquisition de fonctions effectrices par sa capacité à induire l'expression de molécules effectrices telles que l'IFN γ , la GrzmB et la perforine^{37,72}.

1.2.2.1.5 Zeb1 et Zeb2

Zeb1 et Zeb2 sont deux répresseurs transcriptionnels exprimés de manières réciproques lors de la réponse des LT CD8. Zeb1 est plutôt exprimé dans les LT naïfs et dans les MPEC alors que l'expression de Zeb2 est faible dans les LT naïfs et est maximale au pic de la réponse dans les SLEC. Zeb2 a été décrit comme agissant en aval de T-bet et permet de réprimer l'expression de gènes associés à la différenciation en cellules mémoires, diminuant entre autres l'expression de CD127 lors de la réponse. En contrepartie, Zeb1 ne joue pas de rôle dans la différenciation, mais plutôt dans le maintien des cellules mémoires et la génération d'une réponse secondaire adéquate. De plus, des expériences *in vitro* ont montré que la présence de TGF β dans le milieu de culture de LT CD8 activés permet d'augmenter l'expression de Zeb1 et de diminuer celle de Zeb2. De plus, Zeb1 peut lier le promoteur de Zeb2 suggérant un rôle de corégulation des deux molécules^{73,74}.

1.2.2.1.6 Bach2 et NR4A3

Bach2 restreint la différenciation en SLEC et leur apoptose pour permettre la différenciation en cellules mémoires et la génération d'une réponse secondaire. Des études de séquençage ont permis de déterminer que Bach2 est un répresseur transcriptionnel passif, c'est-à-dire qu'il ne module pas la structure de la chromatine afin de limiter son accessibilité, mais il agit plutôt en se liant à des séquences de l'ADN AP-1, ce qui module leur disponibilité pour d'autres facteurs de transcription de la famille Jun.

Cette compétition permet de restreindre le programme transcriptionnel induit par la signalisation TCR dans les cellules naïves, où Bach2 est fortement exprimé. Son expression diminue suite à l'activation des LT CD8, ce qui permet de restreindre l'expression de gènes associés à la différenciation en SLEC induite par la signalisation TCR⁷⁵.

NR4A3 un récepteur nucléaire orphelin dont l'expression est rapidement induite suivant l'activation des LT CD8 et joue donc un rôle tôt dans leur différenciation. Dans un modèle d'infection aigüe par la bactérie *Listeria monocytogenes* modifiée pour exprimer OVA (*Listeria-OVA*), la délétion de NR4A3 des LT CD8 transférés adoptivement favorise la différenciation des LT CD8 en MPEC et, à J45 post-infection, la génération d'une réponse mémoire plus robuste et d'un phénotype plutôt central mémoire. La surexpression de NR4A3 dans les cellules déficientes permettait de rétablir un phénotype sauvage, indiquant l'importance du rôle de NR4A3 dans la modulation de la génération de cellules mémoires en influençant la génération de MPEC au pic de la réponse effectrice. Des analyses de séquençage et d'accessibilité différentielle de la chromatine (ATAC-seq) semblent indiquer que l'absence de NR4A3 favorise la liaison d'AP-1 et d'autres facteurs de transcription à la chromatine afin de promouvoir la transcription de gènes cibles impliqués dans la différenciation en MPEC⁷⁶.

1.2.2.1.7 CXCR3

CXCR3 régule également la différenciation SLEC-MPEC. Il a été démontré dans différents modèles infectieux que la délétion du récepteur aux chimiokines CXCR3 limitait la contraction des LT et présentait un biais de différenciation pour les MPEC, favorisant une forte accumulation de LT mémoires⁷⁷⁻⁷⁹. Toutefois, les LT CD8 n'exprimant pas CXCR3 qui ont été activés *in vitro* par DC-OVA et transférés adoptivement ne présentaient pas de biais de différenciation SLEC-MPEC ni de différence de contraction, soulignant l'importance du rôle physiologique de CXCR3. Suite à une infection, l'absence de CXCR3 implique une diminution de la localisation des LT CD8 dans la zone marginale de la rate, une zone riche en IL-12 et en IFN de type 1⁷⁷. Il a déjà été démontré que l'IL-12 favorise la différenciation en SLEC en régulant l'expression de T-bet⁵¹, ce qui suggère que CXCR3 peut moduler la différenciation SLEC-MPEC par la régulation de la localisation des LT CD8 tôt lors de l'activation en influençant les signaux inflammatoires reçus^{77,78}.

Le choix de différenciation effecteur s'effectue donc par l'intermédiaire d'un réseau de facteurs de transcription qui sont exprimés en combinaison et à différents niveaux (Fig. 2), créant une sorte de balance moléculaire permettant de favoriser un destin cellulaire ou l'autre.

1.2.2.2 Étude de la différenciation SLEC-MPEC chez l'humain

Il est difficile d'extrapoler les résultats sur la différenciation des LT CD8 lors d'une infection aiguë chez l'humain dû à certaines restrictions expérimentales. En effet, chez la souris, l'infection est provoquée à un moment prédéterminé, ce qui permet de mesurer précisément la réponse immunitaire dans le temps. Toutefois, chez l'humain, le moment précis du début de l'infection est généralement inconnu, ce qui implique que la récolte d'échantillon ne peut pas être standardisée à l'instar de la souris. De plus, il est connu que les LT spécifiques à l'antigène circulant dans le sang diffèrent de ceux retrouvés dans les OLS. Cependant, les LT humains qui sont étudiés lors d'une infection proviennent généralement d'échantillons sanguins. Ainsi, bien souvent dans la littérature, les LT CD8 humains sont identifiés comme étant naïfs, effecteurs ou mémoires, mais pas comme SLEC ou MPEC⁸⁰.

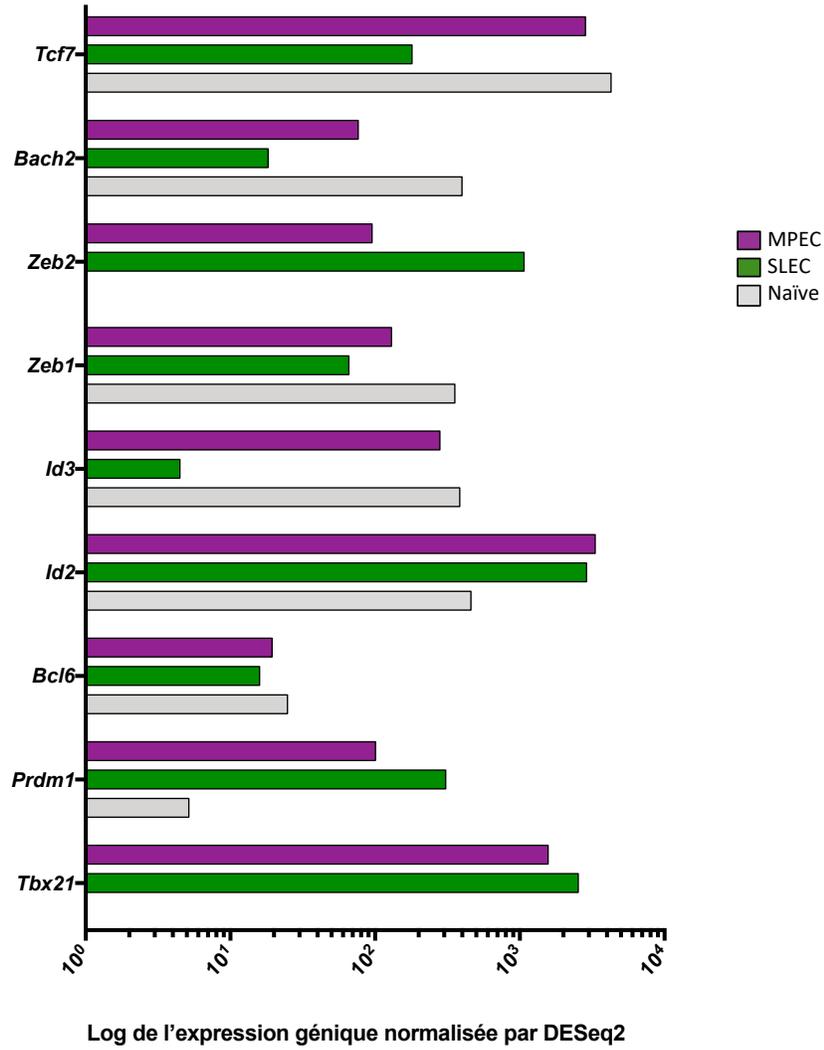


Figure 2. – Expression différentielle de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation SLEC- MPEC aux différents stades de la réponse effectrice.

L'expression de ces facteurs de transcription dans la rate, dans les LT CD8 naïfs (gris), SLEC (vert) ou MPEC (mauve) sont issus de données de séquençage des équipes de Yoshida *et al.* et Yu *et al.*, obtenus sur la base de données du *Immunological Genome Project*^{81,82}.

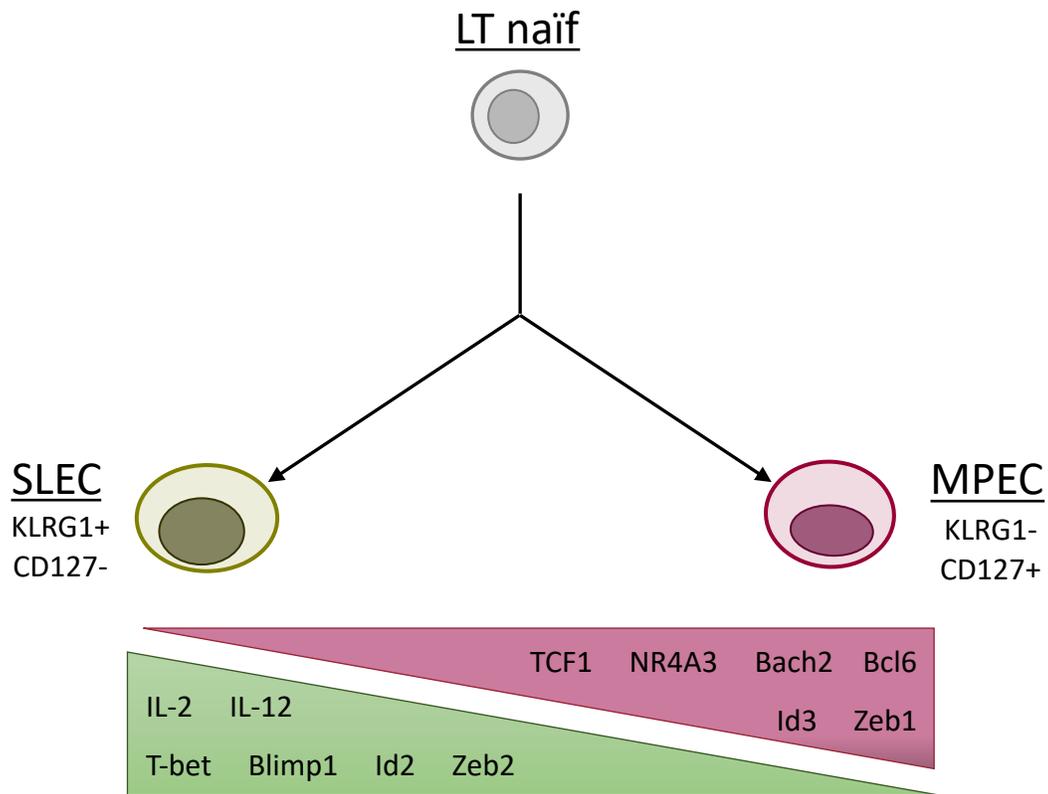


Figure 3. – Molécules impliquées dans la différenciation SLEC-MPEC

Suite à leur activation, les LT naïfs peuvent se différencier en SLEC (vert) ou en MPEC (rose). Les SLECS sont KLRG1+CD127- et leur différenciation dépend de cytokines comme l'IL-2 et l'IL-12 et des facteurs de transcription T-bet, Blimp1, ID2 et Zeb2. Les MPEC sont KLRG1-CD127+ et leur différenciation dépend de facteurs de transcription comme TCF1, NR4A3, Bach2, Bcl6, ID3 et Zeb1.

1.3 Phase de contraction

C'est suite à l'élimination du pathogène que survient la phase de contraction où 90% des effecteurs entreront en apoptose. Dans un modèle de *Listeria* avec traitement par antibiotique permettant de limiter l'inflammation tôt dans la réponse, les LT CD8 présentent une réduction de la prolifération lors de la phase d'expansion ainsi qu'une absence de la phase de contraction. L'utilisation de souris déficientes en IFN γ dans cette même étude a permis de mettre en évidence que la signalisation précoce de l' IFN γ lors de la réponse dirige la contraction des LT en limitant l'augmentation de l'expression d'IL-7R, nécessaire au maintien des MPEC et à leur différenciation en LT mémoire⁸³. Néanmoins, la surexpression de l'IL-7R dans les SLEC ne leur permet pas de survivre à la phase de contraction, indiquant que la faible expression du récepteur ne cause pas leur mort suite au contrôle de l'infection^{84,85}. Des expériences de transfert adoptif lors d'une infection aigüe ont également démontré que lors de la phase de contraction, la délétion de l'IL-15 dans les souris infectées limitait la survie des SLEC, tandis que l'injection d'IL-15 permettait d'augmenter leur survie. De plus, l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-15 sur les cellules hôtes était nécessaire à la survie des LT effecteurs suite à la phase de contraction, indiquant que ces signaux de survie sont médiés par la transprésentation de l'IL-15 aux LT CD8⁸⁶⁻⁸⁸. Ces résultats indiquent que l'IL-15 peut contribuer à la survie des SLEC, sans toutefois permettre leur maintien à long terme⁵¹.

D'autre part, la délétion de la molécule proapoptotique Bim, mais pas du récepteur de mort Fas, permet aux LT effecteurs de survivre à la phase de contraction^{89,90}. Des expériences de cotransfert adoptif d'effecteurs déficients ou pas pour Bim dans des souris infectées par *Listeria* confirment que c'est la molécule proapoptotique et non le niveau d'expression d'IL7R, qui dirige la phase de contraction. En effet, l'absence de Bim empêche la contraction des effecteurs, SLEC et MPEC confondus, mais les cellules mémoires ainsi générées ne sont pas maintenues à long terme, indiquant que la survie des cellules mémoires est indépendante de Bim⁹¹.

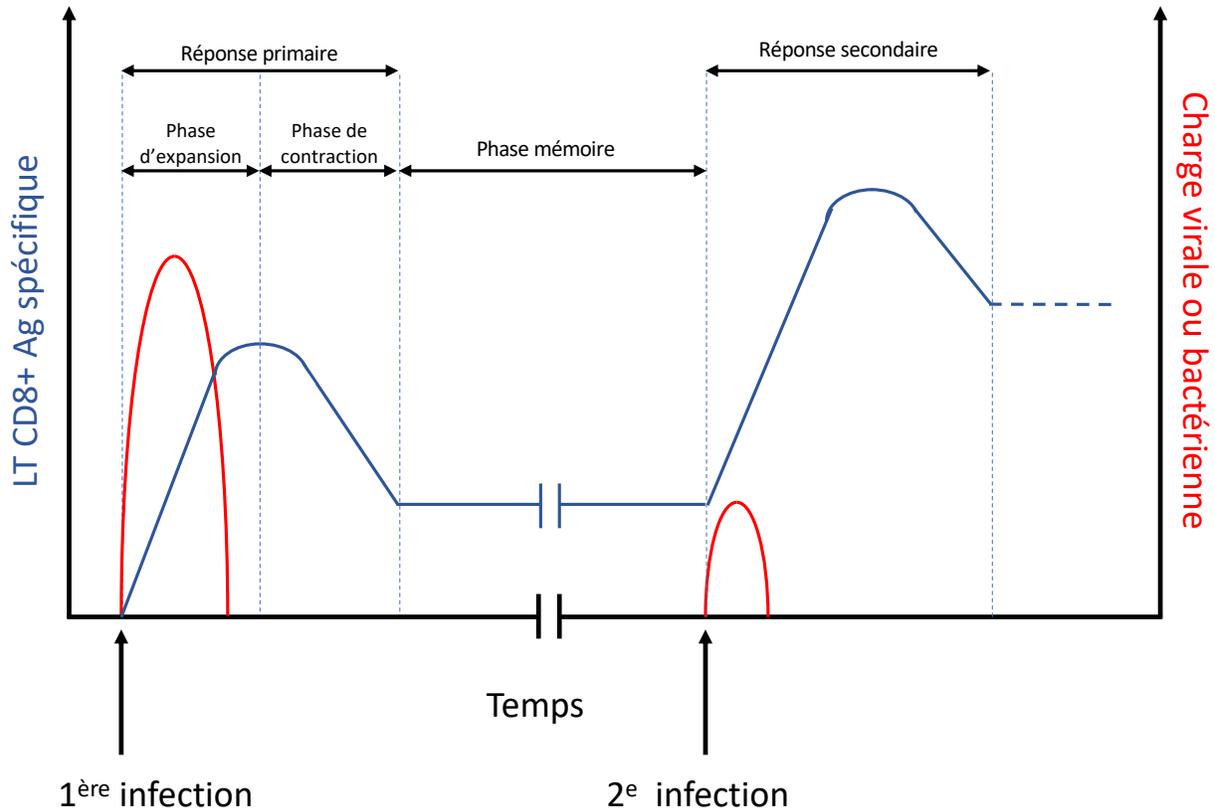


Figure 4. – Phases de la réponse immunitaire des LT CD8 suite à une infection aiguë

Lors d'une infection, il y a prolifération rapide de l'agent infectieux, ce qui fait rapidement augmenter la charge virale ou bactérienne (courbe rouge). Lors de la réponse primaire, soit la première fois qu'un LT CD8 naïf rencontre l'antigène qui lui est spécifique, il y a activation du LT CD8 et il s'ensuit une phase d'expansion massive impliquant une prolifération rapide des effecteurs (courbe bleu) et leur différenciation en LT effecteurs fonctionnels capables d'éliminer le pathogène. Suite au contrôle de l'infection, il s'ensuit une phase de contraction, où près de 90% des LT effecteurs vont mourir par apoptose. Les cellules qui survivront sont maintenues et se différencient en LT mémoires afin de protéger l'organisme d'une réinfection. Ceux-ci ont une capacité de réponse à une réinfection plus sensible et plus rapide que les LT naïfs. Ainsi, si les LT mémoires rencontrent de nouveau l'antigène, ils sont capables de rapidement contrôler la seconde infection.

1.4 Phase mémoire

Les LT mémoires sont entre autres caractérisées par leur persistance à long terme suite à une infection, une capacité de réponse à une réinfection plus sensible et plus rapide et leur capacité de localisation dans les tissus et les organes lymphoïdes.

Les LT mémoires sont maintenus à long terme grâce à leur capacité de prolifération homéostatique garantissant leur autorenouvellement. Leur longue durée de vie dépend aussi de leur capacité de réponse à des signaux de survie et de prolifération homéostatique fournis par l'IL-7 et l'IL-15^{49,92-94}. En comparaison aux LT naïfs, les LT mémoires ont une plus forte réactivité à l'antigène, c'est-à-dire une plus grande avidité fonctionnelle, dû entre autre à un changement dans l'organisation des complexes TCR à la surface des cellules mémoires, et des protéines responsable de la transduction du signal comme Lck⁹⁵⁻⁹⁸. De plus, elles répondent plus rapidement dû à une plus grande accumulation de précurseur capable de répondre à l'antigène en comparaison aux cellules naïves⁹⁹. Les cellules mémoires expriment plus de transcrits propre à la phase G1 alors que les cellules naïves sont en G0, suggérant qu'elles peuvent proliférer plus rapidement, pouvant passer plus vite en phase M, que les cellules naïves¹⁰⁰. Des études de méthylation de la chromatine et d'ATAC-seq ont indiqués que la chromatine des cellules mémoires est accessible aux niveaux de sites codant pour des molécules effectrices, suggérant que ces sites sont prêt à être transcrit lors de la rencontre de l'antigène et ce qui expliquerait l'expression constitutive de l'ARNm de molécules effectrices, comme l'IFN γ et la perforine¹⁰⁰⁻¹⁰³. Lors d'une infection, ces cellules peuvent être activées indépendamment de la présence de l'antigène, sans toutefois induire d'expansion clonale. En effet, la production d'IL-18 et d'IL-15 par les monocytes inflammatoires (CCR2+CD11b+Ly6C+) permet d'induire la sécrétion d'IFN γ et de GrzmB par les LT mémoires, les rendant aptes à participer de manière innée à la réponse contre les pathogènes. Une exposition aux cytokines inflammatoires comme l'IL-15 et l'IL-18 permettrait donc de préparer les cellules mémoires à monter efficacement une réponse effectrice lors de la rencontre de l'antigène.^{104,105}

1.4.1 Sous-types de LT mémoires

1.4.1.1 Lymphocytes T circulants (Tcm et Tem)

Initialement, deux catégories de cellules mémoires avaient été identifiées, soit les Tcm et les Tem, sur la base de l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 et de la molécule d'adhésion CD62L, ce qui permet aux cellules de traverser la veinule à endothélium épais et indique leur capacité de localisation dans les ganglions lymphatiques^{106,107}. Les Tcm expriment fortement CCR7 et CD62L, au contraire des Tem, et se retrouvent donc dans les OLS, mais circulent aussi dans le sang (Fig. 1). Ces deux sous-types cellulaires se localisent différemment dans la rate, les Tcm se retrouvent plutôt dans la pulpe blanche tandis que les Tem se retrouvent dans la pulpe rouge¹⁰⁸. Les Tcm sont aussi capables de proliférer plus fortement et de produire plus d'IL-2 par rapport aux Tem¹⁰⁹⁻¹¹¹(Fig. 5C).

La formation des Tcm et de Tem fonctionnels dépend de plusieurs facteurs de transcription. D'une part, les Tcm dépendent d'ID3, Bcl6 et TCF1^{61,68-70}. TCF1 joue un rôle important dans la différenciation des Tcm puisqu'il est nécessaire à l'expression optimale des protéines CCR7 et CD62L⁷⁰(Fig. 5C). De plus, il a été démontré que suite à une infection par Lm-OVA, la délétion d'*Id2* dans les LT CD8 spécifiques à l'antigène favorise l'acquisition d'un phénotype centrale mémoire⁶⁷. En effet, tel que précédemment mentionné, ID2 réprime l'activité transcriptionnelle de la protéine E2A, dont une des cibles directes est le gène de TCF1. ID2 pourrait donc restreindre la génération de Tcm via la répression de TCF1 de manière E2A dépendante⁶⁴. D'autre part, les Tem expriment fortement le facteur de transcription Blimp1, qui limite l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 en se liant directement au gène *Ccr7*^{57,58,112}(Fig. 5B). La délétion conditionnelle de Blimp1 dans les LT CD8 activés limite grandement l'abondance de cette sous-population suite à la résolution d'une infection par LCMV Arm, même si elle favorise la génération de MPEC⁵⁷.

En 2001, l'équipe de Wherry a avancé l'hypothèse qu'il existait une relation de différenciation linéaire entre les Tem et les Tcm, c'est-à-dire que les LT naïfs se différencieraient successivement en LT effecteurs, puis Tem et finalement en Tcm. En effet, lors du transfert adoptif dans des souris infectées par LCMV de cellules mémoires spécifiques à l'antigène Gp33 et exprimant différenciellement CD62L, les cellules exprimant faiblement CD62L, soit les Tem, maintenaient

leur phénotype tandis que les cellules exprimant fortement CD62L, soit les Tcm, diminuaient l'expression de CD62L pour se convertir en Tem. Toutefois, lorsqu'une expérience similaire a été réalisée en transférant, cette fois dans des souris naïves, les cellules exprimant différenciellement CD62L, les Tem ont progressivement acquis un phénotype central mémoire, soit l'expression de CCR7, CD62L et CD27, ainsi que la production d'IL-2 et une plus grande capacité proliférative. De plus, en utilisant un modèle infectieux permettant de moduler la dose d'antigène auxquels les souris étaient exposées, ils ont établi qu'une infection avec une faible dose d'antigène permettait une conversion du stade Tem à Tcm plus rapide qu'une infection avec une forte dose d'antigène. Ces résultats suggèrent que c'est l'élimination du pathogène et la perte de stimulation antigénique qui permettraient la différenciation des Tem en Tcm. Puisque les Tcm ont une meilleure capacité proliférative, cela garantirait le maintien homéostatique des cellules mémoires suite à la résolution de l'infection¹¹⁰.

Il a tout d'abord été postulé que les cellules Tem, exclues des ganglions et retrouvées dans la rate et les tissus non lymphoïdes comme la lamina propria, le foie et les poumons pourraient recirculer dans les tissus ou y résider¹⁰⁹. Toutefois, lors d'une infection par LCMV Arm, il était possible de constater une différence phénotypique entre les cellules mémoires de la rate et les lymphocytes intraépithéliaux (IEL). Ces derniers se démarquaient entre autres par la forte expression du marqueur d'activation récente CD69 et des intégrines comme CD103 et $\alpha 4\beta 7$, indiquant ainsi une hétérogénéité des populations de LT mémoires en fonction du tissu¹¹³. Par la suite, il a été démontré que certains LT migraient tôt lors de la réponse dans l'épithélium intestinal en augmentant l'expression d' $\alpha 4\beta 7$, puis se différencient en cellules mémoires sans toutefois recirculer¹¹⁴. D'autres études utilisant le modèle du virus de l'Herpes sont venu confirmer la présence de cellules mémoires demeurant dans les tissus suite à l'infection, supportant la notion qu'il existe une catégorie distincte de cellules mémoires qui sont résidentes dans les tissus, en l'occurrence les Trm^{109,115-117}. Ainsi, beaucoup d'études a priori réalisées dans le but d'étudier les Tem portaient en réalité sur les Trm.

1.4.1.1. Lymphocytes T résidents mémoires (Trm)

Les Trm sont des cellules mémoires non recirculantes exprimant CD69, mais pas CD62L. Elles patrouillent leur tissu de résidence contre une potentielle réinfection. En présence d'un

pathogène, les Trm sont capables d'acquérir rapidement des fonctions effectrices et de recruter d'autres cellules immunitaires afin d'élaborer une puissante réponse immunitaire^{118,119}. Ces Trm peuvent être retrouvés dans une variété de tissus non lymphoïdes, dont la peau, l'intestin, l'appareil reproducteur féminin, les poumons, le tissu adipeux et le foie, entre autres^{114,119-122}. Ils peuvent aussi établir résidence dans les organes lymphoïdes¹²³⁻¹²⁵. Différentes expériences de transplantation et de parabioses ont permis de démontrer que les Trm ne recirculaient pas. D'une part, suite au transfert adoptif des LT CD8 naïfs spécifiques à l'antigène Gp33 dans des souris infectées par LCMV Arm, l'équipe de Masopust *et al.*(2010) ont constaté une accumulation de cellules mémoires dans l'épithélium intestinal suite à la résolution de l'infection. Ils ont ensuite greffé une portion du tube digestif de souris naïve au tube digestif de souris immunisée. Plus d'un mois après la greffe, ils ont ainsi pu observer qu'il n'y avait de recirculation des cellules mémoires de l'épithélium intestinal de l'hôte dans le tissu greffé, indiquant ainsi que ces LT CD8 résidaient dans le tissu de l'hôte¹¹⁴. D'autre part, dans des expériences de parabioses où la circulation sanguine de deux souris était connectée, les LT recirculant s'équilibrent entre les deux parabiontes, tandis que des LT CD8 mémoires issu de l'épiderme de la peau et de l'appareil reproducteur féminin ne se sont pas équilibrés, indiquant que ces cellules ne recirculent pas et suggérant leur résidence dans les tissus^{119,126}.

1.4.1.1.2. Rétention des Trm dans les tissus

Premièrement, les Trm demeurent dans les tissus grâce à l'expression de molécule d'adhésion spécifique au tissu où ces LT mémoires sont localisés. En effet, certains Trm expriment l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, ou CD103, une molécule capable d'interagir avec la E-cadhérine présente sur les cellules épithéliales. Les Trm CD103+ ont beaucoup été étudiées en raison de leur présence dans les tissus épithéliaux et mucosaux, et l'expression de CD103 est nécessaire afin de permettre l'accumulation de Trm dans la peau et l'épithélium intestinal, ainsi que leur persistance à long terme^{127,128}. La sous-unité α de VLA-1 (CD49 α), une intégrine interagissant avec le collagène présent dans la membrane basale de l'épithélium, est également exprimé sur les Trm¹²⁹⁻¹³¹. Dans le foie, les Trm sont CD103- et dépendent de l'expression de LFA-1 pour adhérer aux sinusoides hépatiques dans lesquels ils patrouillent^{132,133}.

Deuxièmement, leur résidence dans les tissus dépend de la diminution de l'expression de récepteurs chimiotactiques promouvant normalement l'entrée dans la circulation. En effet, l'émigration par les LT CD8 des OLS vers la circulation repose sur la présence d'un gradient du phospholipide sphingosine 1-phosphate (S1P) dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Leur sortie du tissu dépend également de l'expression du récepteur au facteur chimiotactique S1P, soit S1PR1^{134,135}. Le facteur de transcription KLF2 régule positivement l'expression de ce récepteur^{136,137}. L'engagement du TCR avec son antigène induit la diminution de l'expression de KLF2, et donc de S1PR1¹³⁸, ce qui coïncide avec une augmentation de l'expression de CD69. En effet, alors que CD69 est exprimé de manière constitutive dans certains types de Trm, il est exprimé de manière transitoire suite à l'activation des LT CD8, probablement pour promouvoir leur rétention dans les organes lymphoïdes afin qu'ils soient adéquatement activés^{122,139,140}. Or, CD69 est capable de former un complexe avec S1PR1 à la surface de la cellule, menant à l'internalisation et la dégradation du récepteur chimiotactique^{141,142}. Ainsi, dans les Trm, la diminution de l'expression de *Klf2* combinée à l'interaction de CD69 avec S1PR1 permet l'inhibition de l'expression de S1PR1, au niveau transcriptionnel et à la surface de la cellule, menant à la rétention des LT dans le tissu^{138,143-145}(Fig. 5A).

Troisièmement, la présence de certains signaux cytokiniques permet de garantir le développement, le maintien et la survie des Trm dans les tissus. En effet, le développement des Trm CD103+ dans la peau nécessite l'IL-15¹²⁸. Dans un modèle d'infection par le virus de l'herpès, la délétion du facteur de transcription T-bet induisait une diminution de l'expression de la chaîne β du récepteur à l'IL-15 (CD122), ce qui impliquait une survie compromise des Trm de la peau, qui n'était pas maintenue suite au contrôle de l'infection. Ainsi un niveau basal d'expression de T-bet est requis afin de soutenir l'expression du récepteur à l'IL-15 et soutenir la survie des Trm¹⁴⁶. De plus, le TGF β permet d'augmenter l'expression des intégrines requises pour la rétention dans le tissu, incluant CD103^{128,146,147}(Fig. 5A). L'utilisation d'un modèle d'infection par influenza a démontré que le facteur de transcription TCF1 réprimait le développement de Trm dans les poumons, et suggérait que la signalisation par TGF β antagonise TCF1 afin de permettre l'expression de CD103 et la différenciation en Trm¹⁴⁸. Ainsi différents facteurs de transcription viennent réguler l'expression de molécules d'adhésion, de récepteurs chimiotactiques et cytokiniques dirigeant la différenciation en Trm.

1.4.1.1.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la génération des Trm

Des études transcriptomiques de Trm isolés de la peau, des intestins et des poumons, induit par différents modèles infectieux, ont permis d'identifier une signature transcriptomique distincte, contenant des gènes associés à la résidence des LT dans les tissus. Celle-ci a été comparée à la signature de LT présents dans la peau au pic de la réponse et suite au contrôle de l'infection, soit au J8 et J14. Ainsi, il a été possible de déterminer que les LT KLRG1- faisait l'acquisition progressive d'une signature résidente mémoire, indiquant leur rôle en tant que précurseur des Trm de la peau CD103⁺¹²⁸. Cette signature a également permis d'identifier le facteur de transcription Hobit comme un régulateur important du maintien des Trm dans la peau. En effet, dans différents modèles infectieux, la délétion de Hobit et Blimp1 empêche la génération et le maintien de cellules résidentes mémoires, que ce soit des Trm CD103⁺, CD103⁻ ou des cellules NK résidentes, indiquant le rôle coopératif de ces deux facteurs de transcription dans le développement de la résidence des cellules immunes¹¹². Le transcriptome de différents sous-types de cellules résidentes a été séquencé afin d'identifier une signature associée non seulement aux Trm, mais à la résidence des cellules immunes en général. Ainsi, Hobit et Blimp1 ont été identifiés comme des facteurs de transcription collaborants dans la répression transcriptionnelle de gènes impliqués dans la sortie des tissus, comme les facteurs de transcription tels que *Klf2* et *Tcf7*, et les récepteurs aux chimiokines tels que *Ccr7* et *Slpr1*¹¹² (Fig. 5A). Dans un modèle d'influenza, il a été démontré que la voie Notch contrôlait la génération et la maintenance des Trm du poumon, possiblement via une régulation du métabolisme des Trm¹⁴⁹. De plus, l'utilisation d'une approche computationnelle combinée au criblage fonctionnel de données de séquençage de transcrits issus de Trm de différents tissus a permis d'identifier Runx3 comme un autre facteur de transcription essentiel à l'élaboration du programme transcriptionnel des cellules résidentes mémoires¹⁵⁰(Fig. 5A).

Une autre étude de séquençage de cellules uniques effectué à différents moments d'une infection par LCMV fournit de nouvelles perspectives quant à l'ontogénie des Trm dans les tissus. En effet, dès J4 post-infection, il a été possible de constater une différence transcriptionnelle entre les LT CD8 de la rate et les IEL du petit intestin. À J4, il y avait également une hétérogénéité transcriptionnelle au sein des IEL, délimitant deux populations distinctes. La première était

caractérisée par une plus forte expression de CD25 et par l'expression de gènes associés à la différenciation en cellule effectrice et était moins susceptible de se différencier en Trm CD103+ CD69+ suite à un transfert adoptif. L'autre population était caractérisée par une plus faible expression de CD25 et se différenciait préférentiellement en Trm suite à un transfert adoptif. Ces résultats suggèrent que l'entrée dans le microenvironnement du tissu induit rapidement des changements transcriptionnels dans les LT CD8 activés. De plus, des précurseurs de Trm se retrouveraient dans la population exprimant faiblement CD25 dès J4¹⁵¹. Sachant que les MPEC sont caractérisés par une expression plus faible de CD25⁵³, ces résultats soutiennent l'idée que tôt dans l'infection, les MPEC qui entrent dans les tissus contiennent une population de précurseur de Trm ou pré-Trm^{151,152}.

1.4.1.1.4 Rôle des Trm dans la réponse antitumorale

L'idée que les Trm pourraient jouer un rôle dans les stratégies de lutte antitumorale est de plus en plus présente. D'une part, chez l'humain comme chez la souris, les Trm provenant de différents tissus expriment de plus hauts niveaux de transcrits de cytokines pro-inflammatoires que les LT CD8 ne résidant pas dans les tissus^{112,149,153,154}. Cette quantité de transcrits élevée permettrait au Trm de produire des cytokines plus rapidement suite à la stimulation antigénique. D'autre part, dans les tumeurs épithéliales, qui expriment généralement la E-cadhérine, la liaison de CD103 à son ligand promeut l'adhésion des LT CD8 aux cellules tumorales et l'induction de signaux de costimulation coopérant avec le signal TCR, ce qui favorise la lyse spécifique des cellules tumorales^{155,156}. De plus, il a été observé qu'une variété de tumeurs épithéliales montraient un enrichissement pour la présence des LT CD8+CD103+ dans la tumeur et leur abondance corrélait avec une meilleure survie sans progression¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

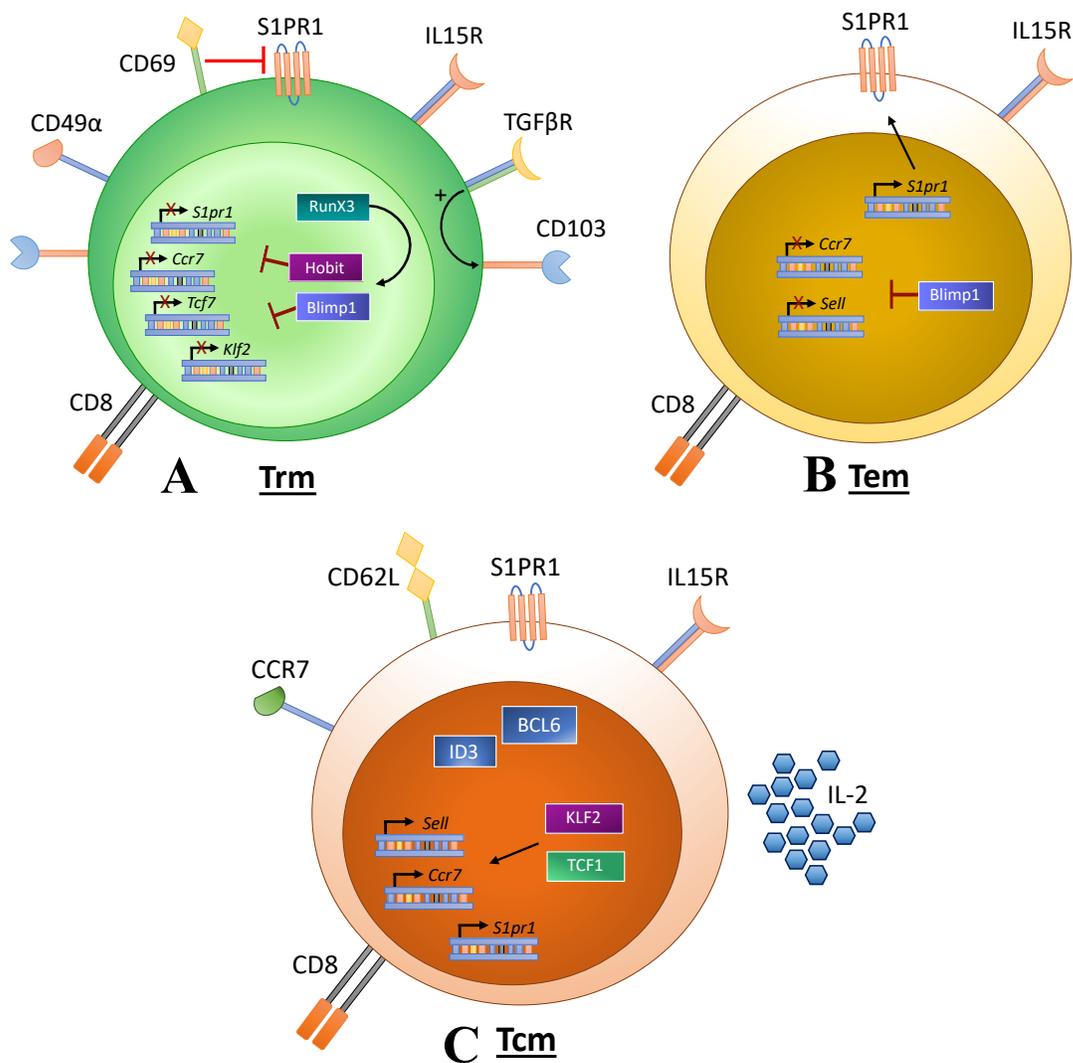


Figure 5. – Les différents sous-types de LT CD8 mémoires

Les LT CD8 mémoires expriment dépendent de signaux de survie fournis par l'IL-15 pour leur maintien et expriment donc le récepteur à l'IL-15. (A) Les Trm sont caractérisés par leur rétention dans les tissus via l'expression de différentes intégrines, comme CD49 α et CD103. Le signal fourni par TGF β favorise l'expression de CD103. RunX3, Blimp1 et Hobit collaborent à l'élaboration d'un programme transcriptionnel de résidence, permettant d'inhiber d'autres facteurs de transcription comme KLF2 et TCF1. L'expression en surface de CD69 et l'inhibition de l'expression de *Klf2* permettent de limiter l'expression de S1PR1 et par le fait même, l'accès à la circulation. (B) Les Tem sont retrouvés dans la circulation, dans la rate et dans les tissus (souvent confondus avec les Trm dans la littérature). L'expression de Blimp1 dans les Tem permet d'inhiber l'expression de CCR7 et CD62L tandis que l'expression de S1PR1 leur donne accès à la circulation. (C) Les Tcm, retrouvés dans la circulation et dans les OLS, sont capables de produire plus d'IL-2 que les autres sous-types de LT mémoires. Les Tcm dépendent de plusieurs facteurs de transcription, dont ID3, BCL6, KLF2 et TCF1, qui permettent entre autres l'expression de CD62L, CCR7 et S1PR1. Figure adaptée de l'article de revue de Amsen *et al.* (2018)¹⁶⁰.

2. La réponse lymphocytaire CD8 dans un contexte chronique

Dans le contexte d'une infection aiguë, la formation de LT mémoires a habituellement lieu suite au contrôle de l'infection, c'est-à-dire en l'absence de stimulation antigénique soutenue ou de niveaux élevés d'inflammation. Or, lors d'une infection chronique ou d'un cancer, il y a persistance de ces signaux, ce qui prévient la formation de cellules mémoires fonctionnelles et induit l'épuisement des LT CD8^{161,162}. L'épuisement implique une perte progressive des fonctions effectrices et des capacités prolifératives des LT CD8 ainsi qu'une augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs, tels que PD-1, Lag3, Tim3, CD39¹⁶³⁻¹⁶⁷.

2.1 Épuisement lors d'une infection chronique

L'utilisation d'une souche chronique de LCMV plutôt qu'aiguë a permis de mieux étudier l'épuisement des LT CD8. En effet, une infection par LCMV Arm sera contrôlée dès le J8 alors que la souche LCMV Clone 13 (Cl13), qui ne varie que de deux acides aminés par rapport à la souche aiguë, provoque une virémie pouvant persister jusqu'à 3 mois après l'infection^{168,169}. Ainsi, le modèle d'infection par LCMV Cl13 a permis d'établir un modèle d'épuisement où les LT CD8 perdaient progressivement leurs fonctions effectrices en fonction de la quantité d'antigène produite. La perte de fonctionnalité dans le temps implique d'abord une perte de la capacité à produire de l'IL-2, ainsi qu'une diminution des capacités cytolytiques et des capacités prolifératives. Il s'ensuit une déficience dans la production de TNF α puis de la production d'IFN γ . Pour finir, les niveaux élevés d'antigènes persistants peuvent induire la délétion des LT CD8¹⁷⁰.

Les récepteurs inhibiteurs sont normalement impliqués dans la prévention de l'auto-immunité et leur expression est donc essentielle à la tolérance du soi¹⁷¹. Ces récepteurs peuvent donc servir de frein à la réponse immunitaire. Il a été démontré que la co-expression des différents récepteurs inhibiteurs corrélait avec la sévérité de l'infection et de l'épuisement des LT CD8. De plus, le blocage de ces différents récepteurs peut revigorer les LT CD8 de manière synergique^{167,172}. La combinaison de PD-1 avec CTLA-4, Lag3 et Tim3 a été étudiée dans différents modèles d'infections chroniques et de cancer.

L'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1 permet d'induire une déphosphorylation des molécules de signalisation proximales du TCR via la tyrosine phosphatase 2 contenant une région homologue Src-2 (SHP-2), ce qui permet de réguler négativement la signalisation par le TCR en aval¹⁷³⁻¹⁷⁵. PD-1 n'est pas exprimé sur les cellules naïves, mais son expression est induite de manière transitoire dans les cellules activées¹⁷⁶. Lors d'une infection par LCMV Cl13, il a été démontré que les cellules épuisées augmentaient l'expression de PD-1¹⁷⁷. De plus, dans le contexte chronique du VIH, la signalisation via PD-1 induit un programme transcriptionnel permettant l'augmentation de l'expression de facteurs de transcription contribuant à l'inhibition des fonctions des LT CD8¹⁷⁸. Toutefois, lors d'une infection par LCMV Cl13, l'inhibition de l'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1 pouvait rétablir la fonctionnalité des LT CD8 épuisés, impliquant une diminution marquée de la virémie dans les souris traitées¹⁷⁷.

2.1 Les sous-populations de LT CD8 épuisés

Il a été démontré par l'usage d'anticorps bloquants dans le contexte d'une infection par LCMV Cl13 que les cellules exprimant des niveaux élevés de PD-1 (ou PD-1^{hi}) ne pouvaient être revigorées par le traitement, en comparaison au reste des LT CD8 épuisés PD-1^{int} ou PD-1^{lo}. Ceci suggérait une hétérogénéité des LT épuisés, où certains LT CD8 PD-1^{hi} seraient terminalement différenciés et pour lesquels la perte de fonctionnalité n'est pas réversible¹⁷⁹.

Initialement, les LT CD8 épuisés avaient été catégorisés par l'équipe de John Wherry sur la base de leur expression différentielle des facteurs de transcription T-bet et EOMES. Les LT CD8 dits progéniteurs expriment fortement T-bet et PD-1 de manière intermédiaire (T-bet^{hi}PD-1^{int}). Ils conservent une capacité à proliférer et peuvent se différencier en LT CD8 terminaux, qui eux expriment fortement EOMES et PD-1 et ont complètement perdu leur capacité à proliférer¹⁸⁰.

Par la suite, plusieurs équipes ont identifié des LT CD8 épuisés dits « folliculaire cytotoxique » ou memory *stem-like*, entre autres sur la base de l'expression de Tim3, CXCR5 et TCF1¹⁸¹⁻¹⁸⁴. Une première sous-population est caractérisée par l'expression de CXCR5 et TCF1, mais pas de Tim3. Ces cellules sont capables de s'autorenouveler et possèdent un profil d'expression génique similaire aux MPEC, au CD4 Tfh et dans une certaine mesure, aux cellules souches hématopoïétiques. Il a été établi que l'expression élevée du marqueur de surface SlamF6 dépendait de l'expression du facteur de transcription TCF1. Ainsi, l'expression de SlamF6^{hi} sur

les LT est utilisée comme marqueurs substituant l'expression intracellulaire de TCF1¹⁸⁵. Les cellules CXCR5+Tim3-TCF1+ sont des précurseurs, dites *stem-like*, et sont capables de générer des LT CD8 terminalement différenciés qui sont CXCR5-Tim3+TCF1-. Ces LT CD8 épuisés terminaux ne peuvent être convertis *stem-like*, ont de faible capacité à proliférer, expriment plus fortement des molécules effectrices comme la GrzmB et coexpriment plus de récepteurs inhibiteurs comme Lag3, CD39 ou 2B4. Les deux sous-populations expriment PD-1, mais les terminaux ne répondent pas aux anticorps bloquant pour PD-1 (α PD-1), contrairement aux *stem-like*, qui eux peuvent être revigorés et donner lieu à un élan prolifératif suite au traitement. Une expérience de séquençage à cellules uniques de LT épuisés montre que l'expression de T-bet et EOMES est similaires au sein des deux sous-populations, alors que le modèle Wherry rapporte une hétérogénéité de l'expression de ces deux facteurs de transcription, rendant les deux modèles difficilement conciliables^{165,180,182,184,186,187}.

Plus récemment, Hudson *et al.* (2019) ont effectué une analyse de l'expression génique des cellules épuisées *stem-like* et terminalement différenciées, qui a été comparée au transcriptome de cellules T naïves, effectrices et mémoire suite à une réponse aigüe afin de mettre en évidence les marqueurs propres à la réponse chronique. Ainsi, il a pu être déterminé que la population précédemment identifiée comme terminalement différenciée (CXCR5-Tim3+) exprimait CD101 de manière bimodale, et qu'elle comportait en fait deux sous-populations possédant un profil d'expression génique distinct. Des expériences de transferts adoptifs ont permis de confirmer l'identification de trois sous-populations; les cellules *stem-like*, qui sont TCF1+PD-1+, mais n'expriment pas CD101, T-bet et la GrzmB, les cellules transitoires, qui sont Tim3+CX3CR1+PD-1+, exprime fortement la GrzmB et T-bet, et n'expriment pas TCF1 et CD101, et les cellules terminales qui sont Tim3+CD101+PD-1+, mais n'expriment pas ou faiblement la GrzmB, T-bet et TCF1¹⁸⁸. Ces populations ont également été identifiées par l'équipe de Zander *et al.*(2019) dans une étude séquençage de l'ARN à cellules uniques¹⁸⁹(Fig. 6). Les *stem-like* sont capables d'autorenouvellement et de donner lieu aux cellules transitoires ou aux cellules terminales. Le traitement avec l' α PD-L1 permet d'augmenter la génération de cellules transitoires, qui possèdent encore des capacités prolifératives et effectrices et peuvent donner lieu aux cellules terminales, qui sont les plus sévèrement épuisées et qui ne peuvent plus proliférer. En utilisant un système de délétion inductible des LT CD8 exprimant CX3CR1, il a également été déterminé que les cellules transitoires étaient nécessaires au contrôle de l'infection virale¹⁸⁸. La génération des cellules

transitoires et leur capacité à contrôler l'infection dépendent de l'aide fourni par les LT CD4 auxiliaires qui produisent de l'IL-21¹⁸⁹.

En parallèle, une nouvelle étude de Beltra *et al.*(2020) propose de différencier les progéniteurs TCF1+ sur la base de l'expression de CD69. Les progéniteurs épuisés TCF1+CD69+ (Tep^{prog1}) seraient restreints aux tissus et plutôt quiescents. Toutefois la perte d'expression de CD69 leur permettrait d'accéder à la circulation. Ces progéniteurs circulants TCF1+CD69- (Tep^{prog2}) perdraient graduellement l'expression de TCF1 au fil des divisions pour se convertir en un sous-type intermédiaire de LT épuisés (Tep^{int}) qui n'a pas de capacité proliférative. Ce troisième sous-type TCF1-CD69- possèderaient des fonctions effectrices et son abondance augmente suite à l'administration d' α PD-L1, qui finit par se différencier en un quatrième sous-type TCF1-CD69+, terminalement épuisé (Tep^{term}). Incidemment, les Tep^{int} expriment fortement CXC3CR1, ce qui les rend très similaires aux cellules transitoires précédemment décrites¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Dans cette étude, l'expression de T-bet augmente avec la perte de l'expression de TCF1, soit lors du passage du stade progéniteurs circulants au stade intermédiaire, mais n'est pas maintenue au stade terminalement épuisé. Ainsi, il est suggéré que le facteur de transcription T-bet serait essentiel à la différenciation des Tep^{prog2} en Tep^{int}¹⁹⁰.

Ces trois dernières études concordent dans la perspective où elles décrivent un stade intermédiaire de différenciation des LT épuisés, entre les progéniteurs et les terminaux^{188,190}. Ensemble, ces études suggèrent que les cellules progénitrices ou précurseurs TCF1+, qui prolifèrent suite au traitement α PD-L1 et renouvellent un bassin de cellules épuisées aux capacités prolifératives limitées, mais demeurant encore capables de produire des molécules effectrices. Ce bassin hétérogène de cellules épuisées TCF1- incluent les LT intermédiaires ou transitoires, et les LT terminalement épuisées, qui coexpriment le plus de récepteurs inhibiteur^{185,186,188,190}.

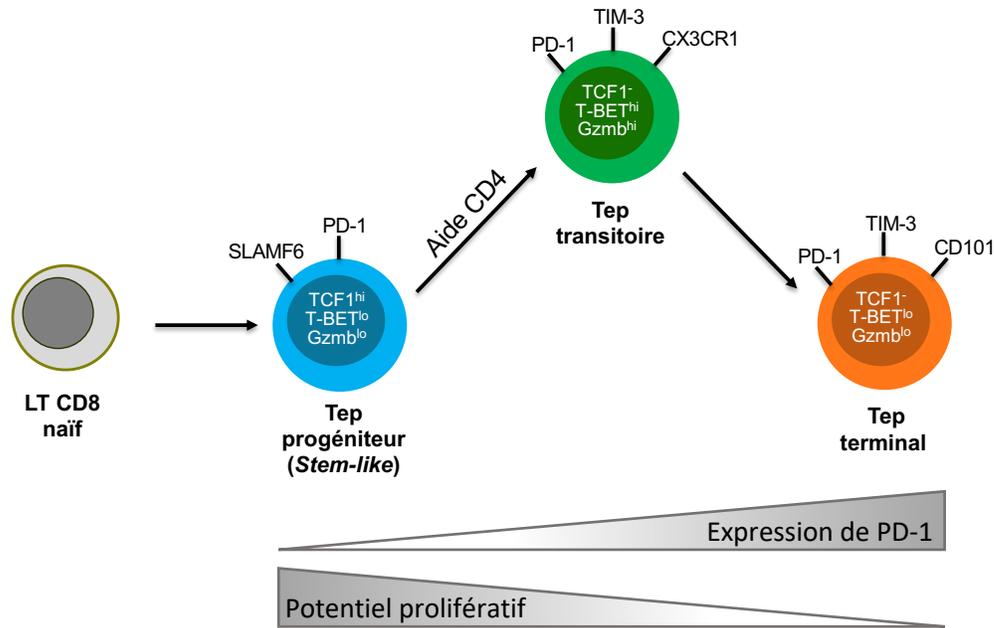


Figure 6. – Les sous-populations de LT CD8 épuisés identifiées par les équipes de Hudson *et al.* et Zander *et al.*

Suite à une infection chronique, les LT CD8 naïf se différencient en LT épuisés (Tep) progéniteur ou stem-like (SlamF6+Tim3-). Avec l'aide CD4, les Tep progéniteurs peuvent proliférer et se différencier en Tep transitoires (SlamF6-Tim3+CX3CR1+), qui conservent des fonctions effectrices et prolifératives, et en Tep terminaux (SlamF6-Tim3+CD101+). Au fil de la différenciation des LT épuisés, il y a une augmentation de l'expression de PD-1 et, parallèlement, une diminution du potentiel prolifératif.

2.2. Cancer

Le phénomène du cancer implique l'accumulation de mutations somatiques et de changements épigénétiques dérégulant le cycle de division cellulaire menant à une prolifération chronique au sein d'un tissu donné. Ainsi, la carcinogenèse peut être définie par l'acquisition par des cellules de certains traits phénotypiques en lien avec la malignité. Ceux-ci incluent entre autres une capacité à s'évader des signaux suppresseurs de la prolifération, un potentiel réplcatif illimité, une résistance à l'apoptose, une dérégulation métabolique, l'induction de l'angiogenèse, l'invasion métastatique d'autres tissus ainsi que l'évasion immunitaire¹⁹¹.

Cette dernière caractéristique provient d'abord du processus d'immunoédition qui prend cours lors que le système immunitaire n'élimine pas la totalité des cellules tumorales. Celles exprimant des antigènes modifiés sont détectées et détruites par le système immunitaire lors d'un processus d'immunosurveillance. Les cellules tumorales qui n'ont pas été éliminées entrent dans une phase d'équilibre, où le système immunitaire restreint la prolifération et l'expansion des cellules transformées. Toutefois, une sélection a ainsi lieu, en faveur des cellules cancéreuses de plus faible immunogénicité. Ceci instaure un contexte de tolérance ce qui leurs permettent d'échapper à l'immunosurveillance et de proliférer¹⁹²⁻¹⁹⁵.

La prolifération des cellules cancéreuses permet également l'acquisition de mutations contribuant à l'établissement d'un état immunosuppresseif dans le microenvironnement tumoral (TME) et ainsi, à l'évasion immunitaire de la tumeur¹⁹⁶. Ce TME est le produit de l'interaction des cellules malignes et des cellules non malignes environnantes et est généralement composé de cellules tumorales en prolifération, du stroma de la tumeur, de vaisseaux sanguins et de cellules immunitaires.

2.2.1 Mécanismes d'évasion immunitaire

Les mécanismes d'évasion immunitaire réprimant la réponse anti-tumorale des LT CD8 incluent une limitation de la présentation antigénique par les tumeurs via une diminution ou une perte d'expression du CMH de classe I et par l'acquisition de mutations menant à des défauts dans l'apprêtement de l'antigène¹⁹⁷⁻²⁰⁰. De plus, il y a le recrutement d'une variété de cellules régulatrices immunosuppresseives dans le TME, tel que LT CD4 régulateurs (Treg), les cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC) ainsi que les macrophages associés à la tumeur (TAM). Ces cellules peuvent produire une variété de molécules et de cytokines pouvant inhiber l'activation ou le recrutement des LT CD8 dans le TME et contribuer à l'induction de la dysfonction des LT CD8 infiltrant la tumeur (TIL)²⁰¹⁻²⁰⁴.

L'induction de l'expression de PD-L1 dans le TME est un autre mécanisme clé d'évasion immunitaire permettant de favoriser la progression tumorale^{205,206}. Tout d'abord, l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales est associée à un mauvais pronostic chez les patients²⁰⁷. Indépendamment de l'interaction avec PD-1 sur les LT CD8, l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales contribuerait également à la formation d'un bouclier moléculaire permettant d'éviter la

lyse spécifique par les LT CD8, en conférant une protection aux cellules cancéreuses contre les stimuli proapoptotique^{208,209}. De plus, PD-L1 peut interagir avec CD80 sur les DC afin de limiter l'activation des LT CD8^{210,211}. Surtout, il est établi que l'interaction de PD-L1 avec PD-1 sur les LT CD8 limite leur activation^{212,213}. Ainsi, les anticorps bloquants sont utilisés en clinique pour traiter les patients^{214,215}.

2.2.2 Épuisement des LT CD8 en cancer

Il a été démontré que les LT CD8 spécifique à la tumeur présentaient un phénotype épuisé et répondaient ainsi de manière similaire aux LT CD8 suite à une infection chronique. En effet, chez la souris comme chez l'humain, les TIL spécifiques à l'antigène, présentent une forte augmentation de l'expression de PD-1, une co-expression de plusieurs récepteurs inhibiteurs, une activité cytotoxique limitée ainsi qu'une limitation de la production de cytokines comme l'IFN γ , le TNF α ou l'IL-2²¹⁶⁻²¹⁹.

Il a d'abord été établi dans un modèle tumoral murin que les TIL coexprimant Tim3 et PD-1 représentent une sous-population de TIL plus épuisée, qui est incapable de proliférer et de produire l'IFN γ , le TNF α ou l'IL-2²²⁰. Par la suite, en comparant les signatures géniques de LT CD8 lors d'une infection chronique par LCMV Cl13 et dans un modèle d'hépatocarcinome murin, l'équipe de Schietinger *et al.* (2016) a constaté la similarité des programmes moléculaires et a établi que, tout comme dans le modèle d'infection chronique, l'épuisement des TIL dépend de la présence et de la persistance de l'antigène tumoral²²¹.

Une autre étude par Philip *et al.* (2017) a permis de mettre en lumière les étapes qui mènent à la dysfonction, soit l'épuisement, des LT CD8 au niveau épigénétique. En effet, dans un modèle murin où la formation de l'hépatocarcinome est provoquée par un système d'induction de la Cre recombinase, ils ont transféré des LT CD8 naïfs spécifiques à l'antigène tumoral, ce qui leur permet de suivre les LT avant et après l'induction de la carcinogenèse. Des études d'ATAC-seq à différents moments suivant le transfert adoptif et suivant la carcinogenèse ont permis d'identifier deux états distincts de la chromatine chez les LT CD8. Le premier caractérise le début de la réponse antitumorale jusqu'à J7 et le second, jusqu'à J60. Au premier stade, les cellules sont initialement dans un état dysfonctionnel initial dit plastique, alors que de J7 à J14, il y a une remodelisation de

la chromatine. Suite au jour 14, soit le second stade dit dysfonctionnel tardif, la chromatine est dans un état fixé. De plus, des études de séquençage leur ont permis d'associer les cellules CD38^{hi}CD101^{hi} à un stade de dysfonction plus tardif au J14. L'état de la chromatine semble indiquer que les cellules en stade 1 sont reprogrammables tandis que celles en stade 2 ne le sont plus²²².

Dans un contexte d'infection chronique ou de cancer, l'hypothèse selon laquelle le traitement par l'utilisation d'anticorps bloquants pour PD-1/PD-L1 revigore les LT CD8 et rétablit leur fonctionnalité, permettant un meilleur contrôle de la croissance tumorale ou de la charge virale, semble avoir été démontrée par plusieurs équipes^{167,215,223-225}. Toutefois, l'équipe de Philip *et al.*, ainsi que plusieurs autres études, indique que certains LT CD8 épuisés acquièrent un état épigénétique stable et ne sont pas reprogrammés suite au traitement α PD-L1. D'une part, cela suggère que l'inhibition de PD-1 est insuffisante pour le renversement de l'épuisement de l'ensemble des LT CD8 épuisés au niveau épigénétique et d'autre part, limite la possibilité pour ces LT CD8 épuisés de générer une réponse effectrice à long terme^{222,226,227}.

Néanmoins, dans l'étude de Philip *et al.*, le passage du stade 1 au stade 2 est caractérisé par la fermeture de la chromatine du gène *Tcf7*, ce qui n'est pas sans rappeler la classification des sous-types de LT épuisés précédemment expliqués, soit les progéniteurs TCF1⁺ et terminaux TCF1⁻²²². Chez la souris, il a déjà été démontré que l'expression de *Tcf7* était requise pour éliciter une réponse antitumorale efficace suite aux immunothérapies par anticorps bloquants²²⁸. De plus, chez l'humain, la présence de LT CD8 TCF7⁺ dans la tumeur est associée à un pronostic favorable et à une meilleure réponse aux anticorps bloquants²²⁹. Dans le modèle de mélanome B16-Gp33, il a été démontré que les LT CD8 spécifique à la tumeur comportaient une population TCF1⁺PD-1⁺GrzmB⁻, nécessaire au contrôle tumoral et capable de se différencier en cellules TCF1⁻PD-1⁺GrzmB⁺. L'effet du traitement par anticorps bloquant sur la limitation de la croissance tumorale était dépendante de la présence des cellules TCF1⁺ et induisait leur autorenouvellement et leur différenciation en TCF1⁻²³⁰. Chez des patients atteints de mélanomes métastatiques ayant reçu une immunothérapie ciblant les récepteurs inhibiteurs (α PD-1 et α CTLA4), les études de séquençage montraient que les cellules exprimant TCF7, associée à une bonne réponse au traitement, n'exprimaient pas CD39 ni de Tim3, tandis que les cellules TCF7⁻ étaient CD39⁺Tim3⁺ et avaient un profil transcriptionnel plus épuisé²²⁹. Toutes ces études soulignent l'importance de TCF1 dans

les TIL et indiquent que l'état d'épuisement des LT CD8 intratumoraux serait similaire à l'épuisement des LT CD8 en infection chronique.

Récemment, l'équipe de Nicolas Haining a confirmé que le modèle d'infection chronique LCMV C113 et le modèle de mélanome murin B16-OVA élicitaient les mêmes sous-populations de LT CD8 épuisés, soit les progéniteurs TCF1+Tim3- et les terminaux TCF1-Tim3+. Ces progéniteurs avaient de meilleures fonctions prolifératives, une meilleure survie et pouvaient se différencier en terminaux qui eux, avaient de meilleures fonctions cytotoxiques²³¹. Dans cette étude, le traitement α PD-1 induit un élan prolifératif dans les LT CD8 progéniteurs et augmente la différenciation en LT CD8 terminalement épuisé, comme ce qui a été démontré en infection chronique^{186,231}. Des observations similaires ont également été faites chez l'humain²³². Ainsi, dans le contexte du cancer, les traitements d'anticorps bloquant ciblant la voie PD-1/PD-L1 ne suffisent pas à renverser l'épuisement au niveau épigénétique pour restaurer la fonctionnalité des LT CD8 terminaux. En revanche, le traitement peut induire la prolifération de la population TCF1+ intratumorale pour donner lieu à des LT terminalement épuisés avec des fonctions effectrices plus fortes, afin d'éliminer la tumeur (Fig. 7).

2.2.3 Infiltration des LT CD8 dans le TME

Plusieurs études ont déjà mis en lumière l'importance majeure de la présence de LT CD8 dans la tumeur pour un pronostic favorable et une meilleure survie des patients²³³⁻²³⁵. Chez les patients atteints de carcinome du colon, il a été reconnu que l'utilisation d'un immunoscore aide à mieux prédire le pronostic et les risques de rechutes de la maladie que le système classique de classification TNM (tumeur, nodule, métastase). Cet immunoscore est basé sur la quantification des patrons d'activation de cellules immunitaires dans le TME et prends entre autre en compte la densité de LT CD3+ et CD8+ dans la tumeur et dans ses marges invasives^{236,237}. La présence de LT CD8 dans la tumeur peut également servir de biomarqueur pour prédire la réponse aux anticorps bloquants²³⁸. Ainsi, il est évident qu'une réponse antitumorale efficace dépend de la présence des LT CD8 dans la tumeur, qui doivent être capables d'infiltrer la tumeur et de s'y localiser.

D'une part, l'infiltration des LT CD8 a été caractérisée dans différentes tumeurs humaines et il a été constaté que l'ampleur de la réponse antitumorale au sein d'une tumeur donnée dépendait de la capacité des cellules terminalement différenciées TCF1- à être générée par les progéniteurs ou *stem-like* TCF1+. Cela indique que l'infiltration de LT CD8 exprimant TCF1 est importante dans la réponse antitumorale²³⁹.

D'autre part, l'expression de certains récepteurs chimiotactiques est nécessaire afin d'assurer la migration des LT CD8 et leur infiltration dans la tumeur. En effet, dans le contexte de mélanomes murins B16-OVA, des études de délétions géniques de différents récepteurs chimiotactiques ainsi que l'utilisation de toxines permettant l'inhibition de récepteurs couplés aux protéines G ont permis de mettre en lumière l'importance du rôle de CXCR3 pour la localisation des LT CD8 dans la tumeur lors d'une thérapie adoptive. En effet, l'interaction de CXCR3 avec ses ligands est essentielle à l'adhésion stable dans les vaisseaux sanguins tumoraux des LT CD8 transférés adoptivement et subséquemment, à leur migration transendothéliale dans la tumeur. Ainsi, l'absence de CXCR3 rend le traitement par thérapie adoptive inefficace en limitant l'accumulation de LT CD8 transférés dans la tumeur²⁴⁰. Chez l'humain, l'expression de CXCR3 sur les LT CD8 spécifiques à la tumeur a été associée à une meilleure survie²⁴¹. Toutefois, dans un modèle de carcinome du colon MC38 où les souris implantées expriment ou non CXCR3, il n'y avait pas de différence au niveau de l'abondance des TIL CD8 ou de la survie des souris entre les souris mutantes et sauvages. Cela souligne l'importance de l'expression du récepteur chimiotactique lors du transfert adoptif en comparaison à une réponse endogène²⁴².

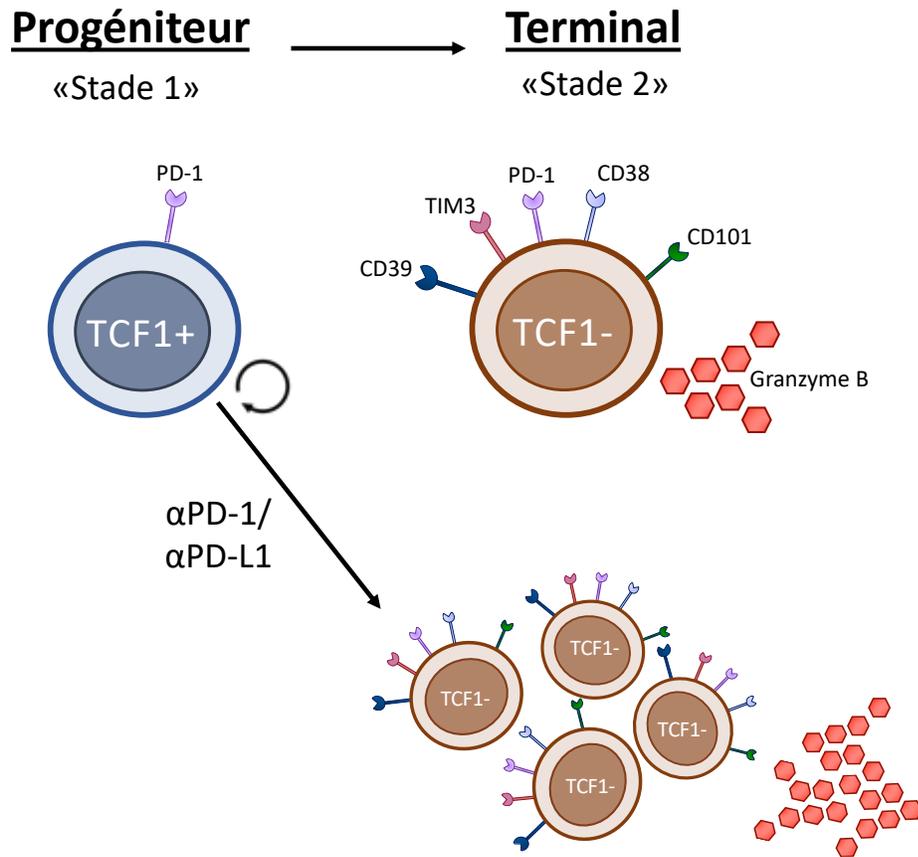


Figure 7. – Épuisement des LT CD8 dans le TME

Dans le TME, il est possible de retrouver des LT CD8 épuisés progéniteurs (TCF1+) et terminaux (TCF1-). Les LT progéniteurs, au stade 1, sont épigénétiquement plus plastiques, ont des capacités d'autorenouvellement et une meilleure capacité de survie. En réponse aux anticorps bloquants (α PD-1/ α PD-L1), il y a un élan prolifératif des LT progéniteurs et leur différenciation en LT terminaux qui, au stade 2, sont épigénétiquement plutôt fixés, mais ont de meilleures capacités cytotoxiques, entre autres par la production de GrzmB. Les deux sous-populations expriment PD-1, mais les LT terminaux expriment aussi différents récepteurs inhibiteurs, comme Tim3, CD39, CD38 et CD101.

3. Voie de signalisation Notch

Au début du siècle, des expériences de génétiques impliquant le croisement successif de drosophiles ont permis d'identifier le phénotype mutant d'ailes encochées ou *Notched wings*^{243,244}. C'est seulement dans les années 80 que le gène *Notch* a été cloné, permettant l'identification de la structure du récepteur^{245,246}. De nos jours, il est connu que cette voie de signalisation, qui est extrêmement conservée dans l'évolution, dirige de nombreux choix de différenciation binaire et de polarisation cellulaire, incluant la différenciation des neurones chez les métazoaires²⁴⁷, l'induction du mésoderme durant l'embryogénèse chez *C. elegans*²⁴⁸ et le choix de l'engagement vers les lignées lymphoïdes B ou T chez les mammifères²⁴⁹⁻²⁵¹.

3.1 Mécanismes généraux de la voie Notch

La voie de signalisation est généralement activée suite à l'engagement des récepteurs avec leurs ligands, exprimés sur une cellule adjacente à celle qui reçoit le signal. Dans la voie canonique, l'interaction ligand-récepteur mène à un clivage du récepteur Notch, permettant la libération de son domaine intracellulaire (NICD) et sa translocation au noyau. Il va s'y associer avec son partenaire transcriptionnel RBPJ κ , qui est lié à l'ADN au promoteur des gènes cibles de la voie Notch (Fig. 9). En absence du NICD, RBPJ κ est associé avec des corépresseurs de la transcription, mais la translocation au noyau du NICD et son association avec RBPJ κ induit l'exclusion des corépresseurs et le recrutement de co-activateurs de la transcription permettant ainsi l'expression des gènes cibles de la voie. Toutefois, il existe d'autres mécanismes d'activation de la voie Notch, dits non canoniques. Ceux-ci incluent des mécanismes pouvant être indépendants des ligands la voie, indépendants de l'association du NICD avec RBPJ κ ou encore indépendant du clivage du récepteur²⁵²⁻²⁵⁸.

3.2 Récepteurs et ligands de la voie Notch

Chez les mammifères, la voie Notch comprend quatre récepteurs, soit Notch1 à Notch4 (N1-N4), et cinq ligands soit Jagged1 et 2 (Jag1-2), ainsi que Delta-like1, 3 et 4 (DLL1, 3 & 4). La portion extracellulaire contient 29 à 36 domaines EGF-like repeat, responsable d'interagir avec le ligand, ainsi que trois domaines de régulation négative riches en cystéine (NRR), empêchant

l'activation du récepteur indépendamment de la présence de ligand. La région transmembranaire contient un domaine d'hétérodimérisation (HD).

La portion cytoplasmique comprend un domaine servant à la liaison avec RBPJK (RAM), deux signaux de localisation nucléaire (NLS), un domaine de transactivation (TAD) ainsi qu'un domaine PEST du côté C-terminal, servant de signal de dégradation protéasomale du NICD. Les ligands contiennent tous des domaines EGF-like repeat, ainsi qu'un domaine conservé, soit le domaine Delta, Serrate et Lag (DSL), situé du côté N-terminal²⁵⁹ (Fig. 8).

Différentes modifications post-traductionnelles permettent de rendre le récepteur fonctionnel et de réguler l'affinité de son interaction avec les différents ligands. Lors du trafic dans l'appareil de Golgi, il y a d'abord clivage protéolytique du récepteur Notch au niveau du site 1 (S1) par une furine-like convertase. Cela permet la formation d'un hétéromère, puisque les deux parties du récepteur restent associés par des liaisons non covalentes^{260,261}. De plus, il y a également ajout de sucres O-glucose sur les sérines de la portion extracellulaire du récepteur (EGF-repeat) et O-fucose sur les thréonines. Ces sucres serviront de points d'ancrage pour la glycosylation via des glycosyltransférases de la famille Fringe²⁶²⁻²⁶⁴. Ces glycosylations de sites spécifiques EGF-like repeat permettent soit de favoriser ou d'inhiber l'interaction avec les différents types de ligand, soit DLL ou Jag, de manière préférentielle²⁶⁵⁻²⁶⁷.

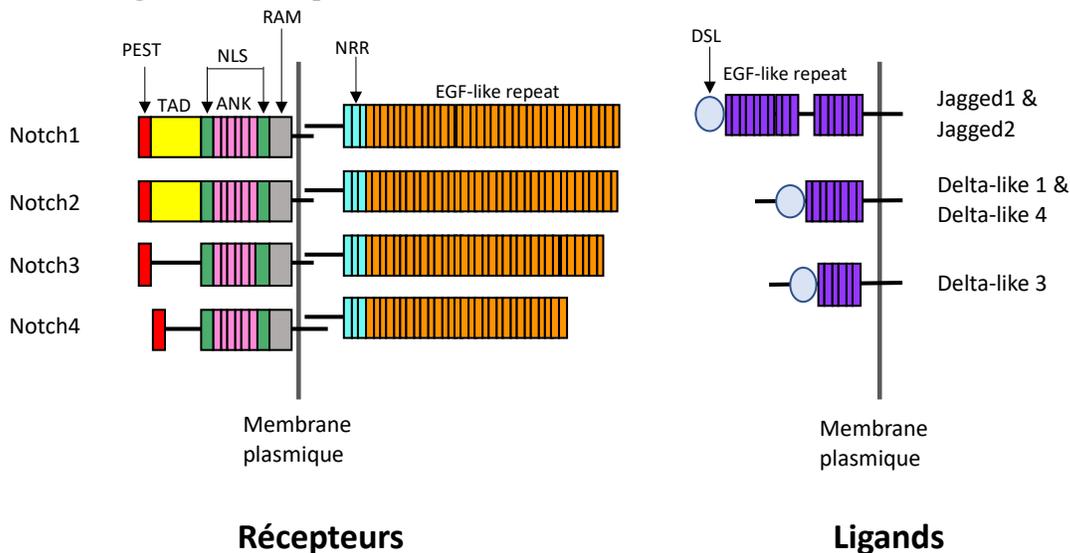


Figure 8. – Schéma des récepteurs et ligands de la voie de signalisation Notch.

À gauche, les récepteurs de la voie Notch et leurs domaines. À droite, les ligands de la voie et leurs domaines. Adapté de l'article de revue de Radtke *et al.* (2004)²⁵⁹

3.3 Activation de la voie de signalisation Notch

Il est communément admis que l'interaction ligand-récepteur génère une force de traction sur le récepteur, ce qui induirait un changement de conformation dans le domaine NRR du récepteur, ce qui rend le site 2 (S2) au niveau extracellulaire accessible au clivage par les métalloprotéases ADAM²⁶⁸. Il va s'ensuivre un second clivage protéolytique au niveau de la membrane, au site 3 (S3), catabolisé par la γ -sécrétase et permettant ainsi la libération du NICD²⁶⁹. (Fig. 5) Celui-ci migre alors au noyau où il peut s'associer avec RBPJ κ , une protéine fixée à l'ADN qui régule négativement la transcription. En effet, RBPJ κ effectue le recrutement de corépresseurs tels que SMRT, HDAC1 et HDAC2, qui sont des histones déacétylases qui contribuent au maintien de la condensation de la chromatine, réprimant ainsi la transcription²⁷⁰⁻²⁷². La formation du complexe NICD-RBPJ κ permet l'exclusion de ces corépresseurs et le recrutement de MAML (Master mind-like) qui semble servir de protéine d'échaffaudage permettant la formation d'un complexe transcriptionnelles incluant d'autres co-activateurs, notamment p300, PCAF et PBAF, ce qui mène à une ouverture de la chromatine et à l'induction de la transcription de gènes cibles²⁷³⁻²⁷⁵ (Fig. 9).

La durée du signal Notch est limitée par différentes enzymes ciblant le domaine PEST (Fig. 8), riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine. Ainsi, des événements de phosphorylation et d'ubiquitinylation de PEST mèneront à la dégradation protéosomale du NICD et à l'arrêt du signal. D'abord, la phosphorylation du domaine intracellulaire de Notch2 (NICD2) par la protéine glycogène synthase β kinase (GSK3 β) peut empêcher d'induire l'expression des gènes cibles tandis qu'elle peut contribuer à la stabilisation du NICD1^{276,277}. La *Cyclin C/cyclin-dependant kinase* (CDK8) est également capable de phosphoryler le NICD et favoriser sa dégradation²⁷⁸. Ensuite, l'une des protéines responsable de l'ubiquitinylation du NICD est la F-box et WD-40 domain (Fbxw7) de types E3 ubiquitines ligases, provoquant la dégradation par le protéasome du NICD^{279,280}. De plus, la protéine NUMB est capable de coopérer avec la E3 ligase Itch afin d'ubiquitinyler Notch1 à la membrane, ce qui provoque l'endocytose du récepteur et la régulation négative de la transduction du signal en aval^{281,282}.

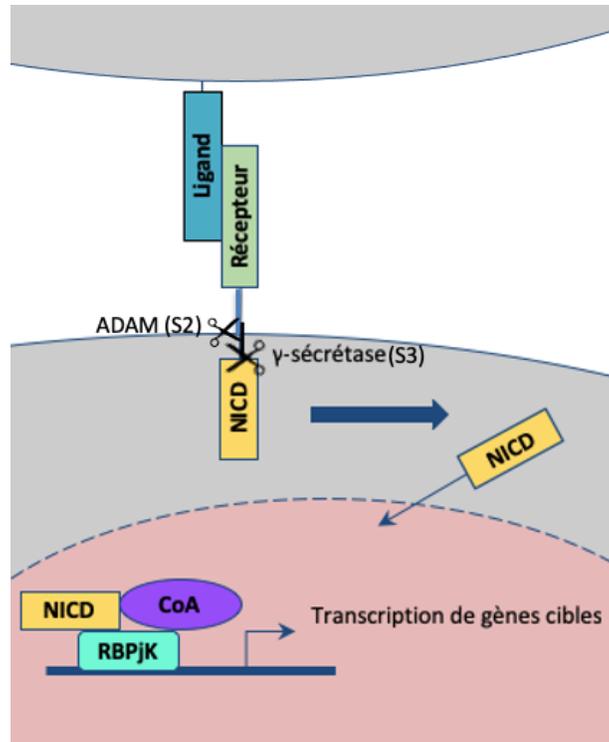


Figure 9. – Schéma de la voie de signalisation Notch.

L'interaction ligand-récepteur mène à un clivage du récepteur Notch, permettant la libération de son domaine intracellulaire (NICD) et sa translocation au noyau. Il va s'y associer avec son partenaire transcriptionnel RBPJK, qui est lié à l'ADN afin d'induire la transcription de gènes cibles.

7.4 Rôle de la voie de signalisation Notch dans le système immunitaire

Dans le système immunitaire, la voie Notch est connue pour avoir un rôle dans le choix de différenciation des LT dans le thymus, ainsi que dans l'amplification du choix de différenciation des LT CD4 en LT auxiliaires^{283,284}. En effet, la délétion de Notch1, DLL4 ou de RBPJK, empêche l'engagement des thymocytes en lignée T et favorise l'accumulation de LB dans le thymus, indiquant que la voie régule le choix de différenciation en LT ou LB chez les progéniteurs thymiques²⁸⁴⁻²⁸⁷. Lors du développement thymique, la voie Notch est requise de l'étape double négative 1 (DN1) jusqu'au stade DN3 pour le réarrangement de la chaîne β du TCR et la β sélection²⁸⁸⁻²⁹³. D'autre part, le signal Notch régule également la différenciation des LB immatures en LB de la zone marginale (MZB). En effet, la délétion de Notch2 et DLL1 limite l'accumulation de MZB dans la rate^{294,295}. De plus, la délétion génétique conditionnelle de RBPJK ou de MAML1

empêche la génération de MZB, confirmant l'importance du rôle de la voie canonique de Notch dans ce choix de différenciation²⁹⁶⁻²⁹⁸.

3.4.1. Rôle de la voie de signalisation Notch dans les LT CD4

Les LT CD4 naïfs expriment les récepteurs Notch1 et Notch2 et suite à leur activation, il y a une augmentation rapide de l'expression des récepteurs, indiquant un rôle pour la voie de signalisation Notch dans la réponse des LT CD4^{299,300}. En effet, dans une étude effectuée *in vitro*, l'inhibition de l'ensemble des récepteurs de la voie Notch par l'utilisation d'un inhibiteur de la γ -sécrétase (IGS) limitait la prolifération des LT CD4 activés et impliquait une diminution de l'expression de CD25, alors que la surexpression du NICD1 permettait d'augmenter l'expression de CD25. Ainsi, les auteurs postulent que la voie Notch peut sensibiliser les LT CD4 au signal de l'IL-2 via l'expression de CD25³⁰⁰.

Il a été démontré que la voie Notch jouait un rôle dans le choix de différenciation des LT CD4 en différents sous-types de LT auxiliaires. D'une part, l'implication de la voie de signalisation dans la différenciation en Th2 a été démontré par l'utilisation d'un modèle génétique d'inhibition de tous les récepteurs Notch ainsi qu'un modèle de surexpression du NICD1^{301,302}. En effet, suite à une infection par l'helminthe gastro-intestinal *Trichuris muris*, les souris dont les LT CD4 étaient déficients pour le signal Notch présentaient une persistance de l'infection parasitaire ainsi qu'un défaut de la production de cytokine de type Th2, comme l'IL-4³⁰¹. De plus, la voie Notch régule l'expression du facteur de transcription GATA3, un gène régulateur maître de la différenciation en Th2, et ils peuvent ensemble agir de manière synergique pour promouvoir l'expression de l'IL-4³⁰². RBPJ κ peut se lier directement au promoteur proximal du gène *Gata3*, mais il peut également lier la séquence amplificatrice (*enhancer*) en amont du gène *Il4*^{299,302,303}. D'autre part, il a également été établi que la voie Notch jouait un rôle dans la différenciation des LT CD4 en Th17. En effet, l'inhibition de la voie Notch par l'utilisation d'IGS ou d'anticorps bloquants pour les ligands de type DLL induisait une diminution de la production de l'IL-17 par les LT CD4, une des cytokines caractéristiques des Th17^{304,305}. De plus, des études d'immunoprécipitation de la chromatine ont démontré que RBPJ κ pouvait directement lier les promoteurs de l'*Il17* et de *Rorc*, un gène régulateur maître de la différenciation en Th17³⁰⁴⁻³⁰⁶.

D'autres études ont suggéré que c'est la famille de ligands de Notch, soit Jagged ou DLL, qui régule la différenciation des LT CD4 en Th1/Th2. En effet, la surexpression de différents ligands de la voie Notch sur les CPA a permis d'établir que la famille Jagged favorisait la différenciation des LT CD4 naïfs en Th2 tandis que la famille DLL favoriserait une différenciation de type Th1²⁸³.

Toutefois, c'est l'étude de Bailis *et al.* (2013) qui a mis en évidence que la voie Notch régule simultanément les différents programmes transcriptionnels de différenciation des LT CD4 en Th1, Th2 ou Th17, plutôt que de favoriser un choix de différenciation spécifique. Les auteurs démontrent que le NICD1, dans des LT CD4 différenciés en Th17, se lie aussi aux promoteurs des gènes associés au choix de différenciation en Th1, comme *Tbx21*, et en Th2, comme *Il4* et *Gata3*, en plus de se lier à *Rorc* et *Il17a*, associé à la différenciation en Th17. En effectuant une dilution en série des cytokines polarisante pour ces différents choix de différenciation, en présence ou en absence du signal Notch, les auteurs ont démontré que la voie Notch permet en fait de sensibiliser les LT CD4 aux cytokines de l'environnement afin d'orienter le choix de différenciation³⁰⁷.

3.4.2. Rôle de la voie de signalisation Notch lors de la réponse CD8

Le rôle de Notch a également été étudié dans la réponse des LT CD8. Chez les cellules naïves, les récepteurs Notch 1 et Notch 2 sont exprimés à des niveaux faible et intermédiaire, respectivement, mais l'activation des LT CD8 induit une forte augmentation de l'expression des récepteurs. Quant aux récepteurs Notch3 et Notch4, ils ne sont pas du tout exprimés dans les LT CD8 naïfs ou activés³⁰⁸⁻³¹². De manière semblable aux LT CD4, l'inhibition *in vitro* de la voie Notch par un traitement d'IGS limite la prolifération des LT CD8 suite à leur activation^{309,310}. Les LT CD8 traités avec l'IGS présentaient également une diminution de l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD25 ainsi qu'une diminution de la production d'IFN γ et d'IL-2. Toutefois, l'activation de LT CD8 transgénique exprimant de plus faibles niveaux d'expression du récepteur Notch1 (provenant de souris Notch1AS portant un transgène anti-sens pour Notch1 sous le contrôle du promoteur du virus de la tumeur mammaire murine) ne menait pas à une diminution de la prolifération des LT CD8 activés, bien qu'elle impliquait également une diminution de leur production d'IFN γ et d'IL-2³⁰⁹. Ces résultats suggèrent donc une redondance du rôle des récepteurs

Notch1-2 dans la prolifération des LT CD8 suite à leur activation. Globalement, ces résultats démontrent l'importance de la voie de signalisation Notch dans l'activation des LT CD8.

Dans un modèle d'infection par *Trypanosoma cruzi*, il a été constaté qu'en l'absence de Notch2 dans les LT CD8 matures, il y avait une diminution de la production de GrzmB. De plus, le taux de survie était similaire chez les souris Notch2 déficientes et les souris dont les LT CD8 ont été déplétés, suggérant que la délétion de Notch2 rend les LT CD8 incapable de combattre l'infection. Des expériences de Chip ont permis d'établir que le NICD2 s'associe à p300 et une forme phosphorylée de CREB1 pour former un complexe dans le promoteur du gène de la GrzmB afin d'induire sa transcription³⁰⁸. Dans un modèle de stimulation *in vitro* des LT CD8, il a également été démontré que le NICD1 pouvait se lier au promoteur de la GrzmB et de la perforine et que l'inhibition de la voie par des IGS abrogeait l'expression de ces molécules effectrices³¹³. Ainsi, l'expression des récepteurs Notch1 et Notch2 est essentielle au contrôle du pathogène ainsi qu'à l'acquisition des fonctions cytolytiques.

Dans un modèle d'influenza où il y avait délétion des récepteurs Notch1 et Notch2 sous le contrôle de la CD4 Cre, soit dans les LT CD8 et CD4, il y avait également une diminution de la production de GrzmB, de la perforine et de l'élimination du virus. Les auteurs ont aussi constaté une diminution de la génération d'effecteurs à demi-vie courte, soit de LT CD8 SLEC (KLRG1+CD127-) alors que la surexpression du NICD, leur a permis de rétablir la génération de SLEC³¹⁴. Par l'utilisation du modèle infectieux *Listeria*-OVA, notre laboratoire a également déterminé que l'absence de Notch1 et Notch2 dans les LT CD8 matures impliquait une diminution de la génération de SLEC au pic de la réponse effectrice³¹⁵.

Dans un modèle d'alloimmunité, le transfert de moelle osseuse provenant de souris C57BL/6 dans des souris hôtes BALB/c ou BALB/b induit la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) et implique la mort rapide des souris hôtes à cause de l'incompatibilité des CMH. Toutefois, si la voie la voie Notch est inhibée dans les LT CD4 et CD8 donneurs au niveau génique ou par l'usage d'anticorps bloquants pour les ligands DLL1-4, il y a une diminution de la sévérité de la GVH et de la mortalité. De plus, en l'absence de la voie Notch, les LT CD8 alloréactifs purifiés conservent une forte activité cytotoxique *ex vivo*³¹⁶⁻³¹⁸. Ainsi, l'inhibition de la voie Notch

constituerait une avenue thérapeutique intéressante pour les leucémies lors de la greffe de moelle osseuse.

3.4.2.1 Rôle de la voie Notch dans la réponse antitumorale des LT CD8

La voie Notch joue également un rôle important dans la prévention du développement de cancer, à travers son implication dans la réponse antitumorale des LT CD8. En effet, dans un modèle tumoral de thymome transfecté pour exprimer le peptide OVA (EG7), l'implantation de ces tumeurs dans des souris déficientes soit pour Notch1 ou pour Notch2 dans les LT CD8 matures (sous le contrôle d'une Cre E8i) provoque une diminution de la survie en l'absence du récepteur Notch2, mais pas du récepteur Notch1. Les mêmes résultats ont été obtenus en transfert adoptif et en utilisant un anticorps bloquant pour Notch2. Dans le modèle LLC-OVA et le modèle MT5, la délétion spécifique de DLL1 sur les DC diminue le contrôle tumoral et la survie des souris. De plus, il y avait une plus grande génération de cellules Treg dans les tumeurs de souris déficientes pour DLL1³²⁰.

Dans un modèle où la surexpression du NICD1 est sous le contrôle d'une Cre dans le promoteur du gène de la GrzmB, soit dans les cellules activées, il a été démontré que la présence du NICD1 permet un meilleur contrôle tumoral suite à l'implantation de *Lewis Lung Carcinoma* exprimant OVA (LLC-OVA). Les auteurs suggèrent que le meilleur contrôle tumoral serait dû à de meilleures fonctions effectrices, c'est-à-dire une plus forte production d' IFN γ par les souris transgéniques³²¹.

3.4.2.2. Rôle de la voie Notch dans la leucémie lymphoblastique aigüe

Malgré l'importance que la voie Notch peut avoir dans les traitements par thérapie adoptive antitumorale, une activité aberrante de la voie de signalisation peut également mener au développement de cancer. En effet, une étude effectuée sur des lignées cellulaires ainsi que chez des patients pédiatriques a permis d'établir que plus de 50% des leucémies lymphoblastiques aigües (T-ALL) présentaient une mutation du gène de Notch1³²². L'activation constitutive de la voie a initialement été démontrée dans les leucémies présentant une translocation t(7;9)(q34;q34.3), ce qui induisait l'expression du récepteur NOTCH1 tronqué, ce qui permettait soit l'activation de la voie sans le clivage protéolytique par la γ -sécrétase, ou encore une sensibilité

accrue à cette enzyme menant son clivage constitutif^{323,324}. Une autre étude de criblage des lignées T-ALL lors d'un traitement d'IGS, a mis en évidence deux mutations dans le récepteur Notch1, soit les domaines HD et PEST³²². Ces mutations peuvent rendre le récepteur Notch1 plus susceptible au clivage indépendamment de la présence du ligand ou le NICD1 moins susceptible à la dégradation protéolytique suite à sa translocation au noyau, ce qui augmente sa demi-vie et prolonge la durée du signal suite à l'activation^{322,325-327}. Une activité aberrante de la voie Notch est délétère due entre autres à son rôle dans la régulation de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, dans le cycle de division cellulaire, dans la voie NFκB et la modulation épigénétique de l'expression génique^{322,328-331}.

3.5 Signature génique associée à la voie de la signalisation Notch

Tel que précédemment mentionné, la voie de signalisation Notch est connue pour réguler l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LT CD4 auxiliaires, tels que GATA3, RORC et T-bet³⁰⁷. Elle régule également l'expression de plusieurs molécules effectrices chez les LT CD8, comme la GrzmB et la perforine^{308,313}. Toutefois, les mécanismes moléculaires en aval de la voie Notch régulant la différenciation des LT CD8 en SLEC ou en MPEC sont encore incompris.

Afin d'élucider ces mécanismes, une expérience de séquençage de l'ARN des cellules effectrices CD44^{hi} a été effectuée au pic de la réponse soit à J10 post-infection par influenza, dans un modèle où l'expression de Notch1 et Notch2 est déficiente dans les LT CD4 et CD8. Ainsi, l'équipe de Baker *et al.* constate un enrichissement d'une signature SLEC dans les cellules sauvages par rapport aux mutantes. Leurs résultats les mènent à la conclusion que la voie Notch régule le programme transcriptionnel SLEC, entre autres par la régulation de l'expression de T-bet et de CD25. Or, à J10, l'engagement dans le choix de différenciation de SLEC ou MPEC est déjà effectué. Ainsi, l'étude du transcriptome à un stade aussi tardif ne fait que montrer le profil d'expression de gènes de cellules déjà différenciées en effecteurs et l'expression différentielle de T-bet en l'absence de Notch reflète plutôt le biais de différenciation en SLEC plutôt qu'un rôle régulateur³¹⁴.

Tel que précédemment mentionné, notre laboratoire a également déterminé que l'absence de Notch1 et Notch2 dans les LT CD8 matures impliquait une diminution de la génération de SLEC au pic de la réponse effectrice suite à une infection par *Listeria*-OVA. De plus, l'absence des récepteurs n'impliquait pas un changement au niveau des facteurs de transcription clés responsable de la différenciation SLEC-MPEC tels que T-bet et Blimp1. Toutefois, il y avait une différence dans l'expression de CD25³¹⁵.

Entre 12 et 24h suivant l'activation des LT CD8 *in vitro*, il y a un pic de l'expression des récepteurs Notch 1-2 qui est maintenu jusqu'à 96h³⁰⁸⁻³¹⁰. De plus, par l'usage d'anticorps bloquants pour les ligands de la voie Notch, DLL1 et DLL4, les membres de notre laboratoire ont établi que le signal Notch était requis tôt dans la réponse à l'infection pour permettre la génération des SLEC (résultats non publiés). Afin de déterminer les mécanismes moléculaires répondant en aval de la voie Notch, les membres du laboratoire ont séquencé l'ARN de LT CD8 OT-I transférés dans des souris congéniques à J3 post-infection par *Listeria*-OVA. Ces LT CD8 étaient sauvages ou déficients pour les récepteurs Notch1 et Notch2, ce qui a permis l'identification de 217 gènes différentiellement exprimés en l'absence du signal Notch. Nous avons sélectionné plusieurs signatures issues de la littérature qui sont représentatives du rôle de la voie Notch dans plusieurs contextes immunologiques. Celles-ci ont été comparées avec notre signature afin de pouvoir prioriser les gènes cibles de la voie Notch dans les LT CD8 activés que nous souhaitons étudier.

D'abord, l'utilisation des données de séquençage de co-immunoprécipitation de la chromatine (Chip-seq) issues de trois études nous a permis d'établir un premier critère de priorisation pour notre signature, en fonction des gènes connus comme étant des cibles transcriptionnelles directes de Notch1 dans le contexte des leucémies de type T-ALL. En effet, tel que précédemment mentionné, le signal Notch joue un rôle important dans le développement de ces leucémies. Plusieurs études ont cherché à élucider les mécanismes de la régulation transcriptomique par Notch1 en effectuant des études de Chip-seq sur différentes lignées cellulaires de type T-ALL, permettant l'identification des régions de la chromatine où RBPJ κ peut se lier en collaboration avec le NICD1 pour réguler l'expression de gènes cibles de la voie. Ainsi la première étude du laboratoire de Jon C. Aster, effectuée sur des lignées T-ALL humaines et murines, a mis en évidence que les régions de la chromatine contenant des sites de liaison pour RBPJ κ et NICD1 se retrouvaient en partie dans la région promotrice des gènes, soit à moins de 2

kilobases d'un site d'initiation de la transcription. Toutefois, l'expression de la plupart de ces gènes n'a pas été influencée par l'inhibition de la voie Notch via l'utilisation d'IGS. De plus, beaucoup de gènes cibles connus de la voie Notch ne présentaient pas de sites de liaison dans une région promotrice, suggérant une régulation de l'expression par la liaison de régions amplificatrices, situées à plus de 2 kilobases d'un site d'initiation de la transcription³³². Dans la seconde étude, l'équipe de Jon C. Aster a utilisé une approche où les lignées T-ALL étaient traitées avec l'IGS, ce qui déplète les cellules du NICD1 et implique une accumulation à la membrane du récepteur Notch1 ayant seulement été clivé par la métalloprotéase ADAM. Suite au lavage de l'IGS, Notch1 peut être clivé par la γ -sécrétase, ce qui permet d'activer la voie Notch à un temps précis. Les auteurs ont donc effectué leur étude de séquençage 72h post-traitement par IGS et 4h post-lavage de l'IGS afin d'étudier les sites dynamiques de liaison à la chromatine par RBPJ κ et NICD1. Ils ont établi que ces sites de liaison dynamiques étaient essentiellement situés dans des régions distales amplificatrices dites *superenhancer*, validant les hypothèses de la première étude³³³. Dans la troisième étude, l'équipe de Susan Chan a mis en évidence le rôle du facteur de transcription IKAROS comme répresseur transcriptionnel des gènes de la voie Notch dans différentes lignées T-ALL et dans les thymocytes au stade DN4 et DP du développement thymique. Leurs analyses de Chip-seq leur ont également permis de confirmer la présence fréquente de sites de liaison de RBPJ κ dans des régions situées loin d'un site d'initiation de la transcription, soit dans une région amplificatrice³³⁴.

Ensuite, notre second critère de priorisation est basé sur les gènes différentiellement exprimés en l'absence du signal Notch dans les LT CD4 dans le contexte de la GVH. Le laboratoire d'Ivan Maillard, un de nos collaborateurs à l'Université de Pennsylvanie, s'est intéressé aux impacts moléculaires de la voie Notch dans les LT CD4 alloréactifs suite à leur activation. Ainsi, ils ont utilisé le modèle murin 4C, où les LT CD4 expriment un TCR transgénique spécifique pour un antigène du CMH de classe II I-A^d, et rétrocroisé avec des souris Rag1^{-/-}, afin de garantir l'absence de Treg et d'étudier spécifiquement les LT CD4 conventionnels. La moelle osseuse de ces souris 4C a été transférée comme contrôle, dans des souris irradiées B6. SJL, qui sont syngénique ou dans des souris irradiées Balb/c qui sont allogéniques. Les souris alloréactives ont été traitées avec un contrôle isotypique ou avec des anticorps bloquant pour DLL1-4 le jour de la transplantation afin d'inhiber la voie Notch lors de l'activation des LT CD4 alloréactif. À 42h post-

transplantation, les cellules 4C ont été isolées afin de séquencer leur transcriptome et d'identifier 294 gènes différentiellement exprimés dans les LT alloréactifs en l'absence du signal Notch³³⁵.

Pour finir, notre troisième critère se base sur une étude de séquençage des régions ouvertes de la chromatine contenant des sites de liaison pour RBPJ κ suite à l'activation des LT CD8. L'équipe de Pipkin cherchait à identifier des facteurs de transcription capable de moduler l'accessibilité de la chromatine pour diriger la différenciation des LT CD8 activés en SLEC ou en MPEC. Pour ce faire, ils ont stimulé des LT CD8 *in vitro* à l'aide d'anticorps contre CD3 et CD28 pendant 0h, 2h, 6h, 12h ou 24h et ont isolé les noyaux de ces cellules afin d'effectuer l'ATAC-seq. Ils ont ainsi identifié les régions différentiellement ouvertes de la chromatine suite au signal TCR et ont constaté un enrichissement pour la présence de motifs de liaison de type RUNX. En utilisant différentes approches de délétion géniques des facteurs de transcription de la famille Runx dans le modèle d'infection par LCMV Arm, les auteurs constatent que la protéine Runx3 peut restreindre la génération des SLEC et est nécessaire à la différenciation en MPEC ainsi qu'à la formation de cellules mémoires *bona fide*. Notre laboratoire a effectué des études bio-informatiques sur leurs données d'ATAC-seq afin d'identifier les régions différentiellement accessibles contenant des motifs de liaison pour RBPJ κ ³³⁶.

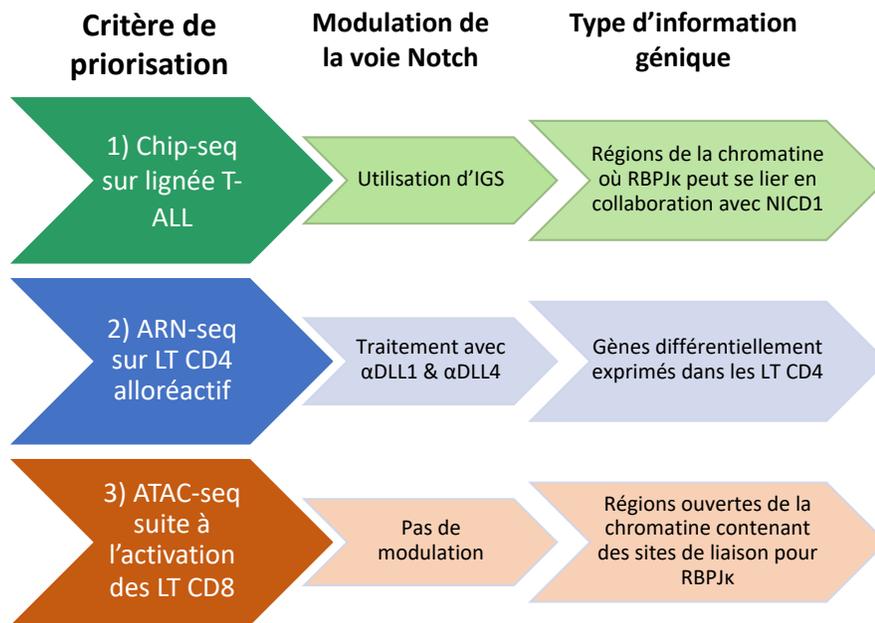


Figure 10. – Résumé des trois critères de priorisation

Chaque critère de priorisation représente une signature issue de la littérature qui est représentative du rôle de la voie Notch dans un contexte immunologique donné. La modulation de la voie Notch permet d'identifier les gènes qui sont différemment impliqués lorsque le signal Notch est présent ou non.

Raisonnement et hypothèse

Le choix de différenciation des LT CD8 joue un rôle crucial dans l'établissement d'une réponse immunitaire efficace et dans la génération de LT mémoire. La voie de signalisation Notch, qui est extrêmement conservée dans l'évolution, dirige de nombreux choix de différenciation binaire, dont le choix de différenciation des LT CD8 périphériques. Le signal Notch peut être abrogé dans les LT CD8 activés par la délétion génétique des récepteurs Notch1 et Notch2. Nous avons exploité cette stratégie pour étudier le rôle de la voie Notch dans la différenciation des LT CD8 dans le contexte d'une infection aiguë par *Listeria-OVA*. Notre laboratoire a ainsi déterminé que l'absence du signal fournie par les récepteurs Notch1 et Notch2 dans les LT CD8 matures limitait leur différenciation en SLEC³¹⁵.

Considérant que les cibles transcriptionnelles de Notch pouvant diriger le choix de différenciation des LT CD8 effecteurs n'ont toujours pas été identifiées, les membres de mon laboratoire ont séquencé l'ARN de LT CD8 déficients ou non pour Notch1 et Notch2 à J3 post-infection par *Listeria-OVA* et ont ainsi identifié 217 gènes différentiellement exprimés. En effectuant la comparaison de ce transcriptome avec une signature de résidence mémoire, il a été constaté que l'absence de Notch démontrait un enrichissement pour la signature de résidence. Le laboratoire a également déterminé que l'absence du signal Notch favorisait la génération de Trm dans le foie dans différents modèles expérimentaux (résultats non publiés). Il est connu que les Trm ont tendance à s'accumuler dans les tumeurs épithéliales et que leur accumulation est associée à un meilleur pronostic^{157-159,337,338}. Ces cellules auraient un meilleur potentiel cytotoxique par rapport aux autres types de TIL. Il a également été constaté que les Trm issus de TIL de patients atteints de NSCLC montraient un enrichissement des gènes associés à la voie Notch¹⁴⁹.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les gènes différentiellement exprimés chez les LT effecteurs en l'absence du signal Notch jouent un rôle dans la différenciation MPEC/SLEC et que l'absence de ce signal permet un meilleur contrôle tumoral par les LT CD8, via leur capacité à se différencier en Trm.

Les objectifs de mon projet de maîtrise consistaient à:

1. Identifier les gènes cibles de la voie de signalisation Notch contrôlant la différenciation MPEC/SLEC à la suite d'une infection aiguë par Lm-OVA
2. Évaluer si une thérapie adoptive de lymphocyte T CD8 déficients pour l'expression des récepteurs Notch1 et Notch2 permet un meilleur contrôle tumoral.

Matériel et méthode

1. Souris

Toutes les expériences ont été approuvées par le comité de protection des animaux du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les souris B6.SJL ont été élevées à l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les souris Notch1^{fl/fl} (B6.129 3 1-Notch1^{tm2Rko}/GridJ), Notch2^{fl/fl} (B6.129SNotch2^{tm3Grid}/J) et E8I-Cre (C57BL/6-Tg (Cd8a-cre)1Itan/J) ont été achetées chez « The Jackson Laboratory » et rétrocroisées sur fond C57BL/6. Les souris Notch1, Notch2 et E8I-Cre ont été croisées entre elles pour obtenir des souris E8I-Cre^{+/-} Notch1^{fl/fl} Notch2^{fl/fl} (souris déficientes pour les récepteurs Notch1 et Notch2 uniquement dans les LT CD8 matures) ou des souris Notch1^{fl/fl} Notch2^{fl/fl} (souris exprimant ces deux récepteurs à la surface des LT CD8 matures). Les souris E8I-Cre^{+/-} Notch1^{fl/fl} Notch2^{fl/fl} ont été croisées avec des souris OT-1 déficientes pour Rag-1 afin de générer des souris OT-1 déficientes pour Rag-1 et sauvages (EON1N2 fl/fl) ou déficientes (EON1N2 Δ/Δ) pour Notch1 et Notch2.

2. Infection *Listeria-OVA*

La souche bactérienne *Listeria monocytogenes* exprimant l'antigène OVA (*Listeria-OVA*) nous a généreusement été fournie par le laboratoire de Stephen Schoenberger (La Jolla Institute, San Diego, California). Les bactéries ont d'abord été inoculées dans un bouillon composé de 3 mL d'une infusion cœur-cerveau liquide (BHI; BD) supplémenté en streptomycine (50 mg/mL; Bio Basic) à une concentration finale de 200 µg/mL et incubé pendant la nuit à 37°C, 5% CO₂. Le jour de l'infection, 50 µL du bouillon à saturation a été prélevé et resuspendu dans 3 mL de milieu frais de BHI et streptomycine à incuber pendant 2h à 37°C, 5% CO₂. Après 2h d'incubation, la densité optique à 600nm (DO_{600nm}) a été mesurée afin de prélever l'équivalent de 10⁷ unités formant des colonies (UFC) diluées dans le PBS 1X stérile. Les bactéries ont ensuite été diluées en série dans le PBS 1X stérile afin d'obtenir une concentration finale de 10⁴ UFC/mL. Ainsi, les souris B6.SJL mâles ont été infectées avec une dose sous-létale de 2x10³ UFC dans un volume de 200 µL (i.v.) à l'aide d'une seringue 27G (13 mm x 0,4 mm). Afin de valider la quantité de bactéries utilisée lors de l'infection, la solution injectée a été diluée en série afin d'arriver à une concentration finale de 10³ UFC/mL. Un volume de 100 µL de cette solution a été utilisé afin d'ensemencer des pétris

de BHI Agar (BD) supplémentés en streptomycine ($C_f=200 \mu\text{g/mL}$) en triplicata et incubés à 37°C , $5\% \text{CO}_2$. Les colonies formées ont été comptées 24h plus tard.

3. Stimulation *in vitro* avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄

Le matin, les ganglions lymphatiques inguinaux, brachiaux, axillaires, cervicaux et mésentériques de souris EON1N2^{fl/fl} ou EON1N2 ^{Δ/Δ} (CD45.2+) ainsi que la rate d'une souris B6.SJL (CD45.1+) ont été récoltés dans 3 mL de RPMI_c (Tab. 1). Les LT CD8 ont été isolés en dissociant mécaniquement les organes entre deux lames givrées. La suspension cellulaire de splénocytes a également subi une lyse des globules rouges dans le NH_4Cl (Bio Basic ; $0,83\%$) pendant 5 minutes à température ambiante qui a été interrompue avec du RPMI_c. Les suspensions cellulaires de ganglions lymphatiques et de splénocytes ont été resuspendues ensemble respectivement dans un ratio de 40% d'EON1N2 (CD45.2+) pour 60% de B6.SJL (CD45.1+) à une concentration finale de 5×10^6 cellules/mL, puis mises en culture dans une plaque 6 puits à fond adhérent (Fisher), dans un volume de 4 mL par puit, en présence du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL, 10 mg/mL : New England Peptide) à une concentration finale de $0,1 \mu\text{g/mL}$ à 37°C , $5\% \text{CO}_2$.

4. Transfection pour la préparation de surnageant rétroviral

La lignée cellulaire HEK 293T nous a généreusement été fournie par le laboratoire d'Heather Melichar (CRHMR, Montréal, Québec). Une semaine avant la transfection, les cellules 293T ont été mises en culture pour expansion dans le milieu pour HEK 293T (Tab. 1). Une semaine plus tard, 8×10^6 à 12×10^6 cellules HEK 293T ont été mises dans des pétris adhérents de 150 mm avec le milieu pour HEK 293T sans antibiotique. Lorsque les cellules ont atteint une confluence de 70% à 80%, le milieu a été remplacé et les cellules ont été transfectées à l'aide de 2% de Lipofectamine 2000 (Invitrogen ; 1 mg/mL), de $36 \mu\text{g}$ du plasmide auxiliaire pCL-ECO, et de $72 \mu\text{g}$ du plasmide cible, soit pMig (vecteur vide) ou pMig-CD25, en solution dans le milieu de culture à réduction de sérum (Opti-MEM ; GIBCO). Le plasmide auxiliaire pCL-ECO contient les séquences des gènes viraux *Gag*, *Pol* et *Env*, mais est dépourvu de la séquence d'encapsidation (ψ), tandis que les plasmides cibles comprennent la séquence ψ , le gène d'intérêt et le gène rapporteur de la protéine fluorescente verte (GFP), entre autres. Le milieu des cellules a été changé le lendemain

matin et le surnageant a été récolté 48h et 72h après la transfection. Le surnageant a été centrifugé afin d'enlever les débris puis congelé à -80°C jusqu'à son utilisation pour une transduction.

5. Transduction rétrovirale

Pour la transduction rétrovirale, des cellules EON1N2 fl/fl ou Δ/Δ ont été stimulées *in vitro* avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ tel que décrit ci-dessus. 24h après l'ajout du peptide, les cellules stimulées ont été resuspendues à 2×10^6 cellules/mL en présence de Polybrene (8 $\mu\text{g/mL}$) et de surnageant (1:2) pMig ou pMig-CD25. Les cellules stimulées ont ensuite été centrifugées à 37°C pendant 1h à 2500 rpm, puis incubées pendant 1h supplémentaire à 37°C, 5% CO₂. Suite à la transduction rétrovirale, une portion des cellules a été conservée en plaque 24 puits de culture en suspension (Starstedt) dans 2 mL de RPMI_c et incubée à 37°C, 5% CO₂ pendant 48h, afin de vérifier le niveau d'activation et de transduction. Afin de les transférer adoptivement, les cellules ont été lavées trois fois au PBS 1X et resuspendues à 1.2×10^6 cellules/mL, de sorte à injecter 0.3×10^6 cellules dans 250 μL (i.v.) le lendemain de l'infection par *Listeria*-OVA. Les rates ont par la suite été prélevées à différents moments et préparées tel que précédemment décrit afin de vérifier le pourcentage de cellules CD8+CD45.2+, la proportion de cellules GFP+ et GFP- et l'expression de marqueurs d'activation au FACS.

6. Implantation tumorale

La lignée cellulaire de mélanome B16 exprimant OVA (B16-OVA) nous a généreusement été fourni par le laboratoire d'Alain Lamarre (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec). 10^6 cellules B16-OVA ont été décongelées en fin d'après-midi, dans le milieu pour B16-OVA (Tab. 1) en présence de milieu de sélection Gentamicine (G418 ; 5 mg/mL; Corning) à une concentration finale de 0.5 mg/mL, dans un flasque T175 (Thermofisher), puis incubées à 37°C et 5% de CO₂. Afin d'expander les cellules, celles-ci ont ensuite été passées en série à quatre reprises, à une fréquence qui alterne entre 48h et 72h. La concentration cellulaire a été vérifiée à chaque passage en comptant les cellules à l'hémacymètre afin de s'assurer de ne pas passer plus de 3×10^6 cellules par flasque T175 et de garantir que les cellules ne seraient pas confluentes d'ici au prochain passage. Le matin de l'implantation tumorale, les cellules ont été lavées à trois reprises dans le PBS 1X stérile (Sigma Life Science) et resuspendues à une concentration de 5×10^6 cellules/mL afin d'injecter $0,5 \times 10^6$ cellules B16-OVA de manière sous-cutanée au niveau du flanc droit de

souris B6.SJL femelles à l'aide d'une seringue avec une aiguille 25G (25mm x 0.5mm). À J7 post-implantation, lorsque les tumeurs étaient palpables, l'aire des tumeurs a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse et les souris ont été redistribuées afin de former trois groupes en fonction de l'aire tumorale, soit traitées fl/fl, traitées Δ/Δ ou non traitées (NT).

6.1 Production de LT effecteurs

À J4 post-implantation, une stimulation des LT CD8 a été démarrée tel que décrit ci-dessus. Par la suite, le milieu a été remplacé par du RPMI_c frais toutes les 24h. Au bout de 48h de culture, les cellules ont été resuspendues à une concentration de 10^6 cellules/mL, supplémentées en rhIL-2 (Novartis ; 100 unités/mL) et transférées dans les flasques T75 (Corning). Après 72h de culture, soit à J7 post-implantation tumorale, des cellules stimulées de chaque génotype ont été prélevées pour vérifier le pourcentage de cellules CD8+CD45.2+ et l'expression de marqueurs d'activation au FACS.

6.2 Thérapie adoptive

Les cellules ont été lavées trois fois dans le PBS 1X stérile et resuspendues à une concentration de 5×10^6 cellules/mL en fonction du pourcentage de cellules CD8+CD45.2+. Les souris ont été injectées par voie intraveineuse (i.v.) avec 10^6 cellules stimulées dans un volume de 200 μ L. Par la suite, l'aire tumorale (mm^2) a été mesurée aux 48h et les souris étaient euthanasiées en cas d'ulcération tumorale ou si l'aire tumorale excédait les 200 mm^2 .

6.3 Test de localisation

Les cellules EON1N2 fl/fl ou Δ/Δ ont été stimulées *in vitro* pendant 72h tel que précédemment indiqué dans la section de préparation des LT effecteurs. Après 72h de stimulation, les cellules ont été resuspendues dans le PBS 1X à 10^7 cellules/mL. Les cellules fl/fl ont été marquées au 5,6-carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE ; Molecular Probes) à 5 μ M et incubées 10 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. Le marquage a été bloqué avec du sérum NU, puis lavé deux fois au RPMI_c et deux fois au PBS 1X. Les cellules Δ/Δ ont été marquées au *Cell trace violet* (CTV ; Invitrogen) à 1 mM et incubées 20 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. Le marquage a été bloqué au RPMI_c pendant 5 minutes, puis lavé deux fois au PBS 1X. Après les lavages, les deux suspensions ont été resuspendues à une concentration de 50×10^6 cellules/mL puis mélangées à un

ratio 1:1. Les souris ont ainsi été transférées adoptivement à J11 post-implantation tumorale avec 25×10^6 de cellules dans un volume de 500 μL (i.v.). Une heure après le transfert adoptif, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et le foie, la rate, la tumeur ainsi que les ganglions lymphatiques brachiaux et inguinaux drainants la tumeur et non drainants ont été prélevés.

7. Isolation des cellules immunitaires pour marquage

Les tumeurs ont été prélevées dans 3 mL de RPMI_c sans 2-mercaptoéthanol, broyées mécaniquement entre deux lames givrées, digérées dans une solution enzymatique de DNase (Sigma Aldrich ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et de Collagénase D (Sigma Aldrich ; 1 mg/mL) pendant 15 minutes à 37°C, puis filtrées à l'aide d'un filtre 100 μm . La suspension a ensuite subi une lyse des globules rouges dans le NH_4Cl (0,83%) tel que précédemment décrit.

Les foies ont été prélevés dans une solution enzymatique de RPMI_c avec de la Collagénase D (1 mg/mL), puis découpés à l'aide de ciseaux, écrasés à l'aide d'un piston et digérés à 37°C pendant 10 minutes avant d'être filtrés à l'aide d'un filtre 100 μm . Ils ont ensuite subi une lyse des globules rouges au NH_4Cl . Les hépatocytes ont été séparés de la suspension cellulaire par un gradient de Percoll (Fisher ; 40% : 80%) et les lymphocytes ont ainsi été isolés en prélevant l'anneau situé entre les deux phases de Percoll. Le sang a été prélevé dans le PBS-EDTA (Corning) et les lymphocytes ont été isolés à l'aide d'un milieu de séparation des lymphocytes (Ficoll : Corning). La rate et les ganglions lymphatiques ont été prélevés dans 3 mL de RPMI_c et préparés tel qu'indiqué dans la partie stimulation *in vitro*.

7.1 Marquage

Les marquages ont été effectués dans des plaques 96 puits à fond ronds (Fisher) avec 3×10^6 cellules marquées par puits, sauf dans le cas des TIL, avec 10^6 cellules par puits. Les marquages de viabilité avec la teinture de viabilité zombie NIR ou Aqua (Biolegend) ainsi que le Fc block (Anti mCD16/32 récepteur Fc; Leinco Technologies) ont été effectués dans le PBS 1X à température ambiante pendant 15 minutes dans l'obscurité. Les marquages extracellulaires ont été effectués dans du tampon de marquage (DMEM sans rouge de phénol en poudre ; sérum de cheval 3% ; HEPES 30mM ; azide de sodium 1%) pendant 20 minutes à 4°C dans l'obscurité. Les marquages intracellulaires de cytokines sur les TIL ont été effectués en restimulant 10^6

cellules/puits en présence de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA; Sigma Aldrich; 50 ng/mL), d'ionomycine (Sigma Aldrich ; 500 ng/mL) et de bréfeldine A (BFA ; Alfa Aesar ; 20 µg/mL), tandis que les puits de contrôle négatif non stimulés ne contenaient que la BFA. Après 5h de restimulation à 37°C et 5% de CO₂, les cellules ont été lavées au PBS 1X et fixées avec du paraformaldéhyde 2% (H₂O distillé; 7% de PBS 10X; 5.4% de formaldéhyde 37.5% : Sigma Aldrich) pendant 20 minutes, puis lavées et conservées dans le tampon de marquage à 4 °C. Le lendemain, les cellules ont été perméabilisées pendant 10 minutes à l'aide d'un tampon de perméabilisation, composé de saponine (Sigma Life Science) diluée dans le tampon de marquage à une concentration finale de 5 mg/mL. Les marquages de cytokines, soit l'IL-2, l'IFN γ , le TNF α et la GrzmB (Tab. 2), ont été effectués dans le tampon de perméabilisation et incubés pendant 30 minutes à température pièce. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec le tampon de perméabilisation et une fois avec du tampon de marquage afin d'effectuer les marquages extracellulaires tel que précédemment décrit. Les anticorps utilisés sont détaillés dans le tableau 1 d'anticorps. L'acquisition a été effectuée avec le FACS LSR II ou le Fortessa (BD Biosciences) et les résultats analysés avec le logiciel FlowJo (Treestar, San Carlos, CA).

8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad Software). Pour comparer deux groupes, un test de Mann-Whitney a été effectué quand l'effectif était faible (inférieur à sept échantillons). Quand l'effectif était plus important (supérieur à sept échantillons), un test t de Student bilatéral non apparié avec correction de Welch a été utilisé. Pour la comparaison de plusieurs groupes, une analyse de la variance à un facteur (*one way ANOVA*) a été effectuée. Pour la comparaison des courbes de survie, un test de log-rank Mantel-Cox a été utilisé. Les données sont représentées en montrant les échantillons individuels ainsi que la moyenne avec des valeurs * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ considérés comme statistiquement significatives tandis qu'un $p > 0.05$ est considéré comme non significatif.

Milieu de culture	Ingrédients
RPMIc	RPMI 1640 (Corning; Cat: 10-040-CV)
	10% de Sérum NU (Corning; Cat: 355104)
	1% de tampon HEPES(1M; Corning; Cat: 25-060-CI)
	1% de L-glutamine (Corning; Cat: 25-005-CI)
	1% de Peniciline-Streptomycine (100X; Corning; Cat: 30-002-CI)
	1% de MEM acides aminés non essentiels (100X; Corning; Cat : 25-025-CI)
	1% de Sodium Pyruvate (100mM; Corning; Cat : 25-000-CI)
	0.1 % de 2-mercaptoethanol (55mM; ThermoFisher; Cat : 21985023)
Milieu pour B16-OVA	DMEM (Corning; Cat: 10-017-CV)
	10% de Sérum NU
	1% de Sodium Pyruvate
	1% de Peniciline-Streptomycine
Milieu pour HEK 293T	DMEM
	10% de Sérum NU
	1% de L-glutamine
	1% de Sodium Pyruvate
	1% de Peniciline Streptomycine

Tableau 1. – Composition des milieux utilisés en culture cellulaire

Anticorps	Conjugué	Isotype	Compagnie	#Catalogue	Clone	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
CD8a	BV510	Rat IgG2a, κ	Biologend	100752	53-6,7	0.2
CD8a	FITC	Rat IgG2a	Biologend	100706	53-6.7	0.5
CD8a	PerCPcy5.5	Rat IgG2a, κ	Biologend	100733	53-6.7	0.5
CD8a	PECy7	Rat IgG2a, κ	Biologend	100722	53-6.7	0.2
CD25	APC	Rat IgG1	Biologend	102012	PC61	0.2
CD25	BV711	Rat IgG1, λ	Biologend	102049	PC61	0.2
CD38	APCCy7	Rat IgG2a, κ	Biologend	102727	90	0.2
CD39	PEDAzze594	Rat IgG2a, κ	Biologend	143811	Duha59	0.2
CD44	APCCy7	Rat IgG2b	Biologend	103028	IM7	0.2
CD44	BV650	Rat IgG2b, κ	Biologend	103049	IM7	0.2
CD45.1	BV650	Souris IgG2a, κ	Biologend	110736	A20	0.2
CD45.1	Pacific blue	Souris IgG2a	Biologend	110722	A20	0.5
CD45.2	AF700	Souris IgG2ak	Biologend	109822	104	0.5
CD45.2	FITC	Souris IgG2a	Biologend	109806	104	0.5
CD45.2	Pacific blue	Souris IgG2a, κ	Biologend	109820	104	0.5
CD49a	PE	Hamster Arménien IgG	Biologend	142604	HM α 1	
CD62L	BV786	Rat IgG2a	Biologend	104440	MEL-14	0.2
CD69	APC	Hamster Arménien IgG	Biologend	118219	H1.2F3	0.5
CD69	BV605	Hamster Arménien IgG	Biologend	104530	H1.2F3	0.2
CD101	PECy7	Rat / IgG2a, κ	thermo fisher	25-1011-80	Moushi101	0.2
CD127	Biotine	Rat IgG2a	INVITROGEN	13-1271-85	A7R34	0.5
GranzymeB	Pacific blue	Souris IgG1 κ	Biologend	515408	GB11	0.1
IFNg	FITC	Rat IgG1	Life Technologies	RM9001	XMG1.2	0.1
IL-2	PE	Rat IgG2b	Biologend	503808	JES6-5H4	0.2
Lag3	PerCP EF710	Rat IgG1	eBioscience	46-2231-80	C9B7W	0.2
PD-1	BV786	Rat IgG2a, κ	Biologend	135225	29F1A12	0.2
Streptavidine	PE		Biologend	405204		
SlamF6	PE	Souris IgG2a, κ	Biologend	134606	330-AJ	0.2
Tim3	BV605	Rat IgG2a, κ	BD OptiBuild	747624	5D12/TIM-3	0.2
TNF α	APC	Rat IgG1 κ	eBioscience	17-7321-82	MP6-XT22	0.2

Tableau 2. – Anticorps utilisés lors de la cytométrie en flux

Résultats

1.1 Identification de cibles transcriptionnelles en aval de la voie Notch

Les ligands de la voie de signalisation sont induits à la surface de différents types cellulaires, notamment à la surface des CPA lorsque celles-ci reçoivent des signaux de dangers^{312,339}. De plus, la faible expression des récepteurs Notch1 et Notch2 à la surface des LT CD8 est rapidement et fortement augmentée suite à une stimulation antigénique des LT CD8, contrairement à l'expression de Notch3 et Notch4, qui ne sont pas exprimés suite à la stimulation antigénique^{308,313,331,339}. Le signal Notch peut donc être abrogé dans les LT CD8 activés par la délétion génétique de ces deux récepteurs. Ainsi, nous avons utilisé des souris dont l'exon 1 du gène *Notch1* et l'exon 3 du gène *Notch2* ont été flanqués de sites loxP^{340,341}. Ces souris ont été croisées avec des souris exprimant une recombinaise Cre, sous le contrôle de la portion E8I du promoteur du gène de CD8, qui est active seulement après la sortie des LT CD8 du thymus. Ainsi la recombinaise Cre induit la délétion des récepteurs Notch1 et Notch2 seulement dans les LT CD8 naïfs matures, signifiant que ces cellules ne reçoivent pas le signal Notch lors de la stimulation antigénique³⁰⁸. Ces souris ont également été croisées avec des souris dont les LT CD8 expriment seulement un TCR transgénique restreint au CMH de classe I H-2Kb et spécifique au peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL). Cela nous a permis d'obtenir des souris produisant des LT CD8 spécifiques au peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (OT-I) qui étaient soit sauvages (fl/fl) ou déficients (Δ/Δ) pour les récepteurs Notch1 et Notch2.

Afin de déterminer les mécanismes moléculaires répondant en aval de la voie Notch, les membres du laboratoire ont séquencé l'ARN de LT CD8 OT-I fl/fl ou Δ/Δ transféré dans des souris congéniques à J3 post-infection par *Listeria*-OVA, ce qui a permis l'identification de 217 ($\log_2\text{FoldChange}>2$; $p<0.01$) gènes différentiellement exprimés en l'absence du signal Notch. (Fig. 11A-B) Afin d'identifier les gènes pouvant jouer un rôle dans la différenciation SLEC-MPEC, nous avons adopté une stratégie de priorisation qui consiste en la comparaison de notre signature génique à J3 à plusieurs autres signatures issues de la littérature. Ces signatures contribuent toutes à mettre en valeur le rôle de la voie Notch dans différents contextes biologiques, permettant possiblement l'identification de gènes importants en aval de la voie.

Nous avons établi trois critères, le premier critère correspondant à trois signatures de séquençage d'immunoprécipitation de la chromatine (Chip-seq) contenant des séquences de liaison du NICD dans des cellules leucémiques de type T-ALL³³²⁻³³⁴. Le deuxième critère correspond à une signature transcriptomique (ARN-seq) des LT CD4 déficients pour le signal Notch dans un modèle murin de maladie de greffon contre l'hôte³³⁵. Le troisième critère correspond aux régions ouvertes de la chromatine suite à l'activation des LT CD8 contenant des sites de liaison pour RBPJκ³³⁶. La comparaison des 217 gènes de notre signature avec ces différents critères nous a permis d'identifier 15 gènes communs avec le critère 1, 28 gènes communs avec le critère 2, et 20 gènes communs avec le critère 3 (Fig. 11C, Tab. 3).

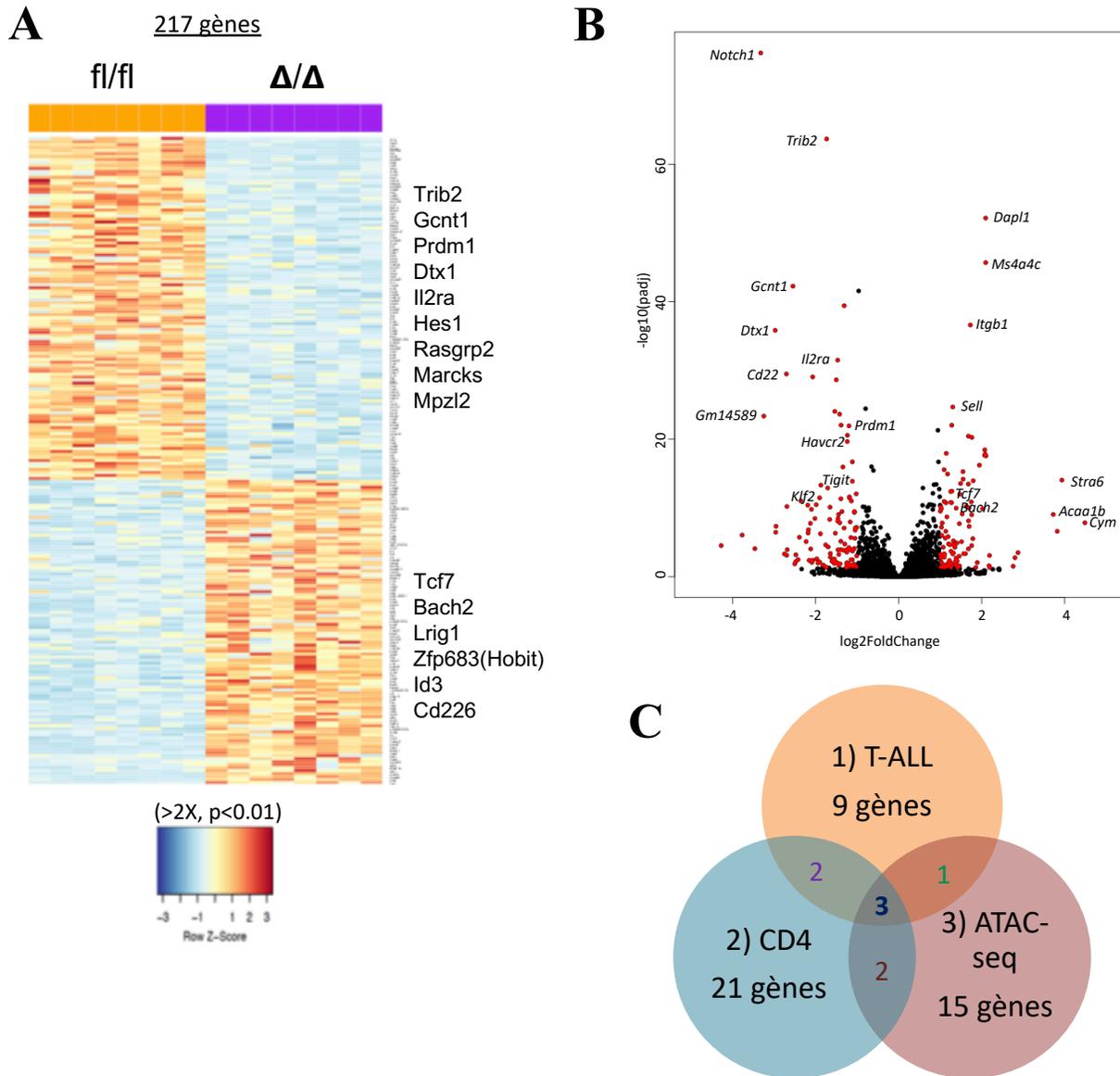


Figure 11. – Priorisation des gènes de la signature génique en l’absence du signal Notch sur les LT CD8 tôt lors de la réponse à une infection aiguë

Des souris B6.SJL ont été transférées adoptivement avec 10^6 de LT OT-I sauvages (fl/fl) ou déficients (Δ/Δ) pour les récepteurs Notch1 et Notch2, puis infectées par *Listeria*-OVA (i.v.). Les LT OT-I CD8+CD44^{hi} ont été triés à J3 post-infection et l’ARN isolé pour le séquençage. (A) Histogramme de densité de l’expression des gènes des LT CD8 fl/fl (gauche) ou Δ/Δ (droite) ($\log_2\text{FoldChange}>2, p<0.01$) (B) Diagramme volcanique (*volcano plot*) des gènes différentiellement exprimés en l’absence du signal Notch. (C) Diagramme de Venn indiquant la correspondance des différents critères de priorisation : 1) gènes régulés par le NICD dans les leucémies T-ALL; 2) gènes de la signature Notch dans les LT CD4; et 3) des gènes dont la chromatine est ouverte et contenant des sites de liaison pour RBPJ κ suite à l’activation des LT CD8.

Signature	Nombre de gènes	Gènes communs à la signature de déficience pour le signal Notch à J3
1) Leucémie T-ALL (Chip-seq) Wang H. <i>et al.</i> (2011) PNAS Wang H. <i>et al.</i> (2014) PNAS Geimer Le Lay A.S. <i>et al.</i> (2014) Science	128 87 475	15 <i>Dtx1</i> , <i>Notch1</i> , <i>Cd226</i> , <i>Hes1</i> , <i>Myo1b</i> , <i>Nrarp</i> , <i>Ccno</i> , <i>Pdgfb</i> , <i>Trib2</i> , <i>Marcks</i> , <i>Il2ra</i> , <i>Ddc</i> , <i>Mpzi2</i> , <i>Hey1</i> , <i>Chst15</i>
2) Signal Notch chez les LT CD4 Chung J. <i>et al.</i> (2019) J. Immunol	294	28 <i>Bach2</i> , <i>Dapl1</i> , <i>Evl</i> , <i>Igfbp4</i> , <i>Itgb1</i> , <i>Kcnmb4</i> , <i>Lrig1</i> , <i>Ltb</i> , <i>Ms4a4c</i> , <i>Ramp1</i> , <i>Rgs10</i> , <i>Scml4</i> , <i>Stra6</i> , <i>Synj2</i> , <i>Zip395</i> , <i>Adam19</i> , <i>Cd22</i> , <i>Dtx1</i> , <i>Frmd4b</i> , <i>Gcnt1</i> , <i>Gm28942</i> , <i>Gm30292</i> , <i>Il10</i> , <i>Il2ra</i> , <i>Marcks</i> , <i>Mpzi2</i> , <i>Prdm1</i> , <i>Trib2</i>
3) ATAC-seq contenant sites de liaison RBPJK Wang D. <i>et al.</i> (2018) Immunity	612	20 <i>Cxcr4</i> , <i>Fasl</i> , <i>Marcks</i> , <i>Tmevpg1</i> , <i>Havcr2</i> , <i>Tcf7</i> , <i>Trib2</i> , <i>Gm11346</i> , <i>Susd3</i> , <i>Gcnt4</i> , <i>Tigit</i> , <i>Trat1</i> , <i>Cd226</i> , <i>Il2ra</i> , <i>Bach2</i> , <i>Abcb1a</i> , <i>Lrig1</i> , <i>Klrg1</i> , <i>Gm7457</i> , <i>Plaur</i>

Tableau 3. – Gènes différentiellement exprimés en l'absence du signal Notch et priorisés en fonction de trois signatures du signal Notch, soit dans les leucémies T-ALL, dans les LT CD4 et suite à l'activation des LT CD8

Identification des gènes communs à la signature de déficience pour le signal Notch à J3 et leur correspondance avec les différents critères de priorisation. Les gènes identifiés en bleu sont communs aux trois critères. Les gènes correspondant aux critères 1 et 2 sont représentés en mauve, le gène correspondant aux critères 1 et 3, en vert, et les gènes correspondant aux critères de priorisation 2 et 3 sont en rouge.

D'une part, en comparant ces différents critères, nous observons trois gènes qui sont communs aux trois critères, soit *Il2ra*, *Trib2* et *Marcks* (Fig. 12A). De plus, les gènes *Lrig1* et *Bach2* (Fig. 12B) correspondent exclusivement aux critères 2 et 3 tandis que *Mpzl2* et *Dtx1* correspondent aux critères 1 et 2 (Fig. 12C). Enfin, *Cd226* correspond aux critères 1 et 3 (Fig. 12D). D'autre part, il est également possible d'apprécier la différence du nombre de transcrits dans les LT CD8 Δ/Δ relativement aux cellules fl/fl et naïves pour chacun des gènes représentés. Nous observons que *Il2ra*, *Marcks*, *Trib2*, *Dtx1* et *Mpzl2* (Fig. 12A-B) présente une diminution de leur expression en l'absence du signal Notch, tandis que *Cd226* et *Lrig1* (Fig. 12 C-D) sont plus fortement exprimés. Bien que nos analyses bio-informatiques indiquent que *Bach2* est bel et bien différentiellement exprimé en l'absence du signal Notch, l'usage du test statistique *one way ANOVA* n'indique pas de différence significative du nombre de transcrits du gène *Bach2* entre les cellules fl/fl et les cellules Δ/Δ .

Dans la littérature, il est connu que les cellules exprimant fortement la protéine du gène de l'*Il2ra*, soit CD25, ont plutôt tendance à se différencier en SLEC⁵³. De plus, le laboratoire a déjà montré qu'en l'absence du signal Notch, il y avait une diminution de l'expression de CD25³¹⁵, ce qui est également consistant avec les résultats obtenus de notre séquençage. Nous pouvons constater que *Il2ra* présente un nombre de transcrits beaucoup plus élevé que les autres gènes que ce soit dans la condition fl/fl ou Δ/Δ et sa valeur p ajustée est considérablement élevée (p.val.adj.=3,16E-32). Ainsi, nous avons décidé de nous intéresser au rôle de CD25 en aval de la voie Notch et d'établir si la diminution de l'expression de l'*Il2ra* en l'absence du signal Notch était responsable de la diminution de la différenciation en SLEC dans notre modèle.

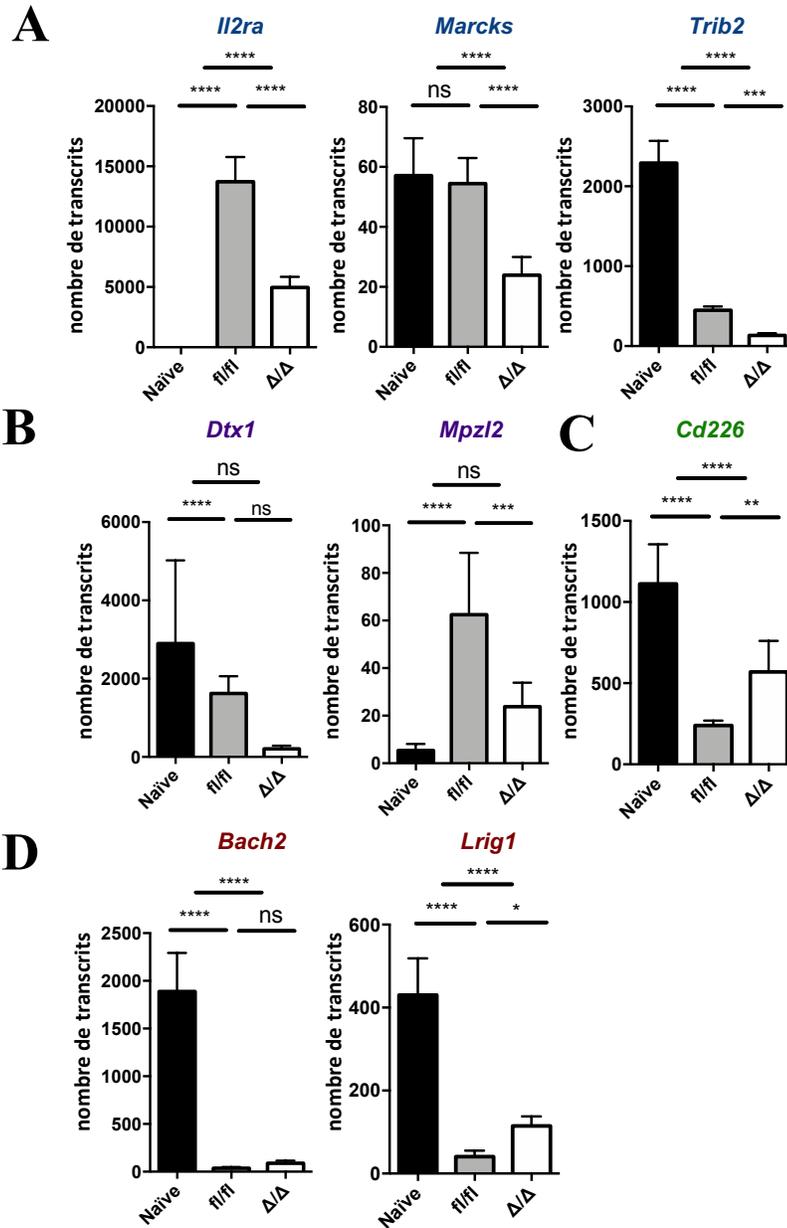


Figure 12. – Gènes différemment exprimés en l’absence du signal Notch et priorisés en fonction de leur correspondance avec différentes signatures

(A) Gènes différemment exprimés correspondant aux trois critères de priorisation (bleu). Histogramme du nombre de transcrits obtenu lors du séquençage de l’ARN pour les cellules naïves (noir), fl/fl (gris) ou Δ/Δ (blanc). Les gènes obtenus de notre signature correspondent au critère 1 des gènes régulés par le NICD dans les leucémies T-ALL, au critère 2 de la signature Notch dans les LT CD4 et au critère 3 des gènes dont la chromatine est ouverte suite à l’activation des LT CD8 et contenant des sites de liaison pour RBJK (B) Gènes correspondant aux critères 1 et 2 (mauve). (C) Gène correspondant aux critères 1 et 3 (vert). (D) Gènes correspondant aux critères de priorisation 2 et 3 (rouge). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

1.2 Surexpression de CD25 dans les LT CD8 sauvages ou déficients pour Notch1 et Notch2

Nous avons donc cherché à établir si la réexpression de CD25 en l'absence du signal Notch pouvait restaurer la génération des SLEC. Pour ce faire, nous avons surexprimé CD25 dans les LT CD8 OT-I fl/fl ou Δ/Δ pour l'expression de N1N2 par transduction rétrovirale. En effet, les LT CD8 OT-I (CD45.2+), d'abord activés *in vitro* pendant 24h à l'aide du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ présenté par des splénocytes (CD45.1+), ont été transduits soit avec un vecteur vide (pMig) ou avec un vecteur codant pour le gène de l'*Il2ra* (pMig-CD25), tous deux codant également pour le gène rapporteur de la GFP. Par la suite, nous avons conservé une partie des cellules ayant subi la transduction rétrovirale, et ce pendant 48h à 37°C, 5% CO₂, afin de vérifier l'efficacité de la transduction par cytométrie en flux, en mesurant le pourcentage de cellules ayant intégré le vecteur (GFP+) et en vérifiant l'expression de CD25 (Fig. 13A-B).

Nous avons pu observer que les LT CD8 OT-I fl/fl et Δ/Δ ont bel et bien été transduits. Toutefois, le pourcentage de cellules GFP+ était plus élevé lors de la transduction avec pMig qu'avec pMig-CD25, et ce, indépendamment du génotype (Fig. 13C gauche). Il est difficile d'apprécier une différence dans l'expression de CD25 en fonction de la surexpression considérant que les LT CD8 augmentent fortement l'expression du récepteur alpha à l'IL-2 suite à leur activation, ce qui implique une forte expression de CD25 tôt dans la réponse dans les cellules fl/fl comme dans les Δ/Δ . Toutefois, il est possible de constater que les diagrammes de FACS des cellules fl/fl et Δ/Δ transduites avec pMig-CD25 (Fig. 13C; droite) présentent un profil d'expression similaire en ce qui a trait à la population GFP+CD25+. De plus, l'expression de CD25 semble augmenter dans les populations GFP+ fl/fl comme Δ/Δ ayant été transduites avec pMig-CD25 (Fig. 13D), par rapport aux cellules GFP-. Ainsi, ces résultats semblent indiquer que nous avons effectivement transduit les CD8 OT-I fl/fl ou Δ/Δ .

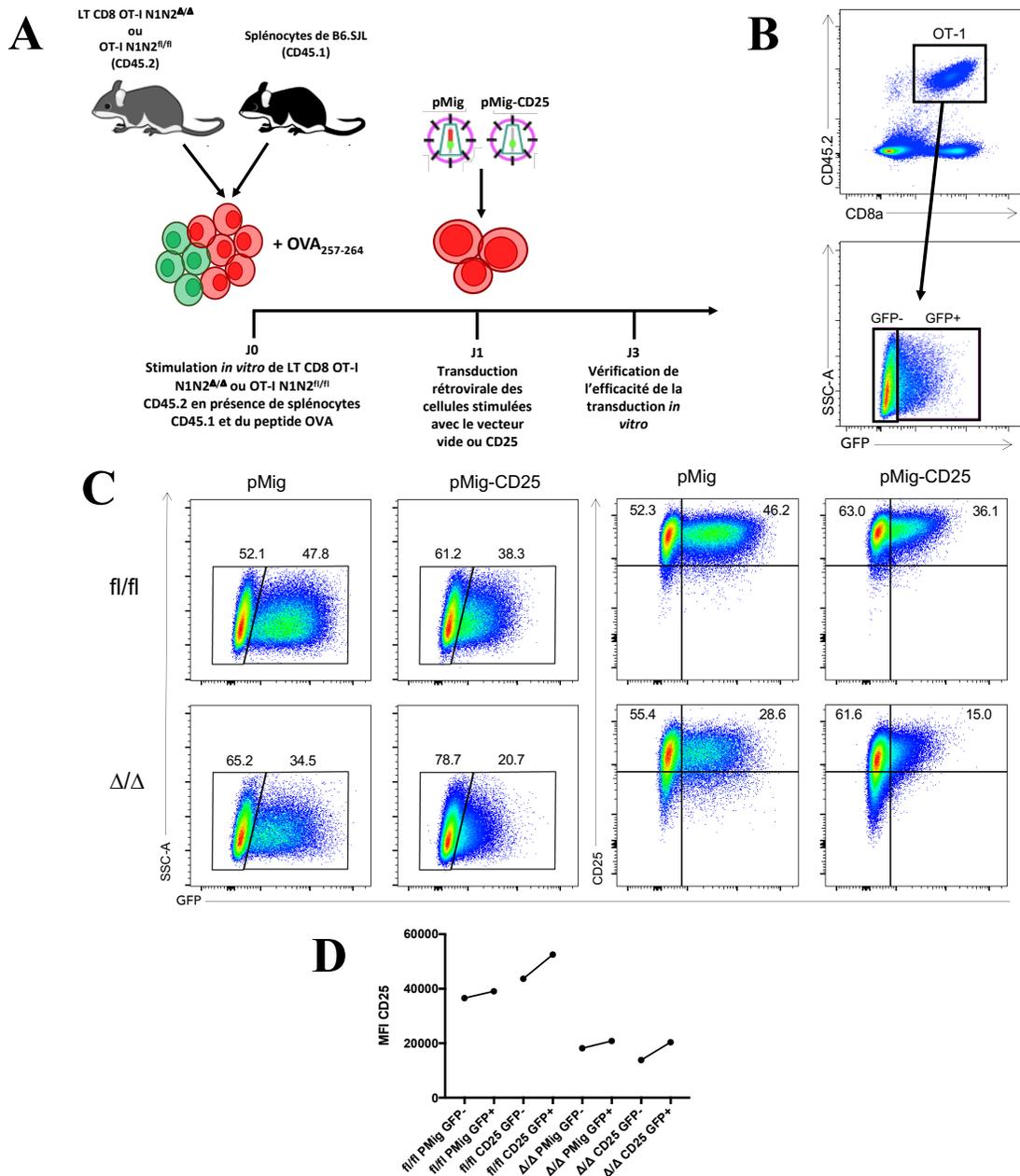


Figure 13. – Approche expérimentale de la transduction rétrovirale et validation *in vitro* de la surexpression de CD25 par les LT CD8

(A) Schéma expérimental de la stimulation et de la transduction rétrovirale des LT CD8 OT-I sauvages (fl/fl) ou déficients (Δ/Δ) pour les récepteurs Notch1 et Notch2 *in vitro*. (B) Stratégie d'identification des cellules transduites (GFP+) ou non transduites (GFP-). (C) Validation de l'efficacité de la transduction à J3. L'expression de la GFP (droite) et de CD25 (gauche) a été mesurée sur les LT CD8 OT-I fl/fl (haut) ou Δ/Δ (bas) pour N1N2. (D) Compilation de l'expression de CD25 à J3. Les cellules ont été stimulées pendant 24h à l'aide du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ et conservées *in vitro* 48h après leur transduction rétrovirale par le vecteur vide (pMig) ou par le vecteur codant pour CD25 (pMig-CD25).

Au J1, soit le jour de la transduction rétrovirale des cellules stimulées avec le vecteur vide ou contenant CD25, les cellules stimulées *in vitro* avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ et transduites (CD45.2) ont été transférées adoptivement dans des souris congéniques (CD45.1) préalablement infectées par *Listeria*-OVA. L'expansion clonale, l'efficacité de la transduction et la différenciation SLEC-MPEC ont été vérifiées au pic de la réponse effectrice, soit à J7 (Fig. 14A). Au niveau de l'expansion clonale des OT-I (CD8+CD45.2+), il n'y avait pas de différence significative entre les différents groupes (Fig. 14B. haut). En ce qui a trait au niveau de transduction, il y avait une différence significative du %GFP+ entre le groupe fl/fl pMig et tous les autres groupes (Fig. 14B; droite bas; **p<0.01), indiquant que la transduction rétrovirale a été plus efficace *in vivo* dans ce groupe.

En ce qui a trait à la différenciation SLEC-MPEC, nous avons observé une différence significative dans le %SLEC et dans le %MPEC entre les souris fl/fl et Δ/Δ , indépendamment de la surexpression de CD25 (Fig. 14C-D). La diminution du %SLEC et l'augmentation du %MPEC correspondent avec le phénotype de déficience du signal Notch. Néanmoins, la surexpression de CD25 ne paraît pas influencer le %SLEC (Fig. 14C-D). Ainsi, il semble que la surexpression de CD25 ne permet pas de restaurer la génération des SLEC en l'absence du signal Notch, ce qui confirme des résultats précédemment obtenus par notre laboratoire.

Considérant qu'il n'y avait pas de différence significative de SLEC ou de MPEC entre les LT CD8 transduits (GFP+) ou non transduits (GFP-) et ce, tous génotypes confondus (Fig. 14D), nous nous sommes également intéressés à l'expression de CD25 dans les différents groupes afin de valider que le gène cible avait bel et bien été surexprimé. Or, le pic d'intensité moyenne de fluorescence (MFI) des cellules GFP+ transduites avec pMig-CD25 (Fig. 15A ; droite) ne semble pas être supérieur à celui des cellules GFP-, indiquant que CD25 n'est pas surexprimé à J7. Conséquemment, ces résultats suggèrent qu'il y a une perte de la surexpression de CD25 chez les LT CD8 transduits avec pMig-CD25 au pic de la réponse aiguë.

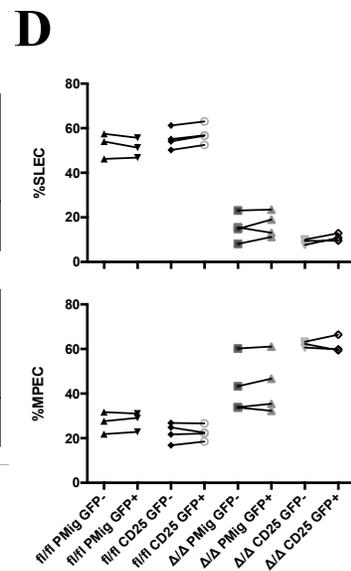
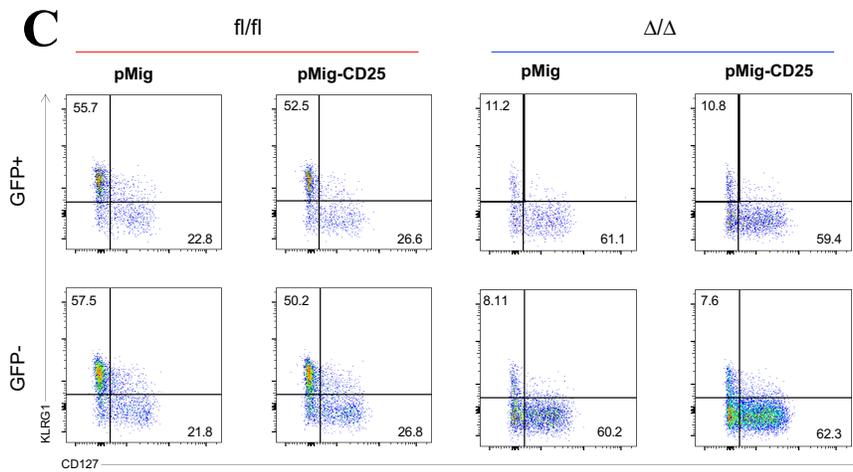
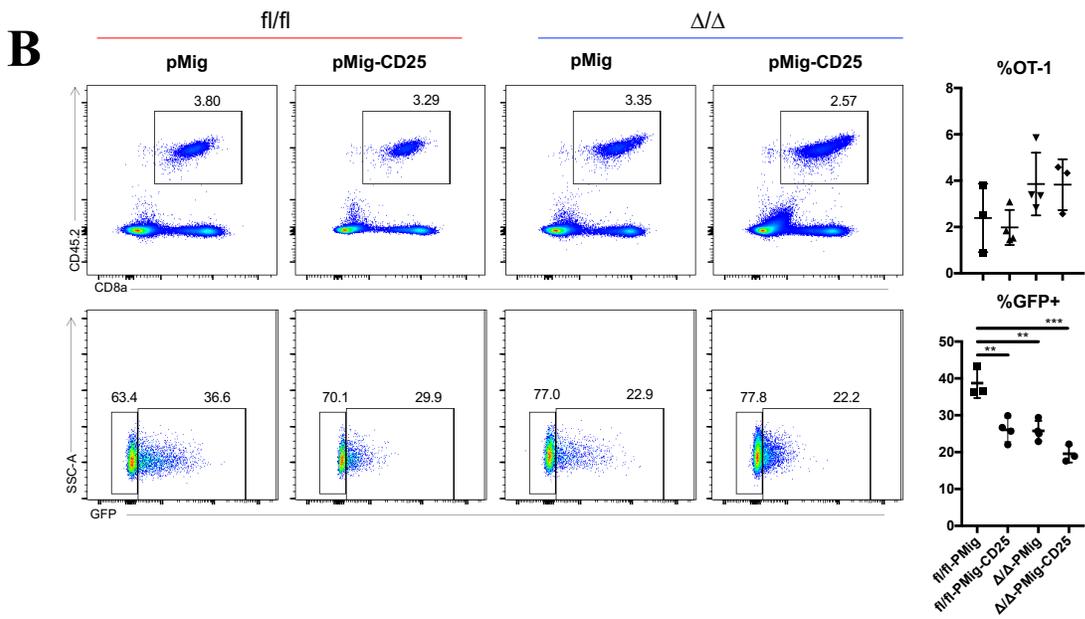
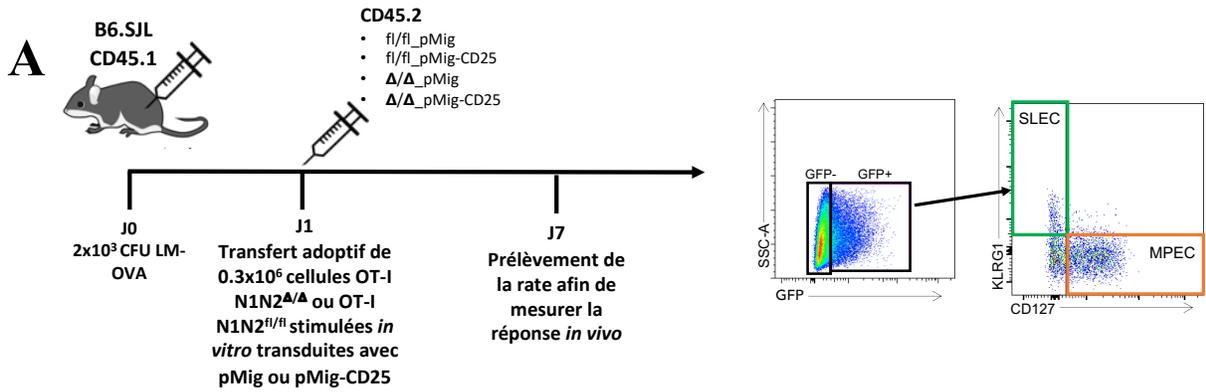


Figure 14. – La surexpression de CD25 ne permet pas de rétablir la génération de SLEC lors de la réponse des LT CD8 déficients pour Notch1 et Notch2

24h après l'infection par *Listeria-OVA*, des souris B6.SJL ont été transférées adoptivement avec 0.3×10^6 LT CD8 OT-I fl/fl ou Δ/Δ , et transduites avec pMig ou pMig-CD25. La réponse a par la suite été évaluée à J7 post-infection. **(A)** Schéma expérimental *in vivo* et stratégie d'identification des cellules SLEC (CD127-KLRG1+) et MPEC (CD127+KLRG1-) **(B)** Expansion des OT-I transférées et efficacité de leur transduction *in vivo*. Graphique de FACS de l'expansion des OT-I transférées (haut) et du pourcentage de cellules OT-I transduites ou non transduites (bas; %GFP+ ou %GFP- identifiés sur CD8+CD45.2+) avec leurs compilations respectives. **(C)** Différenciation en SLEC-MPEC des cellules transduites ou non transduites. Diagramme de FACS des populations SLEC (CD127-KLRG1+) et MPEC (CD127+KLRG1-) GFP+ (haut) ou GFP- (bas) des cellules transférées fl/fl (gauche; rouge) ou Δ/Δ (droite; bleu). **(D)** Compilation du pourcentage de SLEC (haut) et du pourcentage de MPEC (bas). (n=1, 3 à 4 souris par groupes) **p<0.01, ***p<0.001.

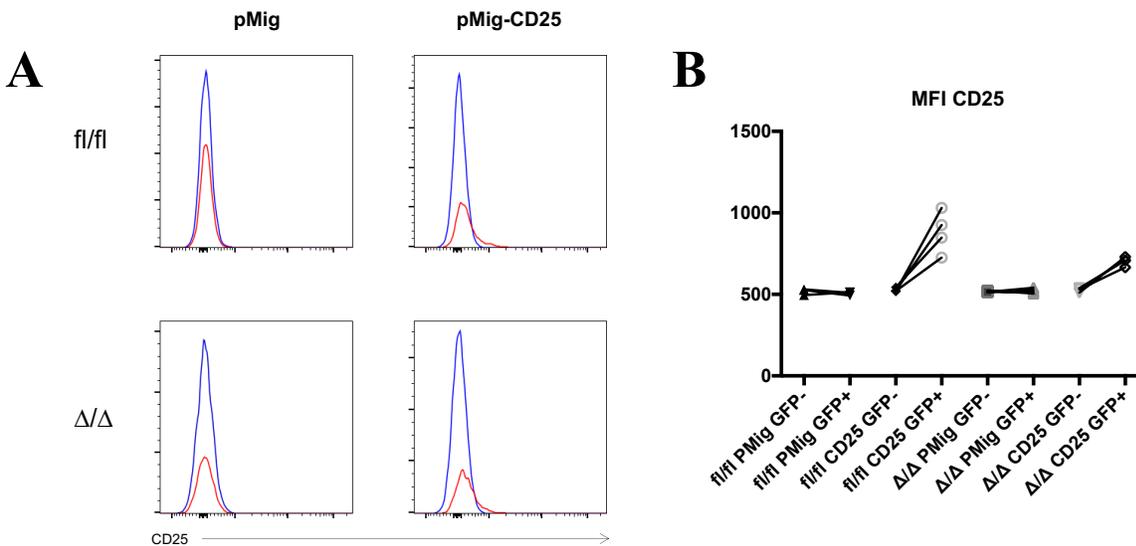


Figure 15. – Perte de la surexpression de CD25 chez les LT CD8 transduits avec pMig-CD25 au pic de la réponse aiguë

(A) Profil d'expression de CD25 à J7 dans les cellules transduites ou non transduites. Histogramme de l'intensité de fluorescence de CD25 des cellules GFP+ (rouge) et GFP- (bleu) dans les LT CD8 OT-I fl/fl ou Δ/Δ , transduits avec pMig ou pMig-CD25, à J7. **(B)** Compilation de la MFI de CD25 (n=1, 3 à 4 souris par groupes).

Il a déjà été démontré que lors d'une infection par LCMV Arm, l'expression de CD25 dans les LT CD8 augmente de manière drastique suite à l'activation, et ne commence à diminuer qu'à partir de J3,5 post-infection. À J5 post-infection, le niveau d'expression de CD25 des LT CD8 spécifiques à l'antigène est similaire à celui des cellules naïves⁵³. Ainsi, nous avons cherché à vérifier si la surexpression de CD25 était maintenue dans le temps puisque la protéine ne semble pas surexprimée à J7. Nous nous sommes donc intéressés à la cinétique de l'expression de CD25 dans le même système de transduction rétrovirale, en utilisant seulement des LT CD8 transduits issus de souris sauvages (fl/fl) exprimant les récepteurs Notch1 et Notch2, et transférés adoptivement dans des souris congéniques infectées par *Listeria*-OVA (Fig. 16A). Nous nous sommes intéressés à l'expression du récepteur suite à la transduction à des jours précoces au pic de la réponse à l'infection bactérienne, soit au J3, au moment où CD25 est encore fortement exprimé, et à J5, au moment où l'expression de CD25 devrait avoir chuté si les cellules ne surexpriment pas CD25 et être maintenue si elles le surexpriment.

Dans notre modèle, nous constatons que dans les cellules transduites avec pMig (Fig. 16B; gauche), l'expression de CD25 est bimodale à J3 tandis qu'à J5, il y a une diminution drastique de l'expression de CD25, ce qui correspond aux résultats déjà décrits dans la littérature⁵³. Lors de la surexpression de CD25 (Fig. 16B; droite, pMig-CD25), nous constatons que la plupart des cellules sont CD25+ à J3, mais que les cellules présentent la même diminution drastique de l'expression de CD25 à J5, malgré la transduction de la protéine dans les pMig-CD25. Le pourcentage de GFP semble diminuer de J3 à J5 (Fig. 16C-D), indiquant que moins de cellules transduites sont retrouvées plus tard lors de l'infection, possiblement car celles-ci ne sont pas maintenues ou encore parce que le vecteur pMig-CD25 ne permet pas de surexprimer fortement CD25. Ainsi, nos résultats semblent indiquer que lors du transfert adoptif de LT CD8 OT-I transduit rétroviralement, il y a une perte des LT CD8 surexprimant CD25 entre J3 et J5 post-infection.

En bref, en l'absence du signal Notch, la surexpression de CD25 dans les LT CD8 ne permet pas de restaurer la génération des SLEC au pic de la réponse effectrice. Toutefois, cela pourrait être causé par le fait que la surexpression de CD25 n'est pas maintenue au cours de la réponse effectrice.

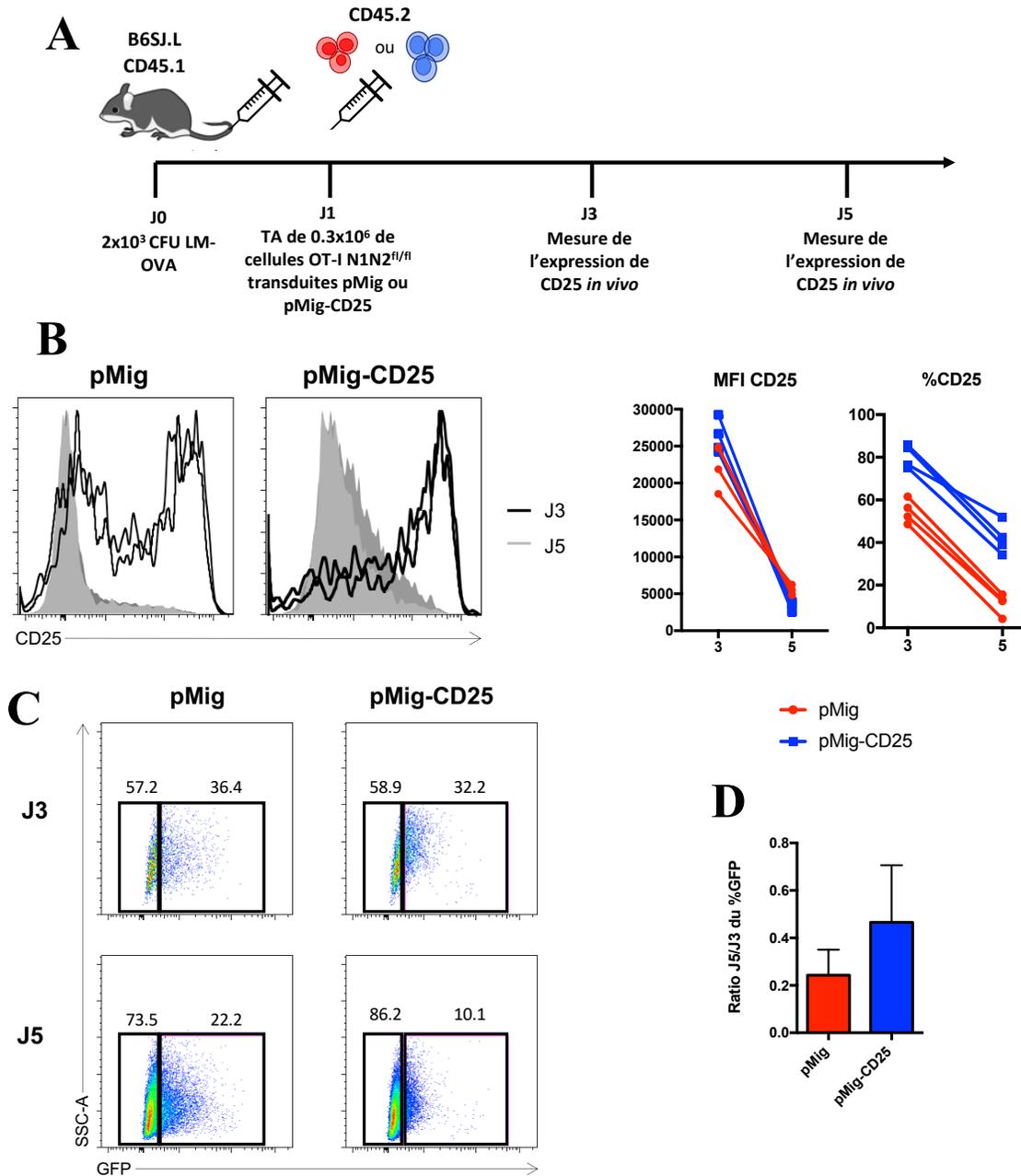


Figure 16. – La surexpression de CD25 n'est pas maintenue *in vivo* lors de la réponse des LT CD8 transférés suite à une infection aiguë

(A) Schéma expérimental de la cinétique de l'expression de CD25 lors de la surexpression par transduction rétrovirale de pMig et pMig-CD25 (B) Expression cinétique de CD25 lors de la surexpression rétrovirale. Stimulation *in vitro* et transduction rétrovirale effectuées tel qu'indiqué à la fig. 3A. Histogrammes de l'expression de CD25 dans des LT CD8 OT-I sauvages (fl/fl) activés pendant 24h *in vitro* avec OVA₂₅₇₋₂₆₄ et transduits avec pMig (gauche) ou pMig-CD25 (droite) à J3 (noir) et J5 (gris) post-infection par Lm-OVA. Compilation de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI; gauche) et du pourcentage de cellules CD25+ (droite) des LT CD8 pMig (rouge) ou pMig-CD25 (bleu). (C) Efficacité de la transduction de J3 à J5. Diagramme de FACS

de l'expression de la GFP dans les LT CD8 transduits avec pMig (gauche) ou pMig-CD25 (droite) à J3 (haut) et J5 (bas) post-infection. (D) Variation du pourcentage de cellules transduites de J3 à J5. Calculé en effectuant $(1 - (\frac{\bar{x} \text{ du \%GFP à J5}}{\bar{x} \text{ du \%GFP à J3}}))$ pour les %GFP+. Les résultats sont issus de deux expériences indépendantes avec 2 souris par jour.

2.1 Impact de la voie Notch dans une thérapie adoptive antitumorale

Notre laboratoire a déjà établi que le transfert adoptif de LT CD8 déficients pour Notch menait à l'accumulation de Trm dans le foie. Nous avons donc cherché à vérifier si lors d'une thérapie adoptive de LT CD8, l'absence du signal Notch permettait un meilleur contrôle tumoral, via leur capacité à se différencier en Trm. Pour ce faire, nous avons implanté des souris avec le modèle de mélanome B16 exprimant l'antigène OVA (B16-OVA). À J7 post-implantation tumorale, lorsque les tumeurs deviennent palpables, les souris ont été redistribuées en 3 groupes et traitées avec une thérapie adoptive de LT CD8 OT-I effecteurs fl/fl ou Δ/Δ , ou non traitée (NT) pour le groupe contrôle. (Fig. 17A) Les LT CD8 OT-I ont été préalablement activés *in vitro* pendant 72h en présence du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ et d'IL-2, permettant aux LT naïfs de se différencier en LT effecteurs. Avant d'effectuer le transfert adoptif, le niveau d'expression des marqueurs d'activation a été vérifié afin de valider que les LT effecteurs étaient similairement activés. L'expression des marqueurs d'activation CD25, CD44 et CD69 a augmenté alors que l'expression du marqueur de localisation CD62L a été maintenue, et ce, de manière équivalente entre les deux génotypes des cellules T (Fig. 17B, résultats de deux expériences).

L'aire tumorale a ensuite été mesurée aux 48h afin d'évaluer la croissance tumorale jusqu'à l'atteinte du point limite, soit une ulcération ou une surface tumorale excédant les 200 mm². En absence de thérapie adoptive (groupe NT), nous avons observé une augmentation rapide de la croissance tumorale. En comparaison, dans les groupes traités, la croissance tumorale est plus progressive dans le groupe traité avec des LT exprimant Notch1 et Notch2 (fl/fl) qu'avec des LT n'exprimant pas les récepteurs (Δ/Δ) (Fig. 17C). Il est également possible de constater que les souris du groupe traité avec les LT fl/fl survivent significativement plus longtemps, avec une médiane de survie de 23 jours soit 4 jours de plus que les souris du groupe traité Δ/Δ (Fig. 17D; **** $p \leq 0.0001$). Ainsi, lors d'une thérapie adoptive de LT CD8, l'absence du signal Notch prévient un contrôle optimal de la croissance tumorale dans un modèle de mélanome B16-OVA.

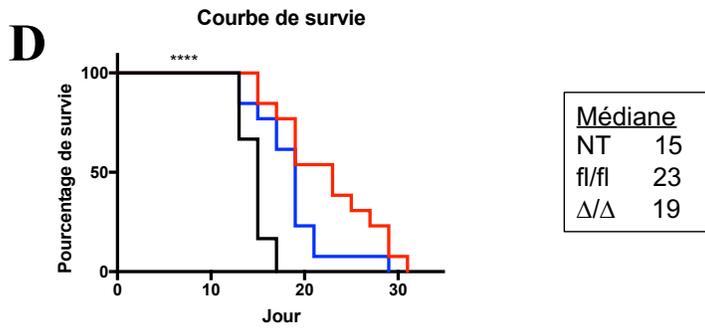
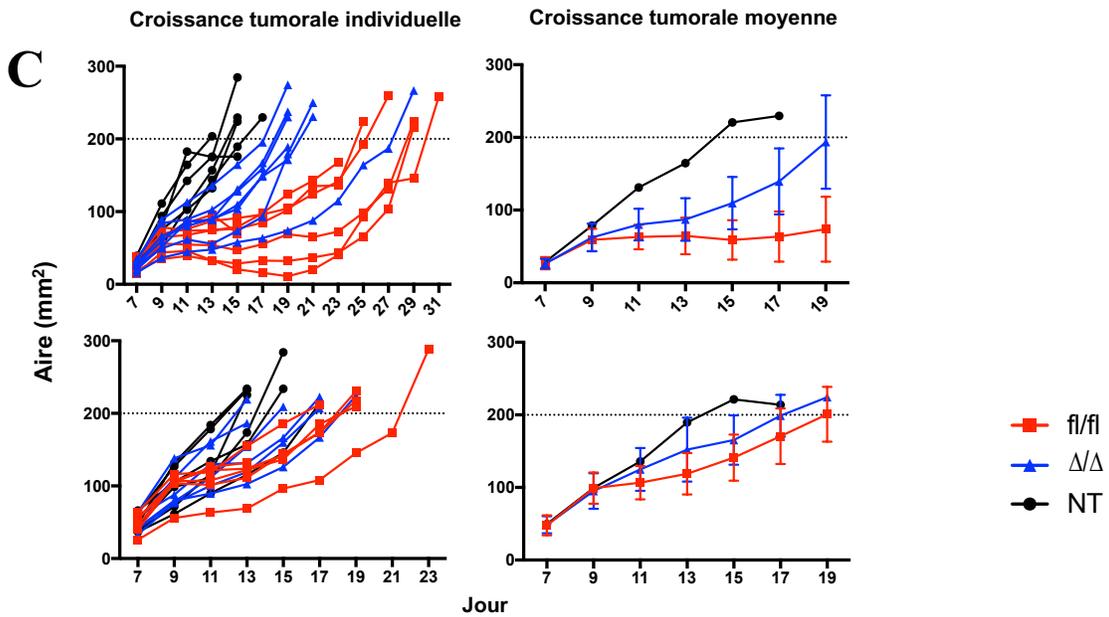
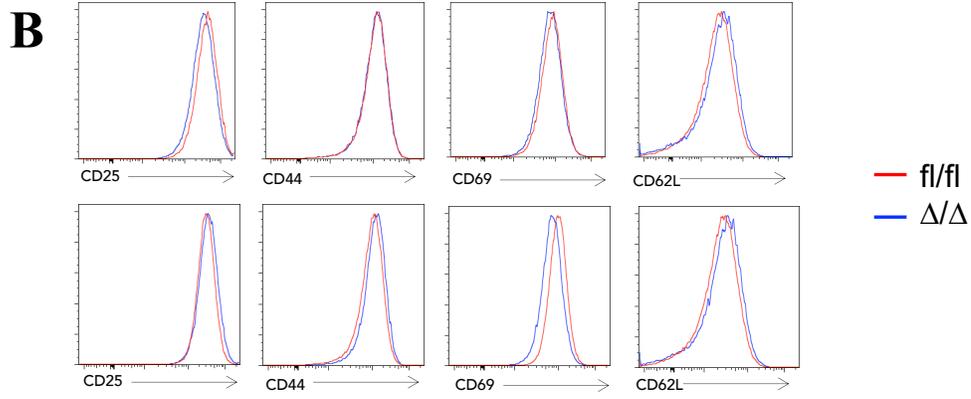
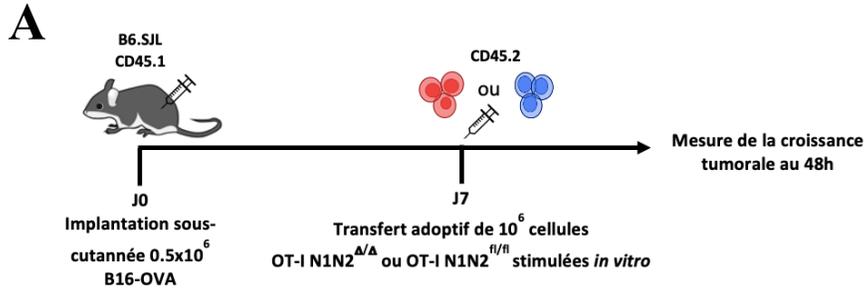


Figure 17. – Le signal Notch dans les LT est nécessaire lors d’une thérapie adoptive de LT CD8 pour contrôler la croissance tumorale dans le modèle B16-OVA

(A) Schéma expérimental. (B) Profil d’activation des LT CD8 OT-1 sauvages (fl/fl) ou déficients (Δ/Δ) pour Notch1 et Notch2 prétransfert adoptif. Les LT CD8 ont été activés en présence de splénocytes et du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄, supplémenté en IL-2 après 48h et analysé 72h après le début de la stimulation *in vitro*. Histogramme de fluorescence des marqueurs d’activation CD25, CD44, CD69 et CD62L (sur les LT CD8+CD45.2+), issus de l’expérience 1 (haut) et de l’expérience 2 (bas). (C) Courbe de croissance des tumeurs B16-OVA individuelle (gauche) et moyenne (droite) de l’aire tumorale (mm²) par groupe (fl/fl, Δ/Δ ou non traité (NT)), issues de l’expérience 1 (haut) et l’expérience 2 (bas) (D) Courbe de survie, représentant le pourcentage de survie par groupe dans le temps. Les données sont issues de deux expériences indépendantes avec 6 à 7 souris par groupe. **** $p \leq 0.0001$

2.2 Caractérisation des lymphocytes lors d’une thérapie adoptive en l’absence du signal Notch

Afin de déterminer quels étaient les facteurs responsables du contrôle amoindri de la croissance tumorale en l’absence du signal Notch lors d’une thérapie adoptive de LT CD8 dans un modèle de mélanome B16-OVA, nous avons cherché à caractériser ces LT CD8. Nous nous sommes intéressés à plusieurs facteurs, soit l’infiltration des LT CD8 transférés, leur localisation dans les différents organes, leurs fonctions effectrices et leur profil d’épuisement. Pour ce faire, nous avons utilisé le même protocole d’implantation tumorale et de transfert adoptif (Fig. 17A). Toutefois, nous avons euthanasié les souris à J14 post-implantation tumorale, soit 7 jours après le transfert adoptif afin de nous assurer que la surface tumorale des souris soit semblable entre les différents groupes.

2.2.1 Infiltration et localisation des LT CD8 transférés adoptivement en l’absence du signal Notch

Nous nous sommes d’abord intéressés au niveau d’infiltration tumorale, soit la quantité de cellules transférées (CD45.2+) retrouvées dans la tumeur, afin de valider si une différence d’infiltration pouvait être responsable du phénotype de survie. Toutefois, il n’y a pas de différences significatives d’infiltration des TIL, que ce soit au niveau du %CD45.2+ ou du nombre cellulaire (10^6 cellules/g) (Fig. 18B).

Toutefois, le nombre cellulaire moyen (10^6 cellules/g) plus élevé des LT fl/fl comparativement au Δ/Δ (Fig. 18B) semble indiquer une tendance à une meilleure infiltration de la tumeur en l'absence de Notch, potentiellement causée par une distribution des valeurs de nombre cellulaires plus étendue dans ce groupe. Ainsi, la différence de croissance tumorale n'est pas causée par une différence d'infiltration des LT déficients pour Notch. Cela n'exclut pas la possibilité qu'en fonction de la présence du signal Notch, un sous-type de LT CD8 soit plus abondant dans la tumeur, par exemple les Trm.

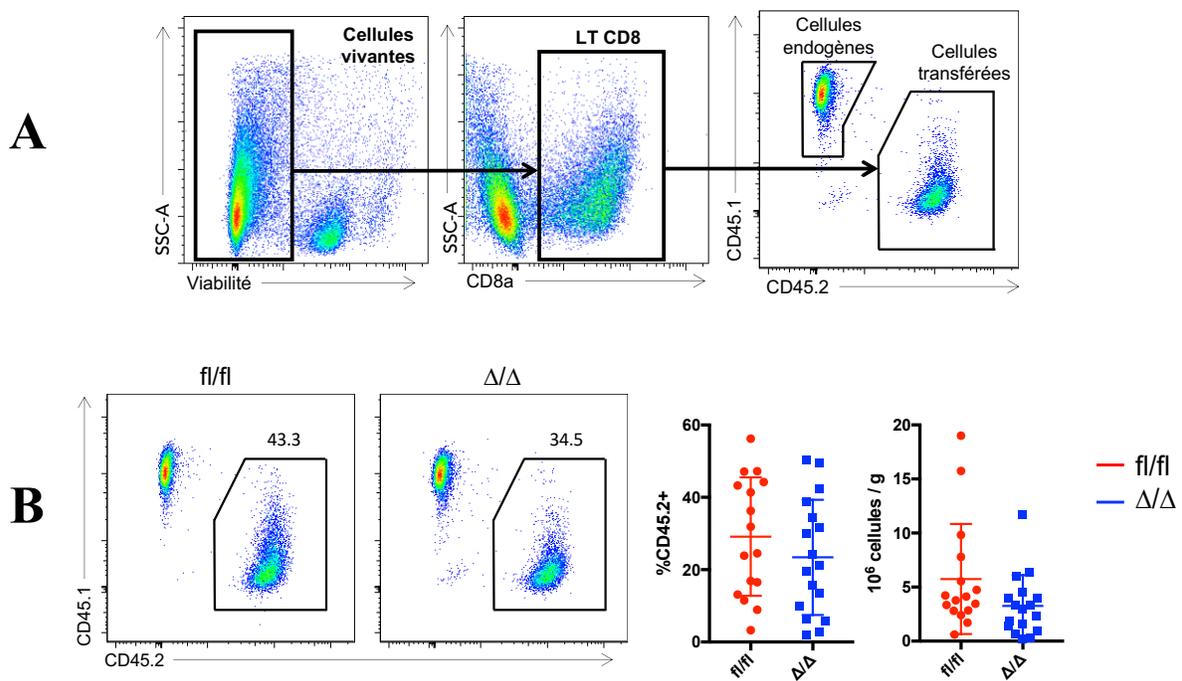


Figure 18. – La différence de croissance tumorale n'est pas causée par une différence d'infiltration des LT déficients pour Notch dans un modèle B16-OVA

Les souris ont été implantées dans le flanc droit avec 0.5×10^6 cellules B16-OVA et transférées adoptivement à J7 avec 10^6 de LT CD8 OT-I N1N2 Δ/Δ ou OT-I N1N2 fl/fl stimulés *in vitro*, tel qu'indiqué dans le schéma expérimental (Fig. 17A). Les tumeurs ont été prélevées à J14 post-implantation. (A) Stratégies d'identification des TIL issus des cellules transférées (CD45.2+) (B) Profil d'infiltration tumorale des TIL. Diagramme de FACS représentant les cellules transférées fl/fl (gauche; rouge) ou Δ/Δ (droite; bleu) avec la compilation du %CD45.2+ et du nombre cellulaire dans la tumeur (10^6 cellules/g). Les résultats sont issus de 3 expériences indépendantes, avec 3 à 7 souris par groupe.

Notre hypothèse de départ supposait qu'un meilleur contrôle tumoral des LT CD8 déficients pour Notch serait dû à leur capacité à se différencier en Trm. Malgré le contrôle tumoral amoindri lors d'une thérapie adoptive de LT CD8 en l'absence de Notch, nous avons cherché à valider s'il y avait une différence d'infiltration de LT CD8 de type Trm (CD69+CD62L-). Nous n'avons pas constaté de différence dans l'accumulation de Trm (Fig. 19B) ou dans l'expression du marqueur de résidence CD49 α (Fig. 19C) dans les tumeurs traitées avec des cellules fl/fl ou Δ/Δ . Ainsi, la différence de croissance tumorale n'est pas causée par une différence d'accumulation de LT CD8 Trm déficients pour Notch dans un modèle B16-OVA.

En outre, nous nous sommes intéressés à la distribution et l'infiltration des cellules transférées dans les autres tissus. Dans les OLS, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de différences au niveau de l'accumulation des LT CD8 déficients ou non pour Notch dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur (Fig. 20A). Toutefois, nous avons observé une accumulation significative de LT déficients pour Notch dans la rate au niveau du %CD45.2+ (Fig. 19B; gauche), mais pas au niveau des nombres cellulaires (Fig. 20B; droite). Par conséquent, suite au transfert adoptif, les LT CD8 déficients pour Notch s'accumulent dans la rate, mais pas dans les ganglions lymphatiques drainants la tumeur.

De plus, le laboratoire a déjà démontré qu'en l'absence du signal Notch, il y avait une accumulation massive de Trm dans le foie (résultats non publiés). Il nous a été possible de confirmer ce phénotype en allant vérifier l'infiltration des LT CD8 déficients ou non pour le signal Notch dans le foie de souris porteuses de tumeur. En effet, il y a une plus forte accumulation de cellules transférées (CD45.2+; Fig. 21A) et une accumulation significative de Trm (CD69+CD62L- ; Fig. 21B) dans le foie en l'absence du signal Notch. Conséquemment, dans le modèle de cancer B16-OVA, il y a également une accumulation de Trm dans le foie suite au transfert adoptif de LT CD8 déficients pour Notch.

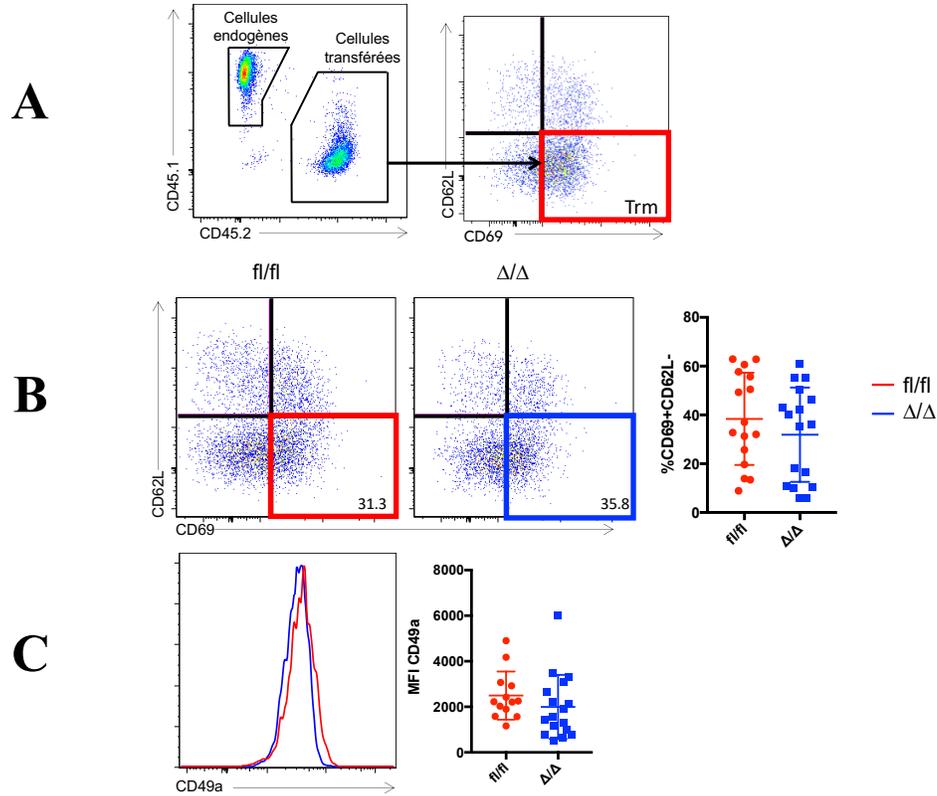


Figure 19. – La différence de croissance tumorale n'est pas causée par une différence d'accumulation de LT CD8 Trm déficients pour Notch dans un modèle B16-OVA

(A) Stratégie d'identification des TIL Trm (CD69+CD62L-) issus des cellules transférées (CD45.2+) (B) Profil d'infiltration tumorale de TIL de type Trm. Diagramme de FACS représentant les cellules transférées de type Trm (CD69+CD62L-) fl/fl ou Δ/Δ avec la compilation. (C) Profil d'expression de marqueurs de résidence. Histogramme de FACS et compilation de la MFI de CD49 α identifié sur les cellules CD45.2+. Les résultats sont issus de 3 expériences indépendantes, avec 3 à 7 souris par groupe.

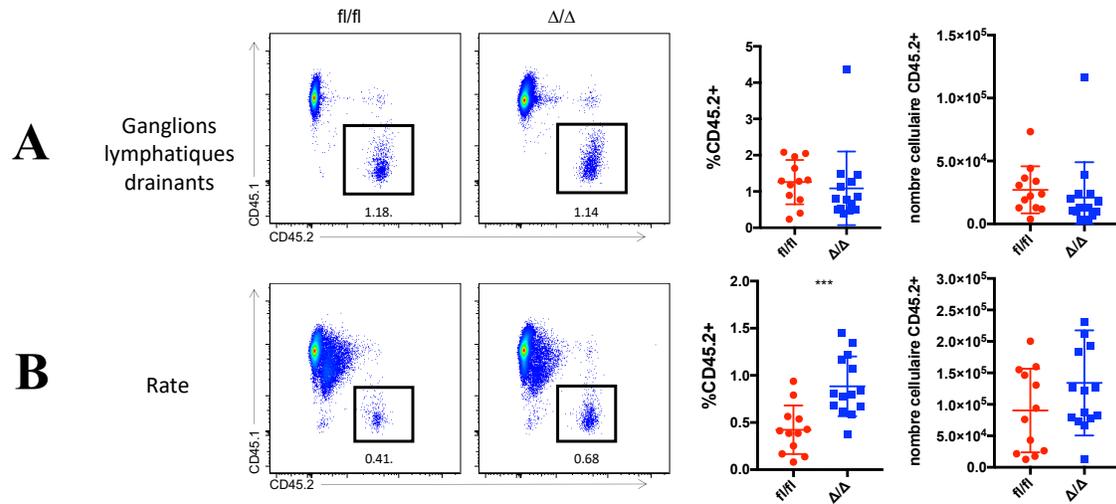


Figure 20. – Suite au transfert adoptif, les LT CD8 déficients pour Notch s’accumulent dans la rate, mais pas dans les ganglions lymphatiques drainants la tumeur.

Profil d’infiltration dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur (**A**) ou dans la rate (**B**) des LT CD8 transférés adoptivement à J14 post-implantation. Diagramme de FACS représentant les cellules transférées fl/fl (gauche) ou Δ/Δ (droite) avec la compilation du %CD45.2+ et du nombre cellulaire dans les ganglions lymphatiques drainants ou dans la rate. Les résultats sont issus de deux expériences indépendantes, avec 6 à 7 souris par groupe. ***p<0.001

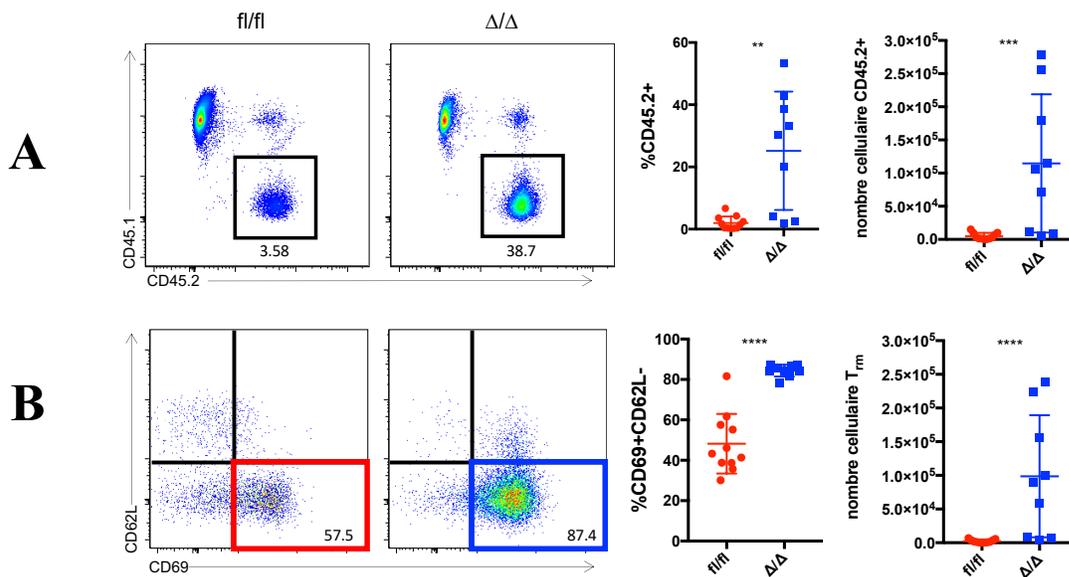


Figure 21. – Accumulation de Trm dans le foie suite au transfert adoptif de LT CD8 déficients pour Notch dans un modèle B16-OVA

(A) Profil d'infiltration dans le foie des LT CD8 transférés adoptivement CD45.2+ à J14 post-implantation. Diagramme de FACS représentant les cellules transférées (CD45.2+) fl/fl (gauche) ou Δ/Δ (droite) avec la compilation du %CD45.2+ et du nombre cellulaire. (B) Profil d'infiltration des Trm issus des LT CD8 transférés adoptivement dans le foie. Diagramme de FACS représentant les cellules transférées de type Trm (CD69+CD62L-) fl/fl ou Δ/Δ dans le foie avec la compilation du %CD69+CD62L- et le nombre cellulaire. Les résultats sont issus de deux expériences indépendantes, avec 3 à 7 souris par groupe. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.001

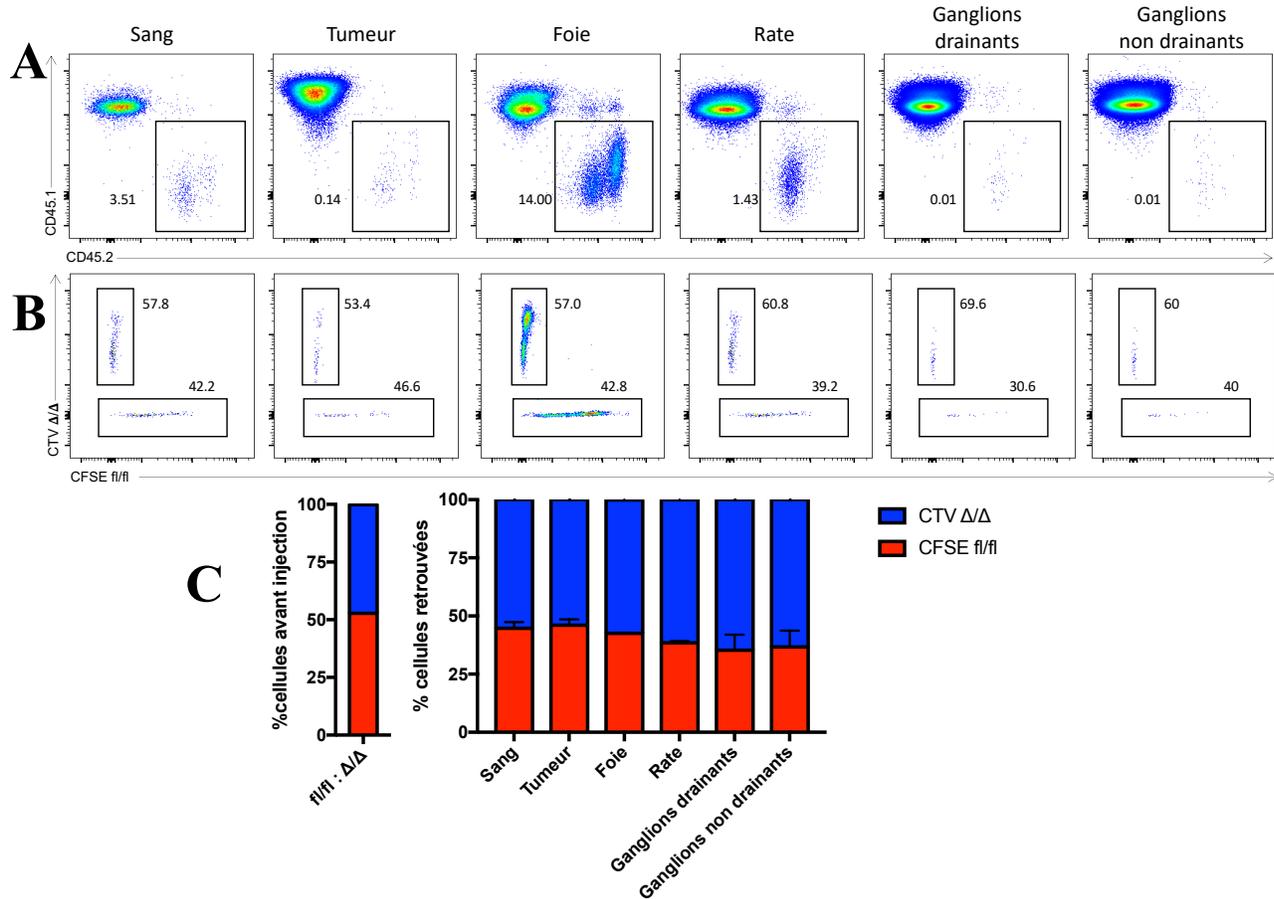


Figure 22. – Localisation des LT CD8 effecteurs suite au transfert adoptif dans le modèle B16-OVA

Les LT CD8 OT-1 fl/fl ou Δ/Δ ont été stimulés tel que précédemment décrit (Fig. 17A). À J3 post-stimulation, les cellules fl/fl ont été marquées au CFSE, et les cellules Δ/Δ , au CTV. Suite au marquage, les cellules ont été mélangées dans un ratio 1 : 1 afin de transférer adoptivement 25×10^6 cellules (i.v.). Les souris ont été euthanasiées 1h plus tard et le sang, la tumeur, le foie, la rate, les ganglions lymphatiques drainants et non drainants ont été prélevés afin de vérifier la localisation dans les tissus. (A) Profil d'infiltration des cellules transférées dans les différents tissus. Diagramme de FACS des LT CD8+CD45.2+ dans les différents organes. (B) Proportion des cellules déficientes ou non pour le signal Notch qui ont localisée dans le tissu. Diagramme de FACS des LT (CD8+CD45.2+) soit fl/fl (CFSE) ou Δ/Δ (CTV) dans les différents organes. (C) Compilation des proportions de cellules fl/fl (rouge) ou Δ/Δ (bleu) dans les différents tissus en comparaison au ratio avant l'injection. Les résultats sont issus d'une expérience de 3 souris.

Considérant la plus forte accumulation des LT CD8 déficients pour Notch dans la rate et le foie, nous avons émis l'hypothèse que le contrôle tumoral amoindri en l'absence du signal Notch pourrait être dû à l'infiltration préférentielle dans certains tissus des LT CD8 suite à la thérapie adoptive, et ce aux dépens de l'infiltration dans la tumeur, ce qui diminuerait la localisation initiale des cellules effectrices dans la tumeur. Pour vérifier s'il y avait une variation de l'infiltration suite au transfert adoptif dépendant du signal Notch, nous avons effectué une expérience de localisation, tel que décrit par l'équipe de Mikucki *et al.* (2015)²⁴⁰. Brièvement, les LT CD8 ont été stimulés *in vitro* tel que précédemment décrit (Fig. 17A), ont été mélangés dans un ratio 1 :1 de cellules fl/fl (CFSE) et Δ/Δ (CTV) et ont été transférées adoptivement dans des souris à J11 post-implantation tumorale. Les souris ont été euthanasiées 1h plus tard pour vérifier l'infiltration et la localisation dans les différents tissus. Cet intervalle de temps est suffisant pour que les cellules complètent les étapes menant à l'extravasation, mais est insuffisant pour le déroulement d'autres processus pouvant influencer l'infiltration des LT CD8, tel que la prolifération *in situ*, la survie, la rétention dans le tissu ou encore la sortie du tissu²⁴⁰. Nous avons injecté un anticorps contre le CD8 β trois minutes avant l'euthanasie afin de discriminer les cellules localisées dans la circulation de celles localisées dans le tissu qui n'auraient été que CD8 α^+ , mais la majorité des cellules étaient positives pour le CD8 β (résultat non montré), indiquant probablement que la plupart des cellules étaient encore dans la circulation au moment de l'euthanasie.

Ainsi, nous constatons d'abord qu'après 1h, il semble y avoir une plus grande accumulation de cellules transférées dans le foie et la rate par rapport aux autres organes (Fig. 22A), ce qui est normal puisque la rate et le foie sont des organes très vascularisés. Un nombre très faible de cellules CD45.2+ ont été retrouvées dans les ganglions lymphatiques drainants et non drainants, rendant limité l'analyse de ces organes. En ce qui a trait à la localisation en fonction de la présence du signal Notch, en effectuant une comparaison par rapport à la proportion fl/fl (CFSE) : Δ/Δ (CTV) avant l'injection ou en l'effectuant par rapport à la proportion dans le sang, il n'y a pas de différence significative de localisation dans les différents organes (Fig. 22B-C). Ainsi, une heure après le transfert adoptif, en l'absence du signal Notch, il n'y a pas de différence de localisation entre les différents tissus.

En bref, lors d'une thérapie adoptive de LT CD8 dans le modèle de mélanome B16-OVA, le contrôle amoindri de la croissance tumorale en l'absence du signal Notch n'est pas causé par une différence d'infiltration des LT CD8 ou par une accumulation de Trm dans la tumeur, ni par une localisation différentielle des LT CD8 suivant le transfert adoptif. Néanmoins, en l'absence de Notch, nous avons observé une accumulation de Trm dans le foie ainsi qu'une plus forte infiltration des LT dans la rate.

2.2.2 Fonctions effectrices et profil d'épuisement des LT CD8 transférés adoptivement en l'absence du signal Notch

Considérant que Notch est connu pour réguler l'expression de molécules effectrices comme la GrzmB et la perforine³⁰⁸, il nous paraissait important de vérifier s'il y avait une différence entre les fonctions effectrices des TIL fl/fl ou Δ/Δ pouvant être responsables du phénotype. Il y avait une tendance à la baisse au niveau de la production de GrzmB par les TIL Δ/Δ (Fig. 23C; $p=0.0685$) et une différence significative au niveau du pourcentage de cellules produisant à la fois de la GrzmB et de l'IFN γ (Fig. 23F; GranzymeB+IFN γ +; $*p<0.05$). Toutefois, il n'y avait pas de différences significatives dans la production des cytokines telles que l'IFN γ , l'IL-2, le TNF α (Fig. 23B, D-E). Ainsi, la production de GrzmB semble plus faible, indiquant qu'une diminution des fonctions effectrices chez les LT CD8 déficients pour le signal Notch aurait pu être en cause dans la différence de survie des groupes traités fl/fl ou Δ/Δ .

Nous nous sommes intéressés à l'expression des différents récepteurs inhibiteurs considérant le rôle important qu'il joue dans l'induction de l'épuisement des LT CD8 dans l'environnement tumoral et avons constaté que les récepteurs inhibiteurs Tim3 et CD39 étaient exprimés de manière bimodale et qu'il y avait une plus faible abondance de LT CD8 positif pour Tim3 et CD39 (Fig. 24C-D; $*p<0.05$) en l'absence du signal Notch. En ce qui a trait à l'expression de Lag3 et CD38 (Fig. 24E-F), il n'y avait pas de différence significative. Quant au récepteur inhibiteur PD-1, il était plus fortement exprimé sur les LT CD8 déficients pour Notch (Fig. 24A; $*p<0.05$). Bref, les TIL déficients pour Notch expriment plus fortement PD-1 et moins fortement Tim3 et CD39.

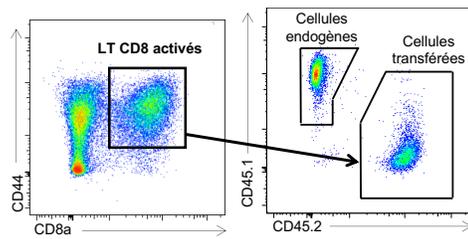
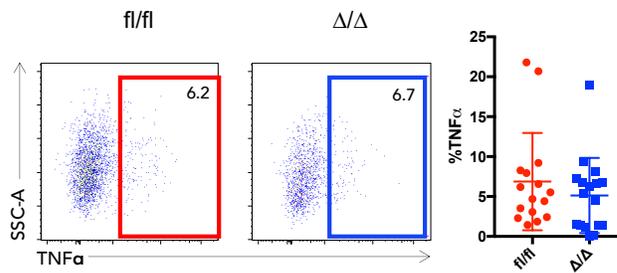
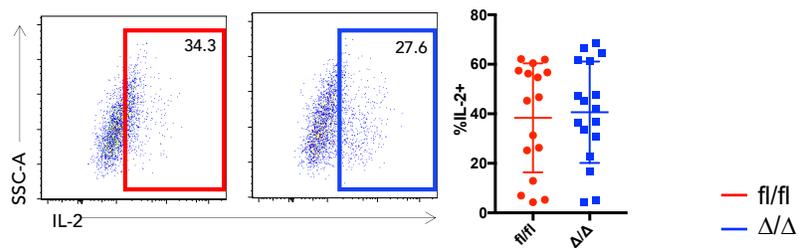
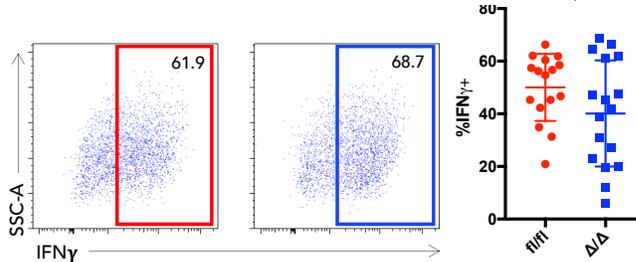
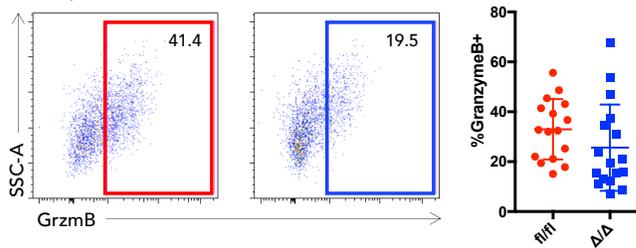
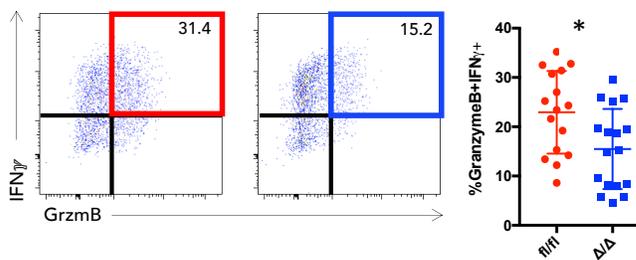
A**B****C****D****E****F**

Figure 23. – La différence de croissance tumorale est associée à une diminution des fonctions effectrices des LT CD8 transférés déficients pour Notch

Les TIL prélevés à J14 post-implantation ont été restimulés *in vitro* pendant 5h en présence de PMA-Iono afin d'évaluer l'expression des molécules effectrices. **(A)** Stratégie d'identification des TIL produisant des molécules effectrices (CD8+CD44+CD45.2+). **(B-F)** Profil d'expression des molécules effectrices **(B)** IFN γ , **(C)** GranzymeB, **(D)** TNF α , **(E)** IL-2 et **(F)** Granzyme B+IFN γ +. Diagramme de FACS et compilation du pourcentage de cellules transférées fl/fl ou Δ/Δ exprimant la molécule effectrice. Les résultats sont issus de 3 expériences indépendantes, avec 3 à 7 souris par groupe. *p<0.05.

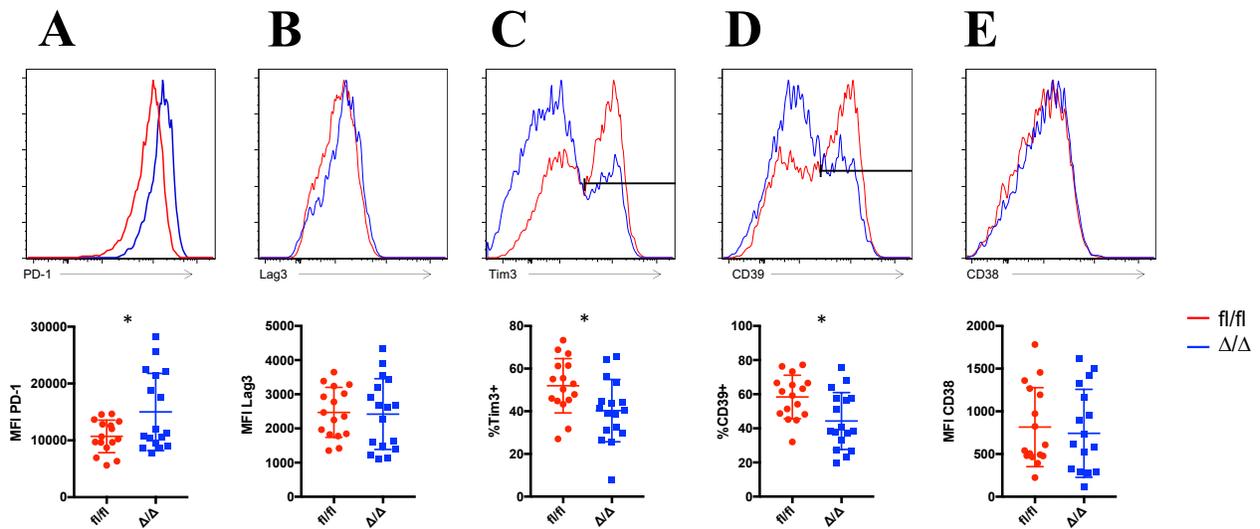


Figure 24. – Les TIL déficients pour Notch expriment plus fortement PD-1 et moins fortement Tim3 et CD39 que les TIL sauvages

Profil d'expression des marqueurs d'épuisement. Histogramme de FACS de PD-1 **(A)**, Lag3 **(B)**, Tim3 **(C)**, CD39 **(D)**, et CD38 **(E)** des LT transférées (CD45.2+) fl/fl ou Δ/Δ avec leur compilation à J14 post-implantation. Les résultats sont issus de trois expériences indépendantes, avec 3 à 7 souris par groupe. *p<0.05

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux stades d'épuisement des TIL. En caractérisant l'abondance des différentes sous-populations de LT CD8 épuisés, nous avons constaté qu'en l'absence de Notch, il y avait une accumulation significative de LT épuisés progéniteurs (Tim3-SlamF6+) et une diminution significative de LT épuisés terminaux (Tim3+SlamF6-) (Fig. 25B; **p<0.01). Ces résultats concordent avec une expression plus faible de Tim3 et CD39 en l'absence du signal Notch (Fig. 25C-D ; *p<0.05), puisque les progéniteurs sont négatifs pour ces deux marqueurs¹⁹⁰. Ainsi, en l'absence du signal Notch1 et Notch2, les LT CD8 sont moins terminalement différenciés.

En constatant la différence significative d'expression de PD-1 sur les TIL déficients pour Notch, nous avons également constaté que les souris traitées avec des cellules Δ/Δ avaient des tumeurs de tailles et de masses significativement plus importantes à J14 (Fig. 26A-B; gauche; *p<0.05). Il était également possible de constater qu'il y avait une forte corrélation positive entre l'expression de PD-1 et la masse tumorale (Fig. 26A; droite; $R^2=0.6625$), ou l'aire tumorale (Fig. 26B; droite ; $R^2=0.5524$). Il est à noter que ces corrélations sont présentées en combinant les valeurs des cellules Δ/Δ et fl/fl (Fig. 26A-B; droite). Ainsi, l'expression de PD-1 semble dépendre de la taille de la tumeur, qui est plus importante chez les souris traitées avec des cellules Δ/Δ .

En bref, lors d'une thérapie adoptive de LT CD8, l'absence du signal Notch prévient un contrôle optimal de la croissance tumorale dans le modèle B16-OVA. Ce phénotype n'est pas dû à une différence d'infiltration causant une localisation ou une accumulation différentielle de LT CD8 en absence du signal Notch. Toutefois, la différence de croissance tumorale est associée à une diminution des fonctions effectrices des LT CD8 transférés déficients pour Notch. Nous avons également constaté que les TIL déficients pour Notch étaient moins terminalement différenciés, mais qu'ils exprimaient plus fortement le récepteur PD-1, ce qui corrélait avec la taille de la tumeur des souris traitées.

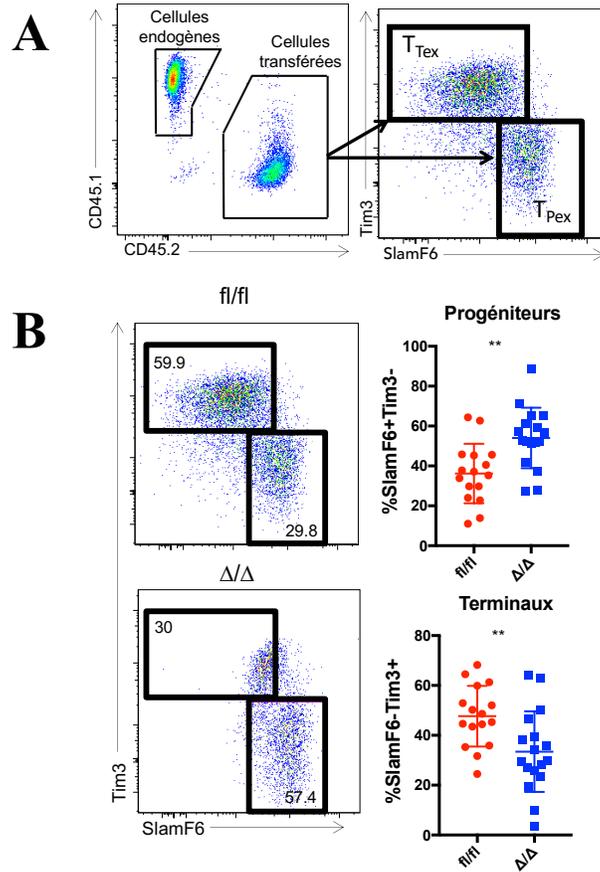


Figure 25. – Les TIL déficients pour Notch sont moins terminalement différenciés que les TIL sauvages

(A) Stratégie d'identification des sous-types de cellules épuisées à J14 post-implantation (CD45.2+). (B) Identification des sous-populations de LT épuisés. Diagrammes de FACS et compilations représentant les LT progéniteurs (Tim3-SlamF6+) et terminalement épuisés (Tim3+SlamF6-) (identifiés sur les cellules transférées CD45.2+). Les résultats sont issus de trois expériences indépendantes, avec 3 à 7 souris par groupe. ** $p < 0.01$.

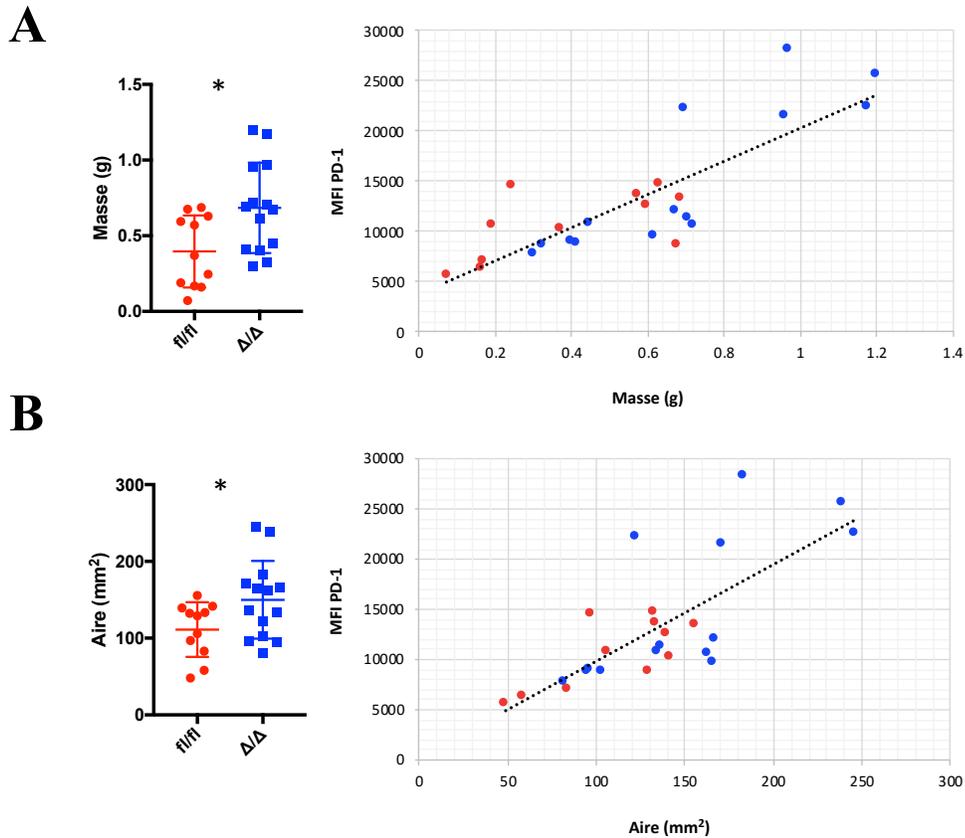


Figure 26. – L'expression de PD-1 par les TIL corrèle avec la taille de la tumeur

(A) Corrélation de l'expression de PD1 avec la masse tumorale. Histogramme de compilation de la masse tumorale (g) à J14 post-implantation des souris traitées avec des cellules fl/fl (rouge) ou Δ/Δ (bleu) (gauche). Diagramme de l'expression de PD-1 des cellules fl/fl (rouge) et Δ/Δ (bleu) en fonction de la masse tumorale à J14 post-implantation (droite). (B) Corrélation de l'expression de PD-1 avec l'aire tumorale. Histogramme de compilation de l'aire tumorale (mm²) à J14 post-implantation des souris traitées avec des cellules fl/fl ou Δ/Δ (gauche). Diagramme de l'expression de PD-1 en fonction de l'aire tumorale d à J14 post-implantation (droite). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes, avec 5 à 7 souris par groupe. * $p < 0.05$.

Discussion

1. La voie de signalisation Notch dans la différenciation des LT CD8 en SLEC-MPEC

Le laboratoire avait déterminé que l'absence du signal Notch menait à une diminution de la génération de SLEC en favorisant la génération de MPEC. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires délinéant ce phénotype, il y a eu identification d'une signature de 217 gènes différentiellement exprimés en l'absence de Notch. Mon premier objectif visait à identifier les gènes pouvant jouer un rôle dans la différenciation SLEC-MPEC en aval de Notch. Pour ce faire, nous avons effectué la comparaison de notre signature avec plusieurs autres signatures issues de la littérature qui mettent en évidence le rôle de la voie dans différents contextes biologiques. Cette stratégie de priorisation se basait sur trois critères, soit la comparaison avec des gènes dont : 1) l'expression est connue pour être directement régulée par le NICD dans les leucémies de type T-ALL; 2) l'expression est modulée par le signal Notch dans les LT CD4 suite à une GVH³³⁵ ; et 3) la chromatine est ouverte pendant l'activation des LT CD8 (provenant d'une expérience publiée d'ATAC-seq et contenant des sites de liaison potentiels pour RBPJκ)³³⁶.

1.1 La surexpression de CD25 dans les LT CD8 est insuffisante pour rétablir la génération des SLEC

Considérant que le gène *Il2ra*, codant pour CD25, correspondait aux trois critères, que son nombre de transcrit était considérablement plus élevé que les autres gènes et surtout, considérant son rôle déjà rapporté dans la littérature dans la différenciation SLEC-MPEC⁵³, nous avons décidé de nous intéresser à son rôle en aval de Notch.

Nous avons ainsi surexprimé CD25 dans des LT CD8 déficients ou non pour Notch et transféré dans une souris infectée par *Listeria*-OVA. Nos résultats nous indiquent de prime à bord que la surexpression du récepteur CD25 seul n'est pas suffisante pour rétablir la génération des SLEC (Fig. 14), ce qui concorde avec des résultats déjà obtenus dans le laboratoire. En effet, il est connu que le niveau d'expression de CD25 dépend de la disponibilité et la concentration d'IL-2 et l'administration d'IL-2 *in vivo* permet d'augmenter l'expression de CD25 sur les LT CD8³⁴. Ainsi, en augmentant la biodisponibilité de l'IL-2 dans un modèle de vaccination DC, Mathieu *et al.* ont constaté que la génération de SLEC n'était pas rétablie en l'absence du signal Notch.

Toutefois, il a déjà été démontré qu'une forte expression de CD25 sur les LT CD8 activé favorisait la différenciation en SLEC, mais nous n'avons pas constaté d'augmentation de la différenciation en SLEC dans les LT CD8 sauvages transduits pour surexprimer CD25 (Fig. 14C-D). Ainsi, en nous intéressant à l'expression de CD25 dans les LT transduits au pic de la réponse effectrice, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de différences significatives au niveau de l'expression de CD25 entre les cellules transduites avec pMig-CD25 et les cellules non transduites (Fig. 15). Cela nous a menés à conclure que CD25 n'était plus surexprimé à J7. Afin de valider la surexpression du récepteur dans notre modèle expérimental tout au long de la réponse immunitaire, nous avons effectué une cinétique de l'expression de CD25 par les LT CD8 transduites de J3 à J5. Nous avons ainsi constaté qu'il n'y avait pas de maintien des cellules CD25+ de J3 à J5 (Fig. 16).

D'une part, il est possible que le vecteur rétroviral utilisé dans notre protocole expérimental ne soit pas capable de surexprimer efficacement CD25. En effet, afin de valider la surexpression de CD25 ainsi que celle du gène rapporteur de la GFP, nous avons vérifié leurs niveaux d'expression *in vitro* 48h après la transduction, soit 72h après la stimulation antigénique (Fig. 13A). Ainsi, les cellules qui avaient été transduites avec le vecteur contenant CD25 présentaient une certaine augmentation de l'expression de CD25 par rapport aux cellules non transduites (Fig 13D). Toutefois, il est connu que l'expression de CD25 est augmentée dans les 24h suivant l'activation des LT CD8, et qu'elle commence à diminuer seulement à partir du J3.5⁵³. Puisque les cellules ayant été transduites avec le vecteur vide et le vecteur contenant CD25 exprimaient toutes deux fortement CD25 à ce stade de la réponse (Fig. 13C), cela rendait la validation de la surexpression *in vitro* impossible.

D'autre part, il est possible que les cellules surexprimant CD25 à J3 ne soient pas maintenues jusqu'au J5, car elles ne reçoivent plus de signaux de survie. En effet, les chaînes β (CD122) et γC du récepteur à l'IL-2 sont aussi des chaînes communes au récepteur à l'IL-15. L'expression de CD122 et γC demeurent constante suite à l'activation des LT CD8^{34,53}, mais une augmentation drastique de l'expression de CD25 pourrait limiter la disponibilité de CD122 et γC à recevoir des signaux de survie provenant de l'IL-15, qui dépend également de ces récepteurs pour sa transpräsentation⁸⁸. En effet, il est connu l'augmentation de la biodisponibilité de l'IL-15 permet d'améliorer la survie des SLEC et de limiter leur contraction^{86,87}. Ainsi, les cellules surexprimant CD25 mourraient de manière prématurées, faute de recevoir les signaux de survie nécessaire. Il

aurait été intéressant de mesurer les niveaux d'apoptose des LT CD8 transduits avec CD25 afin d'évaluer s'il y avait bel et bien une différence de survie.

1.2 Perspectives sur les gènes cibles prioritaires

Ils auraient été intéressants de s'intéresser à d'autres gènes ayant été prioritaires. Dans la littérature, un rôle dans la réponse des LT CD8 avait déjà été décrit pour certains de ces gènes.

En effet, *Bach2* est un gène déjà connu pour restreindre la différenciation en SLEC et dont l'expression est fortement diminuée suite à l'activation des LT CD8 naïfs⁷⁵ ce qui est consistant avec les résultats obtenus de notre expérience de séquençage (Fig. 12D). Toutefois, l'expression de *Bach2* est déjà très faible dans les cellules fl/fl comme dans les Δ/Δ , et *Bach2* est connu pour restreindre l'expression des gènes induits par la signalisation TCR dans les 6h suivant l'activation des LT CD8. Puisque les LT CD8 doivent au préalable avoir été stimulés 24h avant la transduction rétrovirale, cela rend l'utilisation d'une stratégie de modulation rétrovirale de l'expression de ce gène assez difficile. Le gène *Bach2* correspondait au critère 2, de signature Notch dans les LT CD4, et au critère 3, de région ouverte de la chromatine contenant des sites RBPJ κ . L'autre gène correspondant à ces critères est *Lrig1*. Il a été décrit dans la littérature comme un gène suppresseur de tumeur, capable d'inhiber la signalisation récepteurs tyrosine kinase de la famille ERBB³⁴²⁻³⁴⁶. Toutefois, il n'y a pas de rôle connu pour *Lrig1* dans les cellules du système immunitaire et nous ne sommes donc pas intéressés à son rôle dans les LT CD8.

Parmi les gènes prioritaires communs aux trois critères, en plus de *Il2ra*, on pouvait retrouver *Trib2*, dont le rôle dans la réponse des LT CD8 et la différenciation SLEC-MPEC est présentement étudié par notre laboratoire. Il y avait également le gène *Marcks*, qui code pour la protéine *Myristoylated Alanine Rich C-Kinase Substrate* (MARCKS) et qui est hautement conservé chez les vertébrés³⁴⁷. MARCKS est impliquée dans plusieurs processus du développement embryonnaire et sa délétion implique la mort rapide des souris dû à un défaut de fermeture du tube neural³⁴⁸⁻³⁵¹. Ainsi, ses propriétés moléculaires ont beaucoup été étudiées. En effet, MARCKS peut interagir directement avec le cytosquelette et promouvoir la polymérisation de l'actine³⁵²⁻³⁵⁴, mais il peut également séquestrer PIP₂ dans des radeaux lipidiques de la membrane plasmique, limitant la transduction d'événements de signalisation et la génération de second messager³⁵⁵⁻³⁵⁸. Dans le système immunitaire, certaines études suggèrent que MARCKS est impliqué dans la production de

cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les neutrophiles, et dans la régulation de leur migration³⁵⁹⁻³⁶². Il a également été identifié comme un régulateur de la force du signal BCR dans les lymphocytes B, par sa capacité à moduler l'interaction du cytosquelette avec la membrane plasmique³⁶³. Considérant la capacité de MARCKS à interagir avec PIP₂ et avec le cytosquelette et son rôle connu dans la migration, ce gène pourrait définitivement avoir un impact sur la différenciation SLEC-MPEC. De plus, l'expression de *Marcks* est maintenue suite à l'activation des LT CD8 sauvages, tandis qu'elle diminue dans les cellules déficientes pour Notch. Il est possible d'hypothétiser que l'absence de Notch et donc la diminution de l'expression de *Marcks*, implique une modulation de la migration des LT CD8 qui ne recevrait donc pas les mêmes signaux cytokiniques en fonction de leur emplacement. Toutefois, puisque le nombre de transcrits n'était pas très élevé dans les LT CD8 sauvages comme dans les cellules déficientes pour Notch (Fig. 12A), la faible expression du gène nous a convaincus de nous intéresser à d'autres cibles.

Parmi les gènes priorisés communs aux critères 1, de signature T-ALL, et au critère 2, de signature Notch dans les LT CD4, il y avait *Dtx1* et *Mpzl2* (Fig. 12B). Le gène *Dtx1* est une cible connue de la voie Notch qui code pour une E3 ubiquitine ligase et dont l'expression augmente dans les LT CD4 anergique. *Dtx1* a également été décrit comme étant une cible transcriptionnelle de NFAT et comme un régulateur négatif de l'activation des LT^{364,365}. En effet, dans une souris où la surexpression de *Dtx1* est sous le contrôle de la CD4 Cre, les LT CD8 spléniques restimulés *ex vivo* présentaient un défaut significatif de prolifération et de l'expression d'IL-2³⁶⁴. En fonction de ces résultats et considérant que l'expression de *Dtx1* est réduite en l'absence de Notch, ce qui aurait impliqué l'usage d'une stratégie de surexpression, nous avons exclu ce gène cible. *Mpzl2*, quant à lui, code pour la molécule d'adhésion EVA1 dont un rôle a été décrit dans le développement thymique³⁶⁶⁻³⁶⁸. Dans un système *in vitro* où le signal Notch était fourni afin d'induire la différenciation de précurseurs hématopoïétiques en thymocytes, la délétion de *Mpzl2* limitait la progression des thymocytes du stade DN1 à DN3 et ne pouvait pas passer au stade DP pour générer des LT SP CD4 ou CD8³⁶⁶. Puisque *Mpzl2* est faiblement exprimé même dans les LT CD8 sauvages, nous avons également exclu ce gène.

Pour finir, le gène commun au critère 1, de signature T-ALL et au critère 3, de région ouverte de la chromatine contenant des sites RBPJκ, est *Cd226* (Fig. 12C). Celui-ci est exprimé sur une variété de cellules du système immunitaire dont les LT et les cellules NK et joue à la fois

le rôle de récepteur activateur et de molécule d'adhésion qui promouvoit les fonctions cytotoxiques tandis que sa délétion affecte négativement le contrôle tumorale³⁶⁹⁻³⁷⁵. CD226 compétitionne avec les récepteurs inhibiteurs TIGIT et CD96 pour lier les ligands CD155 et CD112, exprimés entre autres sur les CPA et les cellules tumorales³⁷⁶⁻³⁸¹. En tant que molécule d'adhésion, CD226 est capable d'interagir avec le cytosquelette et est colocalisé avec LFA-1 dans la synapse immunologique des LT lorsqu'il est phosphorylé. Récemment, une étude de séquençage à cellules uniques a montré un enrichissement des gènes associés à l'adhésion cellulaire et à la formation de la synapse immunologique dans les LT CD8 exprimant fortement CD226 en comparaison à ceux qui l'exprimait faiblement³⁸². Il a également été démontré que le changement de conformation de LFA-1 en une forme de haute affinité est dépendant de l'expression de CD226 à la surface de la cellule³⁸³. Ainsi, il est possible que CD226 joue un rôle dans la différenciation des LT CD8 activés en aval de la voie Notch considérant ses fonctions déjà décrites comme récepteur activateur et comme molécule d'adhésion.

La stratégie de priorisation que nous avons employée peut-être remise en question. En effet, considérant le rôle de Notch hautement contexte dépendant, il est possible que nous ayons exclus des gènes qui serait importants seulement suite à l'activation des LT CD8, mais pas dans d'autres types cellulaires comme les LT CD4 ou les lignées T-ALL, ce qui suggérant de ne se baser que sur le critère 3, de régions différentiellement accessibles de la chromatine dans les 24h suivant l'activation des LT CD8 et contenant des sites de liaison pour RPBjk. Toutefois, l'usage du critère 2 était intéressant dans la perspective où il permettait d'identifier les gènes régulés par Notch commun au LT CD8 et LT CD4. Puisque leucémies de type T-ALL sont dû à une activation aberrante du récepteur Notch1, peut-être que le critère 1 était plus facultatif.

Il faut aussi prendre en considération que le choix de différenciation SLEC-MPEC est le produit d'un programme transcriptionnel dirigé par l'interaction d'une variété de facteurs de transcription. Toutefois, bien que plusieurs facteurs de transcription étaient différentiellement exprimés en l'absence de Notch, ce n'était pas le cas de la majorité des gènes qui ont été priorisés. Il est aussi fort probable que la coopération de plusieurs de ces gènes soit impliquée dans la génération des SLEC. Ainsi, la modulation de l'expression d'un seul de ces gènes n'est probablement pas suffisante pour rétablir la génération des SLEC. Dans cette perspective, l'usage de vecteur bicistronique, où plus d'un gène peut être modulé en même temps, aurait été intéressant, de même

que l'adoption d'une stratégie de criblage tel que décrit par Chen *et al.* 2014. En effet, leur équipe a développé une approche permettant d'inhiber individuellement un grand nombre de gènes en parallèle, au cours de la différenciation des LT CD8. Leur stratégie expérimentale consistait à transférer adoptivement une souris avec un bassin de LT CD8 P14, contenant des cellules ayant été individuellement transduites avec différents petits ARN en épingle à cheveux (shRNA), puis d'infecter ces souris avec LCMV Arm. Chaque LT transféré contient un code-barre qui varie en fonction du shRNA transduit et la différenciation de chacun de ces LT CD8 suite à l'infection peut être évaluée en effectuant un séquençage profond (*deep sequencing*) de l'ADN des cellules³⁸⁴. La profondeur du séquençage représente le nombre moyen de fois que certains nucléotides sont représentés dans une collection de séquences brutes et aléatoires³⁸⁵. En bref, augmenter la profondeur du séquençage permet la détection des gènes qui sont moins fortement exprimés, ici les codes-barres de shRNA. En établissant le ratio de cellule différenciée en SLEC-MPEC pour un shRNA donné, il est ainsi possible d'identifier les gènes jouant un rôle dans le processus de différenciation³⁸⁴.

2. Rôle de la voie de signalisation Notch dans une thérapie adoptive antitumorale

Mon deuxième objectif visait à évaluer si une thérapie adoptive de lymphocyte T CD8 déficients pour l'expression des récepteurs Notch1 et Notch2 permettait un meilleur contrôle tumoral via leur capacité à se différencier en Trm. Nous avons déterminé que ce n'était pas le cas puisque l'absence du signal Notch prévient un contrôle optimal de la croissance tumorale dans un modèle de mélanome B16-OVA (Fig. 17). Cela est consistant avec des études déjà publiées, rapportant que l'absence du ligand DLL1 sur les DC, ou du récepteur Notch2 sur les LT CD8, diminuait la survie des souris implantées avec une tumeur sous-cutanée^{320,386}.

Nous avons cherché à comprendre les mécanismes exacts dirigeant la diminution du contrôle tumoral en l'absence de Notch. Plusieurs facteurs auraient pu être impliqués, soit une diminution des fonctions effectrices par une plus faible production de cytokines, un état d'épuisement plus prononcé ou encore, une diminution de l'infiltration.

Nous n'avons pas constaté de différences d'infiltration des TIL dans la tumeur en l'absence de Notch. Il y avait bel et bien une accumulation de Trm dans le foie, mais cette aptitude des LT CD8 à se différencier en Trm n'a pas résulté en une plus forte accumulation de Trm dans la tumeur ou en un meilleur contrôle tumoral, ce qui réfute notre hypothèse de départ. Nous nous sommes également questionnés sur la localisation des LT CD8 suite à leur transfert adoptif. En effet, il est évident que Notch régule des processus de localisation et de migration, puisque nous avons observé l'accumulation préférentielle de LT CD8 déficients pour Notch dans le foie et la rate (Fig. 20-21). Ainsi, nous avons cherché à vérifier si les cellules que nous avons transférées infiltraient différemment ces organes suite au transfert par un test de localisation, ce qui aurait pu expliquer le contrôle tumoral amoindri en l'absence de Notch. Nous avons constaté un plus grand pourcentage de LT CD8 transféré CD45.2+ dans le foie, mais cet organe contient des sinusoides hépatiques, qui sont des vaisseaux fenestrés, ce qui expliquerait le pourcentage plus important de cellules CD45.2+. De plus, nous n'avons pas observé de différences de localisation en fonction de l'absence du signal Notch dans le foie, la rate, les ganglions lymphatiques ou la tumeur suite au transfert adoptif (Fig. 22).

Il est évident que l'usage d'un modèle tumoral hétérotopique sous-cutané n'était pas optimal pour exploiter la capacité de différenciation en Trm des LT CD8 déficients pour Notch. D'une part, dans un modèle d'influenza, il a déjà été démontré que la voie Notch contrôlait la génération et la maintenance des Trm du poumon, possiblement via une régulation du métabolisme des Trm¹⁴⁹. En effet, suite à leur transfert adoptif, ces Trm CD69+CD103- s'accumule invariablement dans le foie, que ce soit suite à une infection par *Listeria*-OVA, par LCMV Arm ou encore en l'absence d'infection (résultat non publié). Ainsi pour démontrer notre hypothèse, il aurait été nécessaire d'utiliser un modèle orthotopique dans le foie. Il est possible d'induire l'hépatocarcinogénèse en traitant les souris avec des hépatotoxines ou encore en modifiant leur diète afin de favoriser le développement d'une stéatose hépatique menant à l'hépatocarcinôme³⁸⁷⁻³⁸⁹. Toutefois, ces modèles peuvent prendre plusieurs mois pour induire une lésion néoplasique et ce n'était donc pas une option possible. Il aurait été également possible d'injecter les cellules cancéreuses directement dans la veine porte hépatique ou encore dans la rate suivie d'une splénectomie, ce qui induit la formation de tumeur au foie^{387,390,391}. Considérant que ces procédures sont assez invasives, nécessite d'utiliser des lignées cellulaires fluorescentes combinées à de l'imagerie médicale afin de suivre la croissance tumorale, le modèle tumoral sous-cutané a été favorisé.

2.1 Différenciation des LT CD8 épuisés

En s'intéressant au stade d'épuisement des TIL, nous avons constaté que le jour du prélèvement des TIL, les souris ayant été traitées avec des LT déficients pour Notch avaient de plus grosses tumeurs et que leurs TIL exprimait plus fortement PD-1 (Fig. 26). Nous avons également constaté une corrélation directe entre la taille de la tumeur et une plus forte expression de PD-1. Ces résultats pourraient indiquer que les LT CD8 déficients pour Notch sont plus épuisés, ce qui impliquerait un contrôle tumoral moindre.

Il a été démontré que l'accumulation de TIL TCF1+ était associée à un meilleur pronostic chez les patients²³⁹. Nous avons constaté qu'il y avait une accumulation de LT CD8 progéniteurs ou *stem-like* SlamF6+Tim3-, exprimant TCF1+, lors d'une thérapie adoptive en l'absence de Notch (Fig. 25B). Toutefois cela ne résulte pas en un meilleur contrôle tumoral, car les progéniteurs SlamF6+Tim3- sont associés à de meilleures fonctions prolifératives, une meilleure survie, mais pas à de meilleures fonctions effectrices. Ces cellules sont essentielles à cause de leur capacité se différencier en LT CD8 terminaux SlamF6-Tim3+ qui eux, possèdent de meilleures fonctions cytotoxiques^{222,229-231}. Ainsi, les cellules TCF1+Tim3- produisent peu de GrzmB et n'expriment pas certains récepteurs inhibiteurs, dont CD39, ce qui coïncide avec les phénotypes que nous avons observés. En effet, en l'absence de Notch, les TIL exprimait moins fortement CD39 et Tim3 (Fig. 24C-D) et coexprimaient moins l'IFN γ et la GrzmB (Fig. 23F). Ainsi, une semaine après le transfert adoptif de LT déficients pour Notch, les TIL présentent un phénotype de progéniteurs ou *stem-like* qui ont de plus faibles fonctions effectrices, ce qui résulte probablement en un contrôle tumoral plus faible.

Indépendamment de la présence du signal Notch, nous n'avons constaté qu'une faible abondance dans la tumeur d'une autre sous-population de LT épuisés, soit les cellules transitoires CX3CR1+CD101- (résultat non montré), qui jouent un rôle clé dans le contrôle de l'infection chronique¹⁸⁸. Toutefois, considérant le rôle connu de Notch dans les choix de différenciation des LT CD8, il est possible que l'accumulation de progéniteurs en l'absence de Notch soit due à une limitation de leur capacité de différenciation en LT terminalement épuisés ou dans leur acquisition de fonction effectrice à ce stade. En effet, lors d'une infection par LCMV Cl13, notre laboratoire a

déjà constaté qu'en l'absence de Notch, il y avait également une plus grande accumulation de progéniteurs, mais que le traitement à l'aide d'anticorps bloquants pour PD-L1 ne permettait pas d'éliminer la charge virale (résultats non publiés). Sachant que ce traitement provoque normalement un élan prolifératif des cellules TCF1+ qui se différencieront en LT transitoires et terminaux afin de contribuer au contrôle tumoral ou viral^{179,185,186}, ces résultats supportent l'idée que dans différents contextes d'épuisement, la voie Notch joue un rôle dans la différenciation des LT CD8 progéniteurs en terminaux. Il aurait été intéressant d'administrer le traitement par α PD-L1 en combinaison à notre modèle de thérapie adoptive afin de valider si ce traitement résultait en un moins bon contrôle tumoral en l'absence du signal Notch.

De plus, nous avons décidé de prélever les TIL à J14, soit une semaine après le transfert adoptif, afin de ne pas avoir une différence trop importante de taille de tumeur entre le groupe traité avec des cellules sauvages ou mutantes. Toutefois, il aurait été intéressant de tenter de phénotyper les TIL à un moment plus tardif en variant la quantité de cellules tumorales implantées ou de LT CD8 transférés. Ainsi, il aurait été possible de s'intéresser à un stade d'épuisement plus avancé des TIL déficients pour Notch et de mieux comprendre leur cinétique dans le contexte du cancer. Alternativement, extraire les TIL à J14 afin d'isoler les populations TCF1+ et TCF1- et les mettre en culture nous aurait permis de mesurer plusieurs paramètres *ex vivo* sans la restriction de la croissance tumorale. Il aurait ainsi été intéressant de mesurer leur capacité proliférative ou leur fonction effectrice afin de vérifier si les progéniteurs générés en l'absence de Notch conservaient leur capacité d'autorenouveaulement et s'ils étaient capables de se différencier en LT terminaux *in vitro*.

Conclusion

La réponse des LT CD8 occupe un rôle central dans l'immunité adaptative, que soit dans le contexte d'une infection aiguë ou du cancer. La différenciation des LT CD8 effecteur en LT mémoire, menant à l'établissement d'une mémoire immunitaire fonctionnelle et maintenue à long terme, constitue un aspect crucial de la défense de l'organisme contre une réinfection. En manipulant le système immunitaire afin d'optimiser la réponse lymphocytaire en fonction du contexte, il est possible d'assurer la protection d'individus contre certaines infections et certains cancers. La vaccination en est un bon exemple, permettant de prévenir le développement d'infections potentiellement mortelles chez les individus vaccinés afin de garantir leur survie. Les LT CD8 ont également un rôle de premier rang dans les immunothérapies contre le cancer, par des thérapies adoptives et/ou par l'utilisation d'anticorps bloquants pour les récepteurs inhibiteurs. Une meilleure compréhension des processus de différenciation qui mènent à l'hétérogénéité des LT CD8 au niveau de leur fonction, leur phénotype ou leur localisation est essentielle afin d'optimiser les stratégies de lutte contre les infections et le cancer. Considérant que la voie de signalisation Notch est essentielle à la génération des LT CD8 différenciés de façon terminale (SLEC) suite à une réponse lymphocytaire aiguë, elle occupe un rôle important dans les événements de différenciation des LT CD8 périphériques. Nous avons donc cherché à élucider les mécanismes moléculaires dirigeant ce processus de différenciation. Nous avons également cherché à évaluer le rôle de la voie Notch lors d'une thérapie adoptive de LT CD8 pour le traitement du cancer.

Suite à une infection aiguë en l'absence du signal Notch, 217 gènes étaient différenciellement exprimés dans les LT CD8. Nous avons priorisé ces gènes à l'aide de différents critères afin d'identifier des cibles directes de la voie Notch pouvant jouer un rôle dans la différenciation SLEC-MPEC. Nous avons identifié le gène *Il2ra*, codant pour CD25, dont nous avons modulé l'expression par surexpression rétrovirale. Toutefois, nous avons constaté que la surexpression de CD25 ne suffisait pas à rétablir la génération des SLEC en absence du signal Notch. Notre modèle de surexpression ne permettait pas de maintenir une expression soutenue de CD25 dans les LT CD8 transduits tout au long de la réponse. D'autres gènes ayant été priorisés pourraient être potentiellement impliqués dans ce processus, tels que *Trib2* ou *Marcks*.

Dans le contexte du cancer, nous avons constaté que lors d'une thérapie adoptive de LT CD8, l'absence du signal Notch prévient un contrôle optimal de la croissance tumorale et implique une diminution de la survie des souris. Ce phénotype n'était pas dû à une différence d'infiltration causant une localisation ou une accumulation différentielle de LT CD8 en absence du signal Notch. Toutefois, la différence de croissance tumorale pourrait être causée par une diminution des fonctions effectrices des LT CD8 transférés déficients pour Notch. Nous avons également constaté que les TIL déficients pour Notch étaient moins terminalement différenciés, mais qu'ils exprimaient plus fortement le récepteur PD-1, ce qui corrélait avec la taille de la tumeur des souris traitées. Ainsi, il est clair que la voie de signalisation Notch joue un rôle dans la différenciation des LT CD8 épuisés et que l'activation de la voie dans le contexte d'une infection chronique ou du cancer pourrait contribuer au contrôle de la charge infectieuse ou de la croissance tumorale.

Références bibliographiques

1. Barber, E. K., Dasgupta, J. D., Schlossman, S. F., Trevillyan, J. M. & Rudd, C. E. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *PNAS* **86**, 3277–3281 (1989).
2. Call, M. E., Pyrdol, J., Wiedmann, M. & Wucherpfennig, K. W. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* **111**, 967–979 (2002).
3. Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M. & Bolen, J. B. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**, 301–308 (1988).
4. Luescher, I. F. *et al.* CD8 modulation of T-cell antigen receptor–ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **373**, 353–356 (1995).
5. Wooldridge, L. *et al.* Interaction between the CD8 Coreceptor and Major Histocompatibility Complex Class I Stabilizes T Cell Receptor-Antigen Complexes at the Cell Surface. *J Biol Chem* **280**, 27491–27501 (2005).
6. Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W. & Weiss, A. ZAP-70: A 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. *Cell* **71**, 649–662 (1992).
7. Iwashima, M., Irving, B. A., Oers, N. van, Chan, A. C. & Weiss, A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**, 1136–1139 (1994).
8. Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P. & Samelson, L. E. LAT: The ZAP-70 Tyrosine Kinase Substrate that Links T Cell Receptor to Cellular Activation. *Cell* **92**, 83–92 (1998).
9. Gilliland, L. K. *et al.* Lymphocyte lineage-restricted tyrosine-phosphorylated proteins that bind PLC gamma 1 SH2 domains. *J. Biol. Chem.* **267**, 13610–13616 (1992).
10. Imboden, J. B. & Stobo, J. D. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases

- calcium ions from intracellular stores. *Journal of Experimental Medicine* **161**, 446–456 (1985).
11. Weiss, A., Imboden, J., Shoback, D. & Stobo, J. Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *PNAS* **81**, 4169–4173 (1984).
 12. Díaz-Flores, E., Siliceo, M., Martínez-A, C. & Mérida, I. Membrane Translocation of Protein Kinase C θ during T Lymphocyte Activation Requires Phospholipase C- γ -generated Diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* **278**, 29208–29215 (2003).
 13. Carrasco, S. & Merida, I. Diacylglycerol-dependent Binding Recruits PKC θ and RasGRP1 C1 Domains to Specific Subcellular Localizations in Living T Lymphocytes. *Mol Biol Cell* **15**, 2932–2942 (2004).
 14. Roose, J. P., Mollenauer, M., Ho, M., Kurosaki, T. & Weiss, A. Unusual Interplay of Two Types of Ras Activators, RasGRP and SOS, Establishes Sensitive and Robust Ras Activation in Lymphocytes. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 2732–2745 (2007).
 15. Ebinu, J. O. *et al.* RasGRP, a Ras Guanyl Nucleotide- Releasing Protein with Calcium- and Diacylglycerol-Binding Motifs. *Science* **280**, 1082–1086 (1998).
 16. Cantrell, D. A. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* **105**, 369–374 (2002).
 17. Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E. & Weiss, A. LAT is required for TCR-mediated activation of PLC γ 1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**, 617–626 (1998).
 18. Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Triple, R. P. & Samelson, L. E. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**, 83–92 (1998).

19. Paz, P. E. *et al.* Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem J* **356**, 461–471 (2001).
20. Chen, L., Glover, J. N. M., Hogan, P. G., Rao, A. & Harrison, S. C. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* **392**, 42–48 (1998).
21. Macián, F. *et al.* Transcriptional Mechanisms Underlying Lymphocyte Tolerance. *Cell* **109**, 719–731 (2002).
22. Thompson, C. B. *et al.* CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1333–1337 (1989).
23. Starbeck-Miller, G. R., Xue, H.-H. & Harty, J. T. IL-12 and type I interferon prolong the division of activated CD8 T cells by maintaining high-affinity IL-2 signaling in vivo. *J Exp Med* **211**, 105–120 (2014).
24. Aichele, P. *et al.* Cutting Edge: CD8 T Cells Specific for Lymphocytic Choriomeningitis Virus Require Type I IFN Receptor for Clonal Expansion. *The Journal of Immunology* **176**, 4525–4529 (2006).
25. Keppler, S. J., Theil, K., Vucikuja, S. & Aichele, P. Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: Role of direct IL-12 signals for cell fate decision of CD8+ T cells. *European Journal of Immunology* **39**, 1774–1783 (2009).
26. Keppler, S. J., Rosenits, K., Koegl, T., Vucikuja, S. & Aichele, P. Signal 3 Cytokines as Modulators of Primary Immune Responses during Infections: The Interplay of Type I IFN and IL-12 in CD8 T Cell Responses. *PLOS ONE* **7**, e40865 (2012).

27. Kolumam, G. A., Thomas, S., Thompson, L. J., Sprent, J. & Murali-Krishna, K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* **202**, 637–650 (2005).
28. Liao, W., Lin, J.-X. & Leonard, W. J. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity* **38**, 13–25 (2013).
29. Takeshita, T. *et al.* Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* **257**, 379–382 (1992).
30. Wang, X., Rickert, M. & Garcia, K. C. Structure of the Quaternary Complex of Interleukin-2 with Its α , β , and γ c Receptors. *Science* **310**, 1159–1163 (2005).
31. Stauber, D. J., Debler, E. W., Horton, P. A., Smith, K. A. & Wilson, I. A. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2788–2793 (2006).
32. Lin, J.-X. *et al.* Critical Role of STAT5 Transcription Factor Tetramerization for Cytokine Responses and Normal Immune Function. *Immunity* **36**, 586–599 (2012).
33. Kim, H. P., Imbert, J. & Leonard, W. J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **17**, 349–366 (2006).
34. Blattman, J. N. *et al.* Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nature Medicine* **9**, 540–547 (2003).
35. Bachmann, M. F., Wolint, P., Walton, S., Schwarz, K. & Oxenius, A. Differential role of IL-2R signaling for CD8⁺ T cell responses in acute and chronic viral infections. *European Journal of Immunology* **37**, 1502–1512 (2007).
36. Williams, M. A., Tyznik, A. J. & Bevan, M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* **441**, 890–893 (2006).

37. Pipkin, M. E. *et al.* Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity* **32**, 79–90 (2010).
38. Reem, G. H. & Yeh, N. H. Interleukin 2 regulates expression of its receptor and synthesis of gamma interferon by human T lymphocytes. *Science* **225**, 429–430 (1984).
39. Kasahara, T., Hooks, J. J., Dougherty, S. F. & Oppenheim, J. J. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *The Journal of Immunology* **130**, 1784–1789 (1983).
40. Hinrichs, C. S. *et al.* IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8⁺ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* **111**, 5326–5333 (2008).
41. Janas, M. L., Groves, P., Kienzle, N. & Kelso, A. IL-2 Regulates Perforin and Granzyme Gene Expression in CD8⁺ T Cells Independently of Its Effects on Survival and Proliferation. *The Journal of Immunology* **175**, 8003–8010 (2005).
42. Obar, J. J., Khanna, K. M. & Lefrançois, L. Endogenous Naive CD8⁺ T Cell Precursor Frequency Regulates Primary and Memory Responses to Infection. *Immunity* **28**, 859–869 (2008).
43. Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H. K. W., Hasan, M. & Albert, M. L. Enumeration of human antigen-specific naive CD8⁺ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* **115**, 3718–3725 (2010).
44. Van Braeckel-Budimir, N. *et al.* A T Cell Receptor Locus Harbors a Malaria-Specific Immune Response Gene. *Immunity* **47**, 835-847.e4 (2017).
45. Blattman, J. N. *et al.* Estimating the Precursor Frequency of Naive Antigen-specific CD8 T Cells. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 657–664 (2002).

46. Murali-Krishna, K. *et al.* Counting Antigen-Specific CD8 T Cells: A Reevaluation of Bystander Activation during Viral Infection. *Immunity* **8**, 177–187 (1998).
47. Butz, E. A. & Bevan, M. J. Massive Expansion of Antigen-Specific CD8⁺ T Cells during an Acute Virus Infection. *Immunity* **8**, 167–175 (1998).
48. Doherty, P. C. Update: The Numbers Game for Virus-Specific CD8⁺ T Cells. *Science* **280**, 227–227 (1998).
49. Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. & Lefrançois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* **1**, 426–432 (2000).
50. Kaech, S. M. *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature Immunology* **4**, 1191–1198 (2003).
51. Joshi, N. S. *et al.* Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* **27**, 281–295 (2007).
52. Sarkar, S. *et al.* Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *ARTICLE* **205**, 16 (2008).
53. Kalia, V. *et al.* Prolonged Interleukin-2R α Expression on Virus-Specific CD8⁺ T Cells Favors Terminal-Effector Differentiation In Vivo. *Immunity* **32**, 91–103 (2010).
54. Xin, A. *et al.* A molecular threshold for effector CD8⁺ T cell differentiation controlled by transcription factors Blimp-1 and T-bet. *Nature Immunology* **17**, 422–432 (2016).
55. Boulet, S., Daudelin, J.-F. & Labrecque, N. IL-2 Induction of Blimp-1 Is a Key In Vivo Signal for CD8⁺ Short-Lived Effector T Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* **193**, 1847–1854 (2014).
56. Kallies, A. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nature Immunology* **7**, 466–474 (2006).

57. Rutishauser, R. L. *et al.* Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8⁺ T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties. *Immunity* **31**, 296–308 (2009).
58. Kallies, A., Xin, A., Belz, G. T. & Nutt, S. L. Blimp-1 Transcription Factor Is Required for the Differentiation of Effector CD8⁺ T Cells and Memory Responses. *Immunity* **31**, 283–295 (2009).
59. Gong, D. & Malek, T. R. Cytokine-Dependent Blimp-1 Expression in Activated T Cells Inhibits IL-2 Production. *The Journal of Immunology* **178**, 242–252 (2007).
60. Ichii, H. *et al.* Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8⁺ T cells. *Nature Immunology* **3**, 558–563 (2002).
61. Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y. & Tokuhsa, T. Bcl6 Acts as an Amplifier for the Generation and Proliferative Capacity of Central Memory CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* **173**, 883–891 (2004).
62. 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. *The Journal of Immunology* (2019) doi:10.4049/jimmunol.1900014.
63. Tunyaplin, C. *et al.* Direct Repression of *prdm1* by Bcl-6 Inhibits Plasmacytic Differentiation. *J Immunol* **173**, 1158–1165 (2004).
64. Masson, F. *et al.* Id2-Mediated Inhibition of E2A Represses Memory CD8⁺ T Cell Differentiation. *J.I.* **190**, 4585–4594 (2013).
65. Yang, C. Y. *et al.* The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8⁺ T cell subsets. *Nature Immunology* **12**, 1221–1229 (2011).
66. Knell, J. *et al.* Id2 Influences Differentiation of Killer Cell Lectin-like Receptor G1hi Short-Lived CD8⁺ Effector T Cells. *The Journal of Immunology* **190**, 1501–1509 (2013).

67. Cannarile, M. A. *et al.* Transcriptional regulator Id2 mediates CD8 + T cell immunity. *Nature Immunology* **7**, 1317–1325 (2006).
68. Ji, Y. *et al.* Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* **12**, 1230–1237 (2011).
69. Jeannet, G. *et al.* Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *PNAS* **107**, 9777–9782 (2010).
70. Zhou, X. *et al.* Differentiation and Persistence of Memory CD8+ T Cells Depend on T Cell Factor 1. *Immunity* **33**, 229–240 (2010).
71. Banerjee, A. *et al.* The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8+ T Cells to Compete for the Memory Cell Niche. *J Immunol* **185**, 4988–4992 (2010).
72. Pearce, E. L. *et al.* Control of Effector CD8+ T Cell Function by the Transcription Factor Eomesodermin. *Science* **302**, 1041–1043 (2003).
73. Omilusik, K. D. *et al.* Transcriptional repressor ZEB2 promotes terminal differentiation of CD8+ effector and memory T cell populations during infection. *J Exp Med* **212**, 2027–2039 (2015).
74. Guan, T. *et al.* ZEB1, ZEB2, and the miR-200 family form a counterregulatory network to regulate CD8+ T cell fates. *J Exp Med* **215**, 1153–1168 (2018).
75. Roychoudhuri, R. *et al.* BACH2 regulates CD8+ T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nat Immunol* **17**, 851–860 (2016).
76. Odagiu, L. *et al.* Early programming of CD8+ T cell response by the orphan nuclear receptor NR4A3. *PNAS* **117**, 24392–24402 (2020).
77. Kurachi, M. *et al.* Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8+ T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration. *J Exp Med* **208**, 1605–1620 (2011).

78. Kohlmeier, J. E. *et al.* Inflammatory chemokine receptors regulate CD8⁺ T cell contraction and memory generation following infection. *J Exp Med* **208**, 1621–1634 (2011).
79. Hu, J. K., Kagari, T., Clingan, J. M. & Matloubian, M. Expression of chemokine receptor CXCR3 on T cells affects the balance between effector and memory CD8 T-cell generation. *PNAS* **108**, E118–E127 (2011).
80. van Lier, R. A. W., ten Berge, I. J. M. & Gamadia, L. E. Human CD8 + T-cell differentiation in response to viruses. *Nat Rev Immunol* **3**, 931–939 (2003).
81. Yu, B. *et al.* Epigenetic landscapes reveal transcription factors that regulate CD8 + T cell differentiation. *Nature Immunology* **18**, 573–582 (2017).
82. Yoshida, H. *et al.* The cis-Regulatory Atlas of the Mouse Immune System. *Cell* **176**, 897-912.e20 (2019).
83. Badovinac, V. P., Porter, B. B. & Harty, J. T. CD8 + T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature Immunology* **5**, 809–817 (2004).
84. Hand, T. W., Morre, M. & Kaech, S. M. Expression of IL-7 receptor α is necessary but not sufficient for the formation of memory CD8 T cells during viral infection. *PNAS* **104**, 11730–11735 (2007).
85. Haring, J. S. *et al.* Constitutive Expression of IL-7 Receptor α Does Not Support Increased Expansion or Prevent Contraction of Antigen-Specific CD4 or CD8 T Cells following *Listeria monocytogenes* Infection. *The Journal of Immunology* **180**, 2855–2862 (2008).
86. Yajima, T. *et al.* IL-15 Regulates CD8⁺ T Cell Contraction during Primary Infection. *The Journal of Immunology* **176**, 507–515 (2006).
87. Rubinstein, M. P. *et al.* IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8⁺ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood* **112**, 3704–3712 (2008).

88. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. A. & Tagaya, Y. IL-15R α Recycles and Presents IL-15 In trans to Neighboring Cells. *Immunity* **17**, 537–547 (2002).
89. Pellegrini, M., Belz, G., Bouillet, P. & Strasser, A. Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *PNAS* **100**, 14175–14180 (2003).
90. Wojciechowski, S. *et al.* Bim mediates apoptosis of CD127^{lo} effector T cells and limits T cell memory. *European Journal of Immunology* **36**, 1694–1706 (2006).
91. Prlic, M. & Bevan, M. J. Exploring regulatory mechanisms of CD8⁺ T cell contraction. *PNAS* **105**, 16689–16694 (2008).
92. Carrio, R., Rolle, C. E. & Malek, T. R. Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8⁺ memory T cells. *European Journal of Immunology* **37**, 3078–3088 (2007).
93. Becker, T. C. *et al.* Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-specific Memory CD8 T Cells. *J Exp Med* **195**, 1541–1548 (2002).
94. Berard, M., Brandt, K., Paus, S. B. & Tough, D. F. IL-15 Promotes the Survival of Naive and Memory Phenotype CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* **170**, 5018–5026 (2003).
95. Slifka, M. K. & Whitton, J. L. Functional avidity maturation of CD8 + T cells without selection of higher affinity TCR. *Nature Immunology* **2**, 711–717 (2001).
96. Kumar, R. *et al.* Increased Sensitivity of Antigen-Experienced T Cells through the Enrichment of Oligomeric T Cell Receptor Complexes. *Immunity* **35**, 375–387 (2011).
97. Moogk, D. *et al.* Constitutive Lck Activity Drives Sensitivity Differences between CD8⁺ Memory T Cell Subsets. *The Journal of Immunology* **197**, 644–654 (2016).
98. Bachmann, M. F. *et al.* Developmental Regulation of Lck Targeting to the CD8 Coreceptor Controls Signaling in Naive and Memory T Cells. *J Exp Med* **189**, 1521–1530 (1999).

99. Kaech, S. M., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* **2**, 251–262 (2002).
100. Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A. & Rocha, B. Response of naïve and memory CD8 + T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature Immunology* **1**, 47–53 (2000).
101. Abdelsamed, H. A. *et al.* Human memory CD8 T cell effector potential is epigenetically preserved during in vivo homeostasis. *J Exp Med* **214**, 1593–1606 (2017).
102. Akondy, R. S. *et al.* Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination. *Nature* **552**, 362–367 (2017).
103. Bachmann, M. F., Barner, M., Viola, A. & Kopf, M. Distinct kinetics of cytokine production and cytotoxicity in effector and memory T cells after viral infection. *European Journal of Immunology* **29**, 291–299 (1999).
104. Soudja, S. M., Ruiz, A. L., Marie, J. C. & Lauvau, G. Inflammatory Monocytes Activate Memory CD8+ T and Innate NK Lymphocytes Independent of Cognate Antigen during Microbial Pathogen Invasion. *Immunity* **37**, 549–562 (2012).
105. Raué, H.-P., Beadling, C., Haun, J. & Slifka, M. K. Cytokine-Mediated Programmed Proliferation of Virus-Specific CD8+ Memory T Cells. *Immunity* **38**, 131–139 (2013).
106. Campbell, J. J. *et al.* 6-C-kine (SLC), a Lymphocyte Adhesion-triggering Chemokine Expressed by High Endothelium, Is an Agonist for the MIP-3 β Receptor CCR7. *J Cell Biol* **141**, 1053–1059 (1998).
107. Förster, R. *et al.* CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell* **99**, 23–33 (1999).

108. Jung, Y. W., Rutishauser, R. L., Joshi, N. S., Haberman, A. M. & Kaech, S. M. Differential Localization of Effector and Memory CD8 T Cell Subsets in Lymphoid Organs during Acute Viral Infection. *The Journal of Immunology* **185**, 5315–5325 (2010).
109. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L. & Lefrançois, L. Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Science* **291**, 2413–2417 (2001).
110. Wherry, E. J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature Immunology* **4**, 225–234 (2003).
111. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
112. Mackay, L. K. *et al.* Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science* **352**, 459–463 (2016).
113. Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E. J., Barber, D. L. & Ahmed, R. Cutting Edge: Gut Microenvironment Promotes Differentiation of a Unique Memory CD8 T Cell Population. *The Journal of Immunology* **176**, 2079–2083 (2006).
114. Masopust, D. *et al.* Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med* **207**, 553–564 (2010).
115. Gebhardt, T. *et al.* Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nature Immunology* **10**, 524–530 (2009).
116. Wakim, L. M., Waithman, J., Rooijen, N. van, Heath, W. R. & Carbone, F. R. Dendritic Cell-Induced Memory T Cell Activation in Nonlymphoid Tissues. *Science* **319**, 198–202 (2008).

117. Masopust, D. *et al.* Activated Primary and Memory CD8 T Cells Migrate to Nonlymphoid Tissues Regardless of Site of Activation or Tissue of Origin. *The Journal of Immunology* **172**, 4875–4882 (2004).
118. Ariotti, S. *et al.* Skin-resident memory CD8⁺ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science* **346**, 101–105 (2014).
119. Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Vezys, V. & Masopust, D. Sensing and alarm function of resident memory CD8⁺ T cells. *Nature Immunology* **14**, 509–513 (2013).
120. Han, S.-J. *et al.* White Adipose Tissue Is a Reservoir for Memory T Cells and Promotes Protective Memory Responses to Infection. *Immunity* **47**, 1154–1168.e6 (2017).
121. Thome, J. J. C. *et al.* Spatial Map of Human T Cell Compartmentalization and Maintenance over Decades of Life. *Cell* **159**, 814–828 (2014).
122. Sathaliyawala, T. *et al.* Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* **38**, 187–197 (2013).
123. Beura, L. K. *et al.* T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity* **48**, 327–338.e5 (2018).
124. Pascutti, M. F. *et al.* Peripheral and systemic antigens elicit an expandable pool of resident memory CD8⁺ T cells in the bone marrow. *European Journal of Immunology* **49**, 853–872 (2019).
125. Schenkel, J. M., Fraser, K. A. & Masopust, D. Resident memory CD8 T cells occupy frontline niches in secondary lymphoid organs. *J Immunol* **192**, 2961–2964 (2014).
126. Jiang, X. *et al.* Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ T RM cells providing global skin immunity. *Nature* **483**, 227–231 (2012).
127. Casey, K. A. *et al.* Antigen-Independent Differentiation and Maintenance of Effector-like Resident Memory T Cells in Tissues. *The Journal of Immunology* **188**, 4866–4875 (2012).

128. Mackay, L. K. *et al.* The developmental pathway for CD103 + CD8 + tissue-resident memory T cells of skin. *Nature Immunology* **14**, 1294–1301 (2013).
129. Cheuk, S. *et al.* CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8+ T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. *Immunity* **46**, 287–300 (2017).
130. Ray, S. J. *et al.* The Collagen Binding $\alpha 1\beta 1$ Integrin VLA-1 Regulates CD8 T Cell-Mediated Immune Protection against Heterologous Influenza Infection. *Immunity* **20**, 167–179 (2004).
131. Roberts, A., Brolin, R. E. & Ebert, E. C. Integrin $\alpha 1\beta 1$ (VLA-1) mediates adhesion of activated intraepithelial lymphocytes to collagen. *Immunology* **97**, 679–685 (1999).
132. McNamara, H. A. *et al.* Up-regulation of LFA-1 allows liver-resident memory T cells to patrol and remain in the hepatic sinusoids. *Science Immunology* **2**, (2017).
133. Fernandez-Ruiz, D. *et al.* Liver-Resident Memory CD8 + T Cells Form a Front-Line Defense against Malaria Liver-Stage Infection. *Immunity* **45**, 889–902 (2016).
134. Matloubian, M. *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355–360 (2004).
135. Schwab, S. R. *et al.* Lymphocyte Sequestration Through S1P Lyase Inhibition and Disruption of S1P Gradients. *Science* **309**, 1735–1739 (2005).
136. Carlson, C. M. *et al.* Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* **442**, 299–302 (2006).
137. Bai, A., Hu, H., Yeung, M. & Chen, J. Krüppel-Like Factor 2 Controls T Cell Trafficking by Activating L-Selectin (CD62L) and Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Transcription. *The Journal of Immunology* **178**, 7632–7639 (2007).

138. Preston, G. C., Feijoo-Carnero, C., Schurch, N., Cowling, V. H. & Cantrell, D. A. The Impact of KLF2 Modulation on the Transcriptional Program and Function of CD8 T Cells. *PLOS ONE* **8**, e77537 (2013).
139. Simms, P. E. & Ellis, T. M. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**, 301–304 (1996).
140. Topham, D. J. & Reilly, E. C. Tissue-Resident Memory CD8⁺ T Cells: From Phenotype to Function. *Front Immunol* **9**, (2018).
141. Shiow, L. R. *et al.* CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P 1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* **440**, 540–544 (2006).
142. Bankovich, A. J., Shiow, L. R. & Cyster, J. G. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J Biol Chem* **285**, 22328–22337 (2010).
143. Lo, C. G., Xu, Y., Proia, R. L. & Cyster, J. G. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med* **201**, 291–301 (2005).
144. Skon, C. N. *et al.* Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 1285–1293 (2013).
145. Mackay, L. K. *et al.* Cutting Edge: CD69 Interference with Sphingosine-1-Phosphate Receptor Function Regulates Peripheral T Cell Retention. *The Journal of Immunology* **194**, 2059–2063 (2015).
146. Mackay, L. K. *et al.* T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF- β and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity* **43**, 1101–1111 (2015).

147. Zhang, N. & Bevan, M. J. Transforming Growth Factor- β Signaling Controls the Formation and Maintenance of Gut-Resident Memory T Cells by Regulating Migration and Retention. *Immunity* **39**, 687–696 (2013).
148. Wu, J. *et al.* T Cell Factor 1 Suppresses CD103⁺ Lung Tissue-Resident Memory T Cell Development. *Cell Reports* **31**, 107484 (2020).
149. Hombrink, P. *et al.* Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8⁺ lung-resident memory T cells. *Nature Immunology* **17**, 1467–1478 (2016).
150. Milner, J. J. *et al.* Runx3 programs CD8⁺ T cell residency in non-lymphoid tissues and tumors. *Nature* **552**, 253–257 (2017).
151. Kurd, N. S. *et al.* Early precursors and molecular determinants of tissue-resident memory CD8⁺ T lymphocytes revealed by single-cell RNA sequencing. *Science Immunology* **5**, (2020).
152. Milner, J. J. *et al.* Heterogenous Populations of Tissue-Resident CD8⁺ T Cells Are Generated in Response to Infection and Malignancy. *Immunity* **52**, 808-824.e7 (2020).
153. Kumar, B. V. *et al.* Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Reports* **20**, 2921–2934 (2017).
154. Wakim, L. M. *et al.* The Molecular Signature of Tissue Resident Memory CD8 T Cells Isolated from the Brain. *The Journal of Immunology* **189**, 3462–3471 (2012).
155. Franciszkiwicz, K. *et al.* CD103 or LFA-1 Engagement at the Immune Synapse between Cytotoxic T Cells and Tumor Cells Promotes Maturation and Regulates T-cell Effector Functions. *Cancer Res* **73**, 617–628 (2013).

156. Floc'h, A. L. *et al.* Minimal Engagement of CD103 on Cytotoxic T Lymphocytes with an E-Cadherin-Fc Molecule Triggers Lytic Granule Polarization via a Phospholipase C γ -Dependent Pathway. *Cancer Res* **71**, 328–338 (2011).
157. Komdeur, F. L. *et al.* CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-reactive intraepithelial CD8+ T cells associated with prognostic benefit and therapy response in cervical cancer. *OncoImmunology* **6**, e1338230 (2017).
158. Wang Bo *et al.* CD103+ Tumor Infiltrating Lymphocytes Predict a Favorable Prognosis in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder. *Journal of Urology* **194**, 556–562 (2015).
159. Djenidi, F. *et al.* CD8+CD103+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Tumor-Specific Tissue-Resident Memory T Cells and a Prognostic Factor for Survival in Lung Cancer Patients. *The Journal of Immunology* **194**, 3475–3486 (2015).
160. Amsen, D., van Gisbergen, K. P. J. M., Hombrink, P. & van Lier, R. A. W. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nature Immunology* **19**, 538–546 (2018).
161. Wherry, E. J., Barber, D. L., Kaech, S. M., Blattman, J. N. & Ahmed, R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16004–16009 (2004).
162. Zajac, A. J. *et al.* Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *J Exp Med* **188**, 2205–2213 (1998).
163. Canale, F. P. *et al.* CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells. *Cancer Res* **78**, 115–128 (2018).
164. Richter, K., Agnellini, P. & Oxenius, A. On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *Int Immunol* **22**, 13–23 (2010).

165. Jin, H.-T. *et al.* Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *PNAS* **107**, 14733–14738 (2010).
166. Wherry, E. J. *et al.* Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity* **27**, 670–684 (2007).
167. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* **10**, 29–37 (2009).
168. Matloubian, M., Kolhekar, S. R., Somasundaram, T. & Ahmed, R. Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology* **67**, 7340–7349 (1993).
169. Matloubian, M., Somasundaram, T., Kolhekar, S. R., Selvakumar, R. & Ahmed, R. Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice. *J Exp Med* **172**, 1043–1048 (1990).
170. Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Most, R. van der & Ahmed, R. Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *Journal of Virology* **77**, 4911–4927 (2003).
171. Mohammadzadeh, A. Co-inhibitory receptors, transcription factors and tolerance. *International Immunopharmacology* **84**, 106572 (2020).
172. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology* **15**, 486–499 (2015).
173. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* **209**, 1201–1217 (2012).

174. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology* **173**, 945–954 (2004).
175. Sheppard, K.-A. *et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Letters* **574**, 37–41 (2004).
176. Agata, Y. *et al.* Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* **8**, 765–772 (1996).
177. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
178. Quigley, M. *et al.* Transcriptional analysis of HIV-specific CD8 + T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nature Medicine* **16**, 1147–1151 (2010).
179. Blackburn, S. D., Shin, H., Freeman, G. J. & Wherry, E. J. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by α PD-L1 blockade. *PNAS* **105**, 15016–15021 (2008).
180. Paley, M. A. *et al.* Progenitor and Terminal Subsets of CD8+ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science* **338**, 1220–1225 (2012).
181. Im, S. J. *et al.* Defining CD8 + T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417–421 (2016).
182. Leong, Y. A. *et al.* CXCR5 + follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles. *Nature Immunology* **17**, 1187–1196 (2016).
183. He, R. *et al.* Follicular CXCR5-expressing CD8 + T cells curtail chronic viral infection. *Nature* **537**, 412–416 (2016).

184. Wu, T. *et al.* The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. *Sci Immunol* **1**, (2016).
185. Utzschneider, D. T. *et al.* T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8⁺ T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity* **45**, 415–427 (2016).
186. Im, S. J. *et al.* Defining CD8⁺ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417–421 (2016).
187. He, R. *et al.* Follicular CXCR5-expressing CD8⁺ T cells curtail chronic viral infection. *Nature* **537**, 412–416 (2016).
188. Hudson, W. H. *et al.* Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1⁺ Stem-like CD8⁺ T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **51**, 1043-1058.e4 (2019).
189. Zander, R. *et al.* CD4⁺ T Cell Help Is Required for the Formation of a Cytolytic CD8⁺ T Cell Subset that Protects against Chronic Infection and Cancer. *Immunity* **51**, 1028-1042.e4 (2019).
190. Beltra, J.-C. *et al.* Developmental Relationships of Four Exhausted CD8⁺ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity* **52**, 825-841.e8 (2020).
191. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
192. Koebel, C. M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**, 903–907 (2007).
193. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).

194. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991–998 (2002).
195. Willimsky, G. & Blankenstein, T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* **437**, 141–146 (2005).
196. Radoja, S., Rao, T. D., Hillman, D. & Frey, A. B. Mice Bearing Late-Stage Tumors Have Normal Functional Systemic T Cell Responses In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology* **164**, 2619–2628 (2000).
197. Maleno, I., López-Nevot, M. A., Cabrera, T., Salinero, J. & Garrido, F. Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* **51**, 389–396 (2002).
198. Benitez, R. *et al.* Mutations of the β 2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* **52**, 520–529 (1998).
199. Restifo, N. P. *et al.* Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* **177**, 265–272 (1993).
200. Johnsen, A. K., Templeton, D. J., Sy, M.-S. & Harding, C. V. Deficiency of Transporter for Antigen Presentation (TAP) in Tumor Cells Allows Evasion of Immune Surveillance and Increases Tumorigenesis. *The Journal of Immunology* **163**, 4224–4231 (1999).
201. Strauss, L. *et al.* A Unique Subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T Cells Secreting Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β 1 Mediates Suppression in the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res* **13**, 4345–4354 (2007).

202. Rodriguez, P. C. *et al.* Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* **64**, 5839–5849 (2004).
203. Gocheva, V. *et al.* IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev* **24**, 241–255 (2010).
204. Srivastava, M. K., Sinha, P., Clements, V. K., Rodriguez, P. & Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-derived Suppressor Cells Inhibit T Cell Activation by Depleting Cystine and Cysteine. *Cancer Res* **70**, 68–77 (2010).
205. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* **8**, 793–800 (2002).
206. Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *PNAS* **99**, 12293–12297 (2002).
207. Thompson, R. H. *et al.* Tumor B7-H1 Is Associated with Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma Patients with Long-term Follow-up. *Cancer Res* **66**, 3381–3385 (2006).
208. Azuma, T. *et al.* B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* **111**, 3635–3643 (2008).
209. Hirano, F. *et al.* Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity. *Cancer Res* **65**, 1089–1096 (2005).
210. Park, J.-J. *et al.* B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood* **116**, 1291–1298 (2010).
211. Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity* **27**, 111–122 (2007).

212. Latchman, Y. E. *et al.* PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *PNAS* **101**, 10691–10696 (2004).
213. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* **192**, 1027–1034 (2000).
214. Brahmer, J. R. *et al.* Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine* **366**, 2455–2465 (2012).
215. Topalian, S. L. *et al.* Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *The New England journal of medicine* **366**, 2443 (2012).
216. Ahmadzadeh, M. *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* **114**, 1537–1544 (2009).
217. Mumprecht, S., Schürch, C., Schwaller, J., Solenthaler, M. & Ochsenbein, A. F. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* **114**, 1528–1536 (2009).
218. Fourcade, J. *et al.* PD-1 Is a Regulator of NY-ESO-1-Specific CD8⁺ T Cell Expansion in Melanoma Patients. *The Journal of Immunology* **182**, 5240–5249 (2009).
219. Thommen, D. S. *et al.* Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer Immunol Res* **3**, 1344–1355 (2015).
220. Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 2187–2194 (2010).
221. Schietinger, A. *et al.* Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity* **45**, 389–401 (2016).

222. Philip, M. *et al.* Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* **545**, 452–456 (2017).
223. Trautmann, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8 + T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine* **12**, 1198–1202 (2006).
224. Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350–354 (2006).
225. Baitsch, L. *et al.* Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest* **121**, 2350–2360 (2011).
226. Ghoneim, H. E. *et al.* De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. *Cell* **170**, 142-157.e19 (2017).
227. Pauken, K. E. *et al.* Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science (New York, N.Y.)* **354**, 1160 (2016).
228. Kurtulus, S. *et al.* Checkpoint Blockade Immunotherapy Induces Dynamic Changes in PD-1–CD8⁺ Tumor-Infiltrating T Cells. *Immunity* **50**, 181-194.e6 (2019).
229. Sade-Feldman, M. *et al.* Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* **175**, 998-1013.e20 (2018).
230. Siddiqui, I. *et al.* Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8⁺ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* **50**, 195-211.e10 (2019).
231. Miller, B. C. *et al.* Subsets of exhausted CD8 + T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nature Immunology* **20**, 326–336 (2019).
232. Brummelman, J. *et al.* High-dimensional single cell analysis identifies stem-like cytotoxic CD8⁺ T cells infiltrating human tumors. *J Exp Med* **215**, 2520–2535 (2018).

233. Pagès, F. *et al.* Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* **353**, 2654–2666 (2005).
234. Galon, J. *et al.* Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* **313**, 1960–1964 (2006).
235. Pagès, F. *et al.* In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *JCO* **27**, 5944–5951 (2009).
236. Mlecnik, B. *et al.* Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* **29**, 610–618 (2011).
237. Pagès, F. *et al.* International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet* **391**, 2128–2139 (2018).
238. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
239. Jansen, C. S. *et al.* An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* **576**, 465–470 (2019).
240. Mikucki, M. E. *et al.* Non-redundant requirement for CXCR3 signalling during tumoricidal T-cell trafficking across tumour vascular checkpoints. *Nat Commun* **6**, 7458 (2015).
241. Mullins, I. M. *et al.* CXC Chemokine Receptor 3 Expression by Activated CD8⁺ T cells Is Associated with Survival in Melanoma Patients with Stage III Disease. *Cancer Res* **64**, 7697–7701 (2004).
242. Chow, M. T. *et al.* Intratumoral Activity of the CXCR3 Chemokine System Is Required for the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy. *Immunity* **50**, 1498-1512.e5 (2019).
243. Morgan, T. H. The Theory of the Gene. *THE AMERICAN NATURALIST* 32.
244. Dexter, J. S. The Analysis of a Case of Continuous Variation in *Drosophila* by a Study of Its Linkage Relations. *The American Naturalist* **48**, 712–758 (1914).

245. Kidd, S., Kelley, M. R. & Young, M. W. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3094–3108 (1986).
246. Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T. & Artavanis-Tsakonas, S. Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**, 567–581 (1985).
247. Layden, M. J. & Martindale, M. Q. Non-canonical Notch signaling represents an ancestral mechanism to regulate neural differentiation. *EvoDevo* **5**, 30 (2014).
248. Austin, J. & Kimble, J. *glp-1* Is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* **51**, 589–599 (1987).
249. Radtke, F. *et al.* Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547–558 (1999).
250. Wilson, A., MacDonald, H. R. & Radtke, F. Notch 1–Deficient Common Lymphoid Precursors Adopt a B Cell Fate in the Thymus. *J Exp Med* **194**, 1003–1012 (2001).
251. Han, H. *et al.* Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* **14**, 637–645 (2002).
252. Miyamoto, A., Lau, R., Hein, P. W., Shipley, J. M. & Weinmaster, G. Microfibrillar Proteins MAGP-1 and MAGP-2 Induce Notch1 Extracellular Domain Dissociation and Receptor Activation. *J. Biol. Chem.* **281**, 10089–10097 (2006).
253. Eiraku, M., Hirata, Y., Takeshima, H., Hirano, T. & Kengaku, M. Delta/Notch-like Epidermal Growth Factor (EGF)-related Receptor, a Novel EGF-like Repeat-containing Protein Targeted to Dendrites of Developing and Adult Central Nervous System Neurons. *J. Biol. Chem.* **277**, 25400–25407 (2002).

254. Nofziger, D. Two Notch-induced blocks in myogenesis. 14.
255. Shawber, C. *et al.* Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* **122**, 3765–3773 (1996).
256. Beres, T. M. *et al.* PTF1 Is an Organ-Specific and Notch-Independent Basic Helix-Loop-Helix Complex Containing the Mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or Its Parologue, RBP-L. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 117–130 (2006).
257. Hori, K. *et al.* A nonclassical bHLH–Rbpj transcription factor complex is required for specification of GABAergic neurons independent of Notch signaling. *Genes Dev* **22**, 166–178 (2008).
258. Rusconi, J. C. & Corbin, V. Evidence for a novel Notch pathway required for muscle precursor selection in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **79**, 39–50 (1998).
259. Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S. J. C. & MacDonald, H. R. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nature Immunology* **5**, 247–253 (2004).
260. Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P. & Artavanis-Tsakonas, S. Intracellular Cleavage of Notch Leads to a Heterodimeric Receptor on the Plasma Membrane. *Cell* **90**, 281–291 (1997).
261. Logeat, F. *et al.* The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *PNAS* **95**, 8108–8112 (1998).
262. Moloney, D. J. *et al.* Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**, 369–375 (2000).
263. Brückner, K., Perez, L., Clausen, H. & Cohen, S. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch–Delta interactions. *Nature* **406**, 411–415 (2000).
264. Shi, S. & Stanley, P. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *PNAS* **100**, 5234–5239 (2003).

265. LeBon, L., Lee, T. V., Sprinzak, D., Jafar-Nejad, H. & Elowitz, M. B. Fringe proteins modulate Notch-ligand cis and trans interactions to specify signaling states. *eLife* **3**, e02950 (2014).
266. Yang, L.-T. *et al.* Fringe Glycosyltransferases Differentially Modulate Notch1 Proteolysis Induced by Delta1 and Jagged1. *MBoC* **16**, 927–942 (2004).
267. Kakuda, S. & Haltiwanger, R. S. Deciphering the Fringe-Mediated Notch Code: Identification of Activating and Inhibiting Sites Allowing Discrimination between Ligands. *Developmental Cell* **40**, 193–201 (2017).
268. Gordon, W. R. *et al.* Mechanical Allostery: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. *Developmental Cell* **33**, 729–736 (2015).
269. De Strooper, B. *et al.* A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518–522 (1999).
270. Kitamura, T. *et al.* A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest* **117**, 2477–2485 (2007).
271. Kao, H.-Y. *et al.* A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev.* **12**, 2269–2277 (1998).
272. Zhou, S. & Hayward, S. D. Nuclear Localization of CBF1 Is Regulated by Interactions with the SMRT Corepressor Complex. *Mol Cell Biol* **21**, 6222–6232 (2001).
273. Yatim, A. *et al.* NOTCH1 Nuclear Interactome Reveals Key Regulators of Its Transcriptional Activity and Oncogenic Function. *Molecular Cell* **48**, 445–458 (2012).
274. Jeffries, S., Robbins, D. J. & Capobianco, A. J. Characterization of a High-Molecular-Weight Notch Complex in the Nucleus of Notchic-Transformed RKE Cells and in a Human T-Cell Leukemia Cell Line. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 3927–3941 (2002).

275. Wu, L. *et al.* MAML1, a human homologue of *Drosophila* Mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nature Genetics* **26**, 484–489 (2000).
276. Espinosa, L., Inglés-Esteve, J., Aguilera, C. & Bigas, A. Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 β Down-regulates Notch Activity, a Link for Notch and Wnt Pathways. *J. Biol. Chem.* **278**, 32227–32235 (2003).
277. Foltz, D. R., Santiago, M. C., Berechid, B. E. & Nye, J. S. Glycogen Synthase Kinase-3 β Modulates Notch Signaling and Stability. *Current Biology* **12**, 1006–1011 (2002).
278. Fryer, C. J., White, J. B. & Jones, K. A. Mastermind Recruits CycC:CDK8 to Phosphorylate the Notch ICD and Coordinate Activation with Turnover. *Molecular Cell* **16**, 509–520 (2004).
279. Öberg, C. *et al.* The Notch Intracellular Domain Is Ubiquitinated and Negatively Regulated by the Mammalian Sel-10 Homolog. *J. Biol. Chem.* **276**, 35847–35853 (2001).
280. Wu, G. *et al.* SEL-10 Is an Inhibitor of Notch Signaling That Targets Notch for Ubiquitin-Mediated Protein Degradation. *Mol Cell Biol* **21**, 7403–7415 (2001).
281. McGill, M. A. & McGlade, C. J. Mammalian Numb Proteins Promote Notch1 Receptor Ubiquitination and Degradation of the Notch1 Intracellular Domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 23196–23203 (2003).
282. McGill, M. A., Dho, S. E., Weinmaster, G. & McGlade, C. J. Numb Regulates Post-endocytic Trafficking and Degradation of Notch1. *J Biol Chem* **284**, 26427–26438 (2009).
283. Amsen, D. *et al.* Instruction of Distinct CD4 T Helper Cell Fates by Different Notch Ligands on Antigen-Presenting Cells. *Cell* **117**, 515–526 (2004).
284. Wilson, A., MacDonald, H. R. & Radtke, F. Notch 1-Deficient Common Lymphoid Precursors Adopt a B Cell Fate in the Thymus. *J Exp Med* **194**, 1003–1012 (2001).

285. Han, H. *et al.* Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* **14**, 637–645 (2002).
286. Koch, U. *et al.* Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J. Exp. Med.* **205**, 2515–2523 (2008).
287. Hozumi, K. *et al.* Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J. Exp. Med.* **205**, 2507–2513 (2008).
288. Yashiro-Ohtani, Y. *et al.* Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes Dev* **23**, 1665–1676 (2009).
289. Ciofani, M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Notch promotes survival of pre-T cells at the β -selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nature Immunology* **6**, 881–888 (2005).
290. Ciofani, M. *et al.* Obligatory Role for Cooperative Signaling by Pre-TCR and Notch during Thymocyte Differentiation. *The Journal of Immunology* **172**, 5230–5239 (2004).
291. Maillard, I. *et al.* The requirement for Notch signaling at the β -selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 2239–2245 (2006).
292. Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H. R. & Radtke, F. Inactivation of Notch1 Impairs VDJ β Rearrangement and Allows pre-TCR-Independent Survival of Early $\alpha\beta$ Lineage Thymocytes. *Immunity* **16**, 869–879 (2002).
293. Tanigaki, K. *et al.* Regulation of $\alpha\beta/\gamma\delta$ T Cell Lineage Commitment and Peripheral T Cell Responses by Notch/RBP-J Signaling. *Immunity* **20**, 611–622 (2004).
294. Saito, T. *et al.* Notch2 Is Preferentially Expressed in Mature B Cells and Indispensable for Marginal Zone B Lineage Development. *Immunity* **18**, 675–685 (2003).

295. Hozumi, K. *et al.* Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nature Immunology* **5**, 638–644 (2004).
296. Oyama, T. *et al.* Mastermind-1 is required for Notch signal-dependent steps in lymphocyte development in vivo. *PNAS* **104**, 9764–9769 (2007).
297. Tanigaki, K. *et al.* Notch–RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nature Immunology* **3**, 443–450 (2002).
298. Wu, L., Maillard, I., Nakamura, M., Pear, W. S. & Griffin, J. D. The transcriptional coactivator Maml1 is required for Notch2-mediated marginal zone B-cell development. *Blood* **110**, 3618–3623 (2007).
299. Amsen, D. *et al.* Instruction of Distinct CD4 T Helper Cell Fates by Different Notch Ligands on Antigen-Presenting Cells. *Cell* **117**, 515–526 (2004).
300. Adler, S. H. *et al.* Notch Signaling Augments T Cell Responsiveness by Enhancing CD25 Expression. *The Journal of Immunology* **171**, 2896–2903 (2003).
301. Tu, L. *et al.* Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 1037–1042 (2005).
302. Fang, T. C. *et al.* Notch Directly Regulates Gata3 Expression during T Helper 2 Cell Differentiation. *Immunity* **27**, 100–110 (2007).
303. Tanaka, S. *et al.* The Interleukin-4 Enhancer CNS-2 Is Regulated by Notch Signals and Controls Initial Expression in NKT Cells and Memory-Type CD4 T Cells. *Immunity* **24**, 689–701 (2006).
304. Mukherjee, S., Schaller, M. A., Neupane, R., Kunkel, S. L. & Lukacs, N. W. Regulation of T Cell Activation by Notch Ligand, DLL4, Promotes IL-17 Production and Rorc Activation. *The Journal of Immunology* **182**, 7381–7388 (2009).

305. Keerthivasan, S. *et al.* Notch Signaling Regulates Mouse and Human Th17 Differentiation. *The Journal of Immunology* **187**, 692–701 (2011).
306. Meng, L. *et al.* The Notch Ligand DLL4 Defines a Capability of Human Dendritic Cells in Regulating Th1 and Th17 Differentiation. *The Journal of Immunology* (2015)
doi:10.4049/jimmunol.1501310.
307. Bailis, W. *et al.* Notch Simultaneously Orchestrates Multiple Helper T Cell Programs Independently of Cytokine Signals. *Immunity* **39**, 148–159 (2013).
308. Maekawa, Y. *et al.* Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* **9**, 1140–1147 (2008).
309. Palaga, T., Miele, L., Golde, T. E. & Osborne, B. A. TCR-Mediated Notch Signaling Regulates Proliferation and IFN- γ Production in Peripheral T Cells. *The Journal of Immunology* **171**, 3019–3024 (2003).
310. Kuijk, L. M. *et al.* Notch controls generation and function of human effector CD8⁺ T cells. *Blood* **121**, 2638–2646 (2013).
311. Fiorini, E. *et al.* Dynamic Regulation of Notch 1 and Notch 2 Surface Expression during T Cell Development and Activation Revealed by Novel Monoclonal Antibodies. *The Journal of Immunology* **183**, 7212–7222 (2009).
312. Mathieu, M., Cotta-Grand, N., Daudelin, J.-F., Thébault, P. & Labrecque, N. Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8⁺ T-cell activation. *Immunology & Cell Biology* **91**, 82–88 (2013).
313. Cho, O. H. *et al.* Notch Regulates Cytolytic Effector Function in CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* **182**, 3380–3389 (2009).
314. Backer, R. A. *et al.* A central role for Notch in effector CD8⁺ T cell differentiation. *Nat Immunol* **15**, 1143–1151 (2014).

315. Mathieu, M., Duval, F., Daudelin, J.-F. & Labrecque, N. The Notch Signaling Pathway Controls Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Differentiation but Is Dispensable for Memory Generation. *The Journal of Immunology* **194**, 5654–5662 (2015).
316. Zhang, Y. *et al.* Notch signaling is a critical regulator of allogeneic CD4⁺ T-cell responses mediating graft-versus-host disease. *Blood* **117**, 299–308 (2011).
317. Sandy, A. R. *et al.* T Cell–Specific Notch Inhibition Blocks Graft-versus-Host Disease by Inducing a Hyporesponsive Program in Alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* **190**, 5818–5828 (2013).
318. Tran, I. T. *et al.* Blockade of individual Notch ligands and receptors controls graft-versus-host disease. *J Clin Invest* **123**, 1590–1604 (2013).
319. Sugimoto, K. *et al.* Notch2 Signaling Is Required for Potent Antitumor Immunity In Vivo. *The Journal of Immunology* **184**, 4673–4678 (2010).
320. Tchekneva, E. E. *et al.* Determinant roles of dendritic cell-expressed Notch Delta-like and Jagged ligands on anti-tumor T cell immunity. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **7**, 95 (2019).
321. Sierra, R. A. *et al.* Rescue of notch-1 signaling in antigen-specific CD8⁺ T cells overcomes tumor-induced T-cell suppression and enhances immunotherapy in cancer. *Cancer Immunol Res* **2**, 800–811 (2014).
322. Weng, A. P. *et al.* Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science* **306**, 269–271 (2004).
323. Palomero, T. *et al.* CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high sensitivity to gamma-secretase inhibitors. *Leukemia* **20**, 1279–1287 (2006).

324. Ellisen, L. W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649–661 (1991).
325. Thompson, B. J. *et al.* The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med* **204**, 1825–1835 (2007).
326. Gordon, W. R. *et al.* Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL. *Blood* **113**, 4381–4390 (2009).
327. Malecki, M. J. *et al.* Leukemia-Associated Mutations within the NOTCH1 Heterodimerization Domain Fall into at Least Two Distinct Mechanistic Classes. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 4642–4651 (2006).
328. Sarmiento, L. M. *et al.* Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27Kip1 degradation. *J Exp Med* **202**, 157–168 (2005).
329. Sanchez-Martin, M. & Ferrando, A. The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **129**, 1124–1133 (2017).
330. Vilimas, T. *et al.* Targeting the NF- κ B signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. *Nature Medicine* **13**, 70–77 (2007).
331. Shin, H. M. *et al.* Notch1 augments NF- κ B activity by facilitating its nuclear retention. *EMBO J* **25**, 129–138 (2006).
332. Wang, H. *et al.* Genome-wide analysis reveals conserved and divergent features of Notch1/RBPJ binding in human and murine T-lymphoblastic leukemia cells. *PNAS* **108**, 14908–14913 (2011).
333. Wang, H. *et al.* NOTCH1–RBPJ complexes drive target gene expression through dynamic interactions with superenhancers. *PNAS* **111**, 705–710 (2014).
334. Lay, A.-S. G. L. *et al.* The Tumor Suppressor Ikaros Shapes the Repertoire of Notch Target Genes in T Cells. *Sci. Signal.* **7**, ra28–ra28 (2014).

335. Chung, J. *et al.* Early Notch Signals Induce a Pathogenic Molecular Signature during Priming of Alloantigen-Specific Conventional CD4⁺ T Cells in Graft-versus-Host Disease. *The Journal of Immunology* **203**, 557–568 (2019).
336. Wang, D. *et al.* The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation. *Immunity* **48**, 659-674.e6 (2018).
337. Wang, Z.-Q. *et al.* CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **22**, 6290–6297 (2016).
338. Ganesan, A.-P. *et al.* Tissue-resident memory features are linked to the magnitude of cytotoxic T cell responses in human lung cancer. *Nature Immunology* **18**, 940–950 (2017).
339. Kuijk, L. M. *et al.* Notch controls generation and function of human effector CD8⁺ T cells. *Blood* **121**, 2638–2646 (2013).
340. Yang, X. *et al.* Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Developmental Biology* **269**, 81–94 (2004).
341. McCright, B., Lozier, J. & Gridley, T. Generation of new Notch2 mutant alleles. *genesis* **44**, 29–33 (2006).
342. Hedman, H., Nilsson, J., Guo, D. & Henriksson, R. Is LRIG1 a Tumour Suppressor Gene at Chromosome 3p14.3? *Acta Oncologica* **41**, 352–354 (2002).
343. Wang, Y., Poulin, E. J. & Coffey, R. J. LRIG1 is a triple threat: ERBB negative regulator, intestinal stem cell marker and tumour suppressor. *British Journal of Cancer* **108**, 1765–1770 (2013).
344. Gur, G. *et al.* LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *The EMBO Journal* **23**, 3270–3281 (2004).

345. Li, Q. *et al.* LRIG1 is a pleiotropic androgen receptor-regulated feedback tumor suppressor in prostate cancer. *Nature Communications* **10**, 5494 (2019).
346. Laederich, M. B. *et al.* The Leucine-rich Repeat Protein LRIG1 Is a Negative Regulator of ErbB Family Receptor Tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem.* **279**, 47050–47056 (2004).
347. El Amri, M., Fitzgerald, U. & Schlosser, G. MARCKS and MARCKS-like proteins in development and regeneration. *Journal of Biomedical Science* **25**, 43 (2018).
348. Stumpo, D. J., Bock, C. B., Tuttle, J. S. & Blackshear, P. J. MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death. *PNAS* **92**, 944–948 (1995).
349. Kalwa, H. & Michel, T. The MARCKS Protein Plays a Critical Role in Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Metabolism and Directed Cell Movement in Vascular Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 2320–2330 (2011).
350. Iioka, H., Ueno, N. & Kinoshita, N. Essential role of MARCKS in cortical actin dynamics during gastrulation movements. *Journal of Cell Biology* **164**, 169–174 (2004).
351. KIM, S. S., KIM, J. H., KIM, H. S., PARK, D. E. & CHUNG, C. H. Involvement of the θ -type protein kinase C in translocation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) during myogenesis of chick embryonic myoblasts. *Biochemical Journal* **347**, 139–146 (2000).
352. Wohnsland, F., Schmitz, A. A. P., Steinmetz, M. O., Aebi, U. & Vergères, G. Interaction between Actin and the Effector Peptide of MARCKS-related Protein IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL AMINO ACID SEGMENTS. *J. Biol. Chem.* **275**, 20873–20879 (2000).
353. Yarmola, E. G., Edison, A. S., Lenox, R. H. & Bubb, M. R. Actin Filament Cross-linking by MARCKS CHARACTERIZATION OF TWO ACTIN-BINDING SITES WITHIN THE PHOSPHORYLATION SITE DOMAIN. *J. Biol. Chem.* **276**, 22351–22358 (2001).

354. Hartwig, J. H. *et al.* MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium–calmodulin. *Nature* **356**, 618–622 (1992).
355. Ziemba, B. P., Burke, J. E., Masson, G., Williams, R. L. & Falke, J. J. Regulation of PI3K by PKC and MARCKS: Single-Molecule Analysis of a Reconstituted Signaling Pathway. *Biophysical Journal* **110**, 1811–1825 (2016).
356. Wang, J., Arbuzova, A., Hangyás-Mihályné, G. & McLaughlin, S. The Effector Domain of Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate Binds Strongly to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **276**, 5012–5019 (2001).
357. Gambhir, A. *et al.* Electrostatic Sequestration of PIP2 on Phospholipid Membranes by Basic/Aromatic Regions of Proteins. *Biophysical Journal* **86**, 2188–2207 (2004).
358. McLaughlin, S. & Murray, D. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* **438**, 605–611 (2005).
359. Eckert, R. E., Neuder, L. E., Park, J., Adler, K. B. & Jones, S. L. Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate (MARCKS) Protein Regulation of Human Neutrophil Migration. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, 586–594 (2010).
360. Damera, G. *et al.* Inhibition of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein inhibits ozone-induced airway neutrophilia and inflammation. *Experimental Lung Research* **36**, 75–84 (2010).
361. Lee, S.-M., Suk, K. & Lee, W.-H. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) regulates the expression of proinflammatory cytokines in macrophages through activation of p38/JNK MAPK and NF- κ B. *Cellular Immunology* **296**, 115–121 (2015).
362. Green, T. D. *et al.* Directed migration of mouse macrophages in vitro involves myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein. *Journal of Leukocyte Biology* **92**, 633–639 (2012).

363. Xu, C. *et al.* MARCKS regulates tonic and chronic active B cell receptor signaling. *Leukemia* **33**, 710–729 (2019).
364. Hsiao, H.-W. *et al.* Deltex1 Is a Target of the Transcription Factor NFAT that Promotes T Cell Anergy. *Immunity* **31**, 72–83 (2009).
365. Liu, W.-H. & Lai, M.-Z. Deltex Regulates T-Cell Activation by Targeted Degradation of Active MEKK1. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 1367–1378 (2005).
366. Iacovelli, S., Iosue, I., Cesare, S. D. & Guttinger, M. Lymphoid EVA1 Expression Is Required for DN1-DN3 Thymocytes Transition. *PLOS ONE* **4**, e7586 (2009).
367. Guttinger, M. *et al.* Epithelial V-like Antigen (EVA), a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily, Expressed in Embryonic Epithelia with a Potential Role as Homotypic Adhesion Molecule in Thymus Histogenesis. *Journal of Cell Biology* **141**, 1061–1071 (1998).
368. Tydell, C. C. *et al.* Molecular Dissection of Prethymic Progenitor Entry into the T Lymphocyte Developmental Pathway. *J Immunol* **179**, 421–438 (2007).
369. Shibuya, A. *et al.* DNAM-1, A Novel Adhesion Molecule Involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes. *Immunity* **4**, 573–581 (1996).
370. Shibuya, K. *et al.* Physical and Functional Association of LFA-1 with DNAM-1 Adhesion Molecule. *Immunity* **11**, 615–623 (1999).
371. Gilfillan, S. *et al.* DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 2965–2973 (2008).
372. Shibuya, K. *et al.* CD226 (DNAM-1) Is Involved in Lymphocyte Function–associated Antigen 1 Costimulatory Signal for Naive T Cell Differentiation and Proliferation. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 1829–1839 (2003).

373. Zhang, Z. *et al.* DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. *J Exp Med* **212**, 2165–2182 (2015).
374. Tahara-Hanaoka, S. *et al.* Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood* **107**, 1491–1496 (2006).
375. Iguchi-Manaka, A. *et al.* Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 2959–2964 (2008).
376. Tahara-Hanaoka, S. *et al.* Identification and characterization of murine DNAM-1 (CD226) and its poliovirus receptor family ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 996–1000 (2005).
377. Johnston, R. J. *et al.* The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8⁺ T Cell Effector Function. *Cancer Cell* **26**, 923–937 (2014).
378. Chan, C. J. *et al.* The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nature Immunology* **15**, 431–438 (2014).
379. Li, X.-Y. *et al.* CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. *J Clin Invest* **128**, 2613–2625 (2018).
380. Bottino, C. *et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 557–567 (2003).
381. Kamran, N. *et al.* Toll-Like Receptor Ligands Induce Expression of the Costimulatory Molecule CD155 on Antigen-Presenting Cells. *PLOS ONE* **8**, e54406 (2013).
382. Braun, M. *et al.* CD155 on Tumor Cells Drives Resistance to Immunotherapy by Inducing the Degradation of the Activating Receptor CD226 in CD8⁺ T Cells. *Immunity* **53**, 805-823.e15 (2020).

383. Weulersse, M. *et al.* Eomes-Dependent Loss of the Co-activating Receptor CD226 Restrains CD8⁺ T Cell Anti-tumor Functions and Limits the Efficacy of Cancer Immunotherapy. *Immunity* **53**, 824-839.e10 (2020).
384. Chen, R. *et al.* In vivo RNA interference screens identify regulators of antiviral CD4⁺ and CD8⁺ T cell differentiation. *Immunity* **41**, 325–338 (2014).
385. Sims, D., Sudbery, I., Illott, N. E., Heger, A. & Ponting, C. P. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet* **15**, 121–132 (2014).
386. Sugimoto, K. *et al.* Notch2 signaling is required for potent antitumor immunity in vivo. *J Immunol* **184**, 4673–4678 (2010).
387. Carlessi, R., Köhn-Gaone, J., Olynyk, J. K. & Tirnitz-Parker, J. E. E. Mouse Models of Hepatocellular Carcinoma. in *Hepatocellular Carcinoma* (ed. Tirnitz-Parker, J. E. E.) (Codon Publications, 2019).
388. Verna, L., Whysner, J. & Williams, G. M. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology & Therapeutics* **71**, 57–81 (1996).
389. Knight, B., Tirnitz-Parker, J. E. E. & Olynyk, J. K. C-kit Inhibition by Imatinib Mesylate Attenuates Progenitor Cell Expansion and Inhibits Liver Tumor Formation in Mice. *Gastroenterology* **135**, 969-979.e1 (2008).
390. Sugase, T. *et al.* Development and optimization of orthotopic liver metastasis xenograft mouse models in uveal melanoma. *Journal of Translational Medicine* **18**, 208 (2020).
391. Goddard, E. T., Fischer, J. & Schedin, P. A Portal Vein Injection Model to Study Liver Metastasis of Breast Cancer. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e54903 (2016) doi:10.3791/54903.