

Université de Montréal

**Rôle de la protéine adaptatrice hématopoïétique SLP-76 dans la
biologie et le métabolisme des cellules T**

Par

Auryane Cabald

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences Biomédicales, option médecine expérimentale

Mai, 2023

© Auryane Cabald, 2023

Ce mémoire intitulé :

**Rôle de la protéine adaptatrice hématopoïétique SLP-76 dans la biologie et le
métabolisme des cellules T**

Présenté par :

Auryane Cabald

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Mouhamed Walid Mourad

Président-rapporteur

Dr Christopher.E Rudd

Directeur de recherche

Dr Anne Astier

Membre du jury

Résumé

Le système immunitaire est divisé en deux réponses : innée et adaptative. Dans la réponse adaptative, les principaux acteurs sont les cellules T CD8 et CD4, dont l'activation est médiée par le complexe antigène-récepteur (TCR) et la génération de signaux intracellulaires. L'intensité du signal est contrôlée par l'affinité du ligand impliquant la kinase p56^{lck} et la protéine adaptatrice SLP-76. Les souris dépourvues de SLP-76 sont bloquées dans leur développement thymique, ce qui rend difficile l'évaluation de l'importance de l'adaptateur, dans la fonction des cellules T périphériques. Récemment, le laboratoire Rudd a généré une souris *knock-in* (KI) avec une forme de SLP-76 mutée au niveau d'un seul résidu, K56, ayant des cellules T périphériques normales. Cette mutation empêche SLP-76 de se lier au complexe de pore nucléaire (CPN). L'objectif de ce mémoire est de comprendre le rôle de SLP-76, plus particulièrement du mutant K56E dans le contrôle de certains aspects de la fonction des cellules T périphériques. K56E sur un fond transgénique OT1, a montré une déficience partielle de la fonction et du métabolisme des cellules T en réponse à des ligands peptidiques d'ovalbumine de poulet, de différentes affinités. Plus précisément, les voies de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative en ont été altérées. Dans l'ensemble, l'altération des fonctions et du métabolisme des lymphocytes T chez le mutant K56E confirme l'existence d'un lien entre le SLP-76 et le métabolisme des lymphocytes T, ce qui pourrait avoir des implications importantes dans le développement de thérapies ciblant la fonction des lymphocytes T.

Mots clés : Immunologie, immunothérapie, signalisation cellulaire, cytométrie de flux, in vitro, peptides OVA, complexe de pore nucléaire.

Abstract

The immune system is divided into two responses: innate and adaptive. In the adaptive response, the main players are CD8 and CD4 T-cells whose activation is mediated by ligation of the antigen-receptor complex (TCR) and its generation of intracellular signals. The strength of signal is controlled by the affinity of the ligand in a process that involves upstream kinases such as p56lck and downstream targets such as the adaptor protein SLP-76. Mice lacking SLP-76 are blocked in thymic development, making it difficult to assess the importance of the adaptor in peripheral T-cell function. Recently, the Rudd lab generated a knock-in (KI) mouse with a form of SLP-76 mutated at a single residue K56 which shows a normal peripheral T-cell compartment. The mutant prevents SLP-76 binding to the nuclear pore complex (NPC). The object of this dissertation is to understand role of SLP-76 and specifically the K56E mutant in the control of aspects of peripheral T-cell function. The K56E mutant on an OT1 TCR transgenic background showed a partial impairment of T-cell function and metabolism in response to chicken ovalbumin peptide ligands of different affinities. Specifically, both glycolysis and oxidative phosphorylation pathways were impaired in response to peptide ligand activation. Overall, the impairment of T-cell function and metabolism in the K56E mutant supports a link between SLP-76 and T-cell metabolism which may have important implications in the development of therapies targeting T-cell function.

Keywords : Immunology, immunotherapy, cell signaling, flow cytometry, in vitro, OVA peptides, nuclear pore complex

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures	15
Liste des sigles et abréviations	17
Remerciements.....	21
Chapitre 1 - Introduction	23
1.1 Introduction à l'immunologie	23
1.1.1 L'immunité innée.....	23
1.1.2 L'immunité adaptative.....	24
Les cellules T	25
Les cellules B	25
1.2. Signalisation du TCR dans les lymphocytes T.....	26
1.3. La mutation K56E de la protéine SLP-76 dans les lymphocytes T.....	28
1.3.1 Structure de SLP-76	28
1.3.2 SLP-76 et facteurs de transcriptions.....	29
1.3.3 SLP-76 et le complexe de pore nucléaire	29
1.3.4 SLP-76 et le thymus	31
1.4. Récepteurs transgéniques et les peptides de l'Ovalbumine.....	31
1.5. Les lymphocytes T CD8 ⁺ effecteurs	32

1.5.1 Marqueurs d'activations.....	32
1.5.2 Métabolisme.....	32
1.6. Hypothèse et objectifs	34
Chapitre 2 - Matériels et méthodes.....	35
2.1. Souris.....	35
2.2. Milieu de culture	35
2.3. Activation <i>in vitro</i> avec les peptides OVA ₂₅₇₋₂₆₄ , OVA-Q4 et OVA-T4.....	36
2.4. Essai cytotoxique <i>in vitro</i>	37
2.5. <i>Seahorse</i> avec les souris de type sauvage WT et les souris mutantes K56E.....	37
2.6. <i>Seahorse</i> avec les souris transgéniques de type sauvage OT1 et les souris mutantes KOT1.....	38
2.7. Analyses statistiques	39
2.8. Cytométrie de flux.....	39
Chapitre 3 - Résultats.....	41
3.1 K56E n'affecte pas le pourcentage de cellules viables mais diminue la prolifération cellulaire	41
3.2 K56E affecte l'induction de la cytokine effectrice IFN γ , induit par des peptides ...	47
3.3 L'affinité des peptides affecte l'expression de PD1	47
3.4 K56E réduit l'expression des récepteurs CTLA-4 et CD25 induit par peptides	48
3.5 K56E affecte les fonctions cytotoxiques des cellules T induite par peptides	53
3.6 K56E affecte le métabolisme induit par anti-CD3/CD28 et par peptides	56
3.7 La force du signal du TCR affecte le métabolisme	59
Chapitre 4 - Discussion.....	63
Chapitre 5 – Conclusion	75

Chapitre 6 – Perspectives	77
Références bibliographiques	79
Annexes.....	85

Liste des tableaux

Tableau 1. - Composition des différents milieux utilisés.....	36
Tableau 2. - Anticorps utilisés pour les analyses par FACS.....	39

Liste des figures

Figure 1. - Complexes de signalisations proximaux et les réponses initiées en aval par les complexes CD4/CD8-p56 ^{lck} (Adapté de Rudd, 2022).....	27
Figure 2. - Structure de la protéine SLP-76 et ces protéines partenaires.	29
Figure 3. - Structure du complexe de pore nucléaire avec les filaments cytoplasmiques.....	30
Figure 4. - Degré d'affinité des différents peptides d'OVA.....	32
Figure 5. - Divers composants de la glycolyse dans les cellules T.	33
Figure 6. - Titrage de la viabilité des splénocytes de souris WT et de souris K56E après une stimulation de peptides d'OVA.	42
Figure 7. - Impact de l'affinité des peptides d'OVA sur la prolifération cellulaire.....	45
Figure 8. - Impact de l'affinité des peptides d'OVA sur la prolifération cellulaire telle que montré par le diagramme à point (<i>dot plot</i>)	46
Figure 11. - L'affinité des différents peptides d'OVA peut contrôler l'expression de PD1 à la surface des cellules T des souris OT1 (sauvages) et chez les KOT1 (mutantes).	48
Figure 12. - La mutation K56E peut contrôler l'expression de CTLA-4 et CD25.....	49
Figure 11. - L'affinité des différents peptides d'OVA peut contrôler la production d'IFN γ dans les splénocytes des souris OT1 (sauvages) et KOT1 (mutantes) âgées de 20 à 30 semaines.....	52
Figure 12. - L'affinité des différents peptides d'OVA peut contrôler la production d'IFN γ dans les splénocytes des souris OT1 (sauvages) et KOT1 (mutantes) âgées de 7 à 10 semaines.....	53
Figure 13. - Le degré de force d'activation des cellules T chez les souris OT1 et KOT1 impacte la cytotoxicité des cellules T à différents ratios	55
Figure 14. - Le peptide à faible affinité semble renverser l'impact de la mutation K56E.....	56
Figure 15. - Le métabolisme des cellules T est diminué par la mutation K56E de la protéine SLP-76.....	58
Figure 16. - Le métabolisme des cellules T transgénique est diminué par la mutation K563 de la protéine SLP-76	61

Liste des sigles et abréviations

2-DG : 2 D-glucose

ADAP: Adhesion And Degranulation Promoting Adapter Protein

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

BCR: B Cell Receptor

BFA : Brefeldin A

Ca²⁺ : Calcium

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA: Cellules Présentatrices D'antigène

Ctrl : Contrôle

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

FACS : Fluorescence-activated cell sorting

FBS : *Fætal Bovine Serum*

GADS: Grb2-Related Adaptor Downstream Of Shc

GLUT: Glucose Transporter

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HIF1 α : Hypoxia-Inducible Factor Alpha

HPK1: Hematopoietic Progenitor Kinase 1

IFN γ : Interferon gamma

Ig: Immunoglobulines

IP: Indice de prolifération

ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif

Itk: Interleukin-2-Inducible T-Cell Kinase

K56E: souris mutantes

LT CD3+ : Lymphocytes T CD3+

LT CD8+ : Lymphocytes T CD8+

MAP: Microtubule-Associated Proteins

Nck: Non-Catalytic Region Of Tyrosine Kinase Adaptor Protein 1

NFAT: Nuclear Factor Of Activated T Cell

NK: Natural Killer

NPC: Nuclear Pore Complex

Nups: Nucléoporines

PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBS : *phosphate buffered saline*

PFA : Paraformaldehyde

PLC γ : Phospholipase C, gamma 1

Rot/AA : la roténone/Antimycin A

SI : Synapse Immunologique

SUMO-1: Small Ubiquitin-related Modifier 1

TCR: T Cell Receptor

TP : Température pièce

Vav: Family of proteins involved in cell signalling

WT: Wild Type

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Dr Christopher.E Rudd, de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir soutenu financièrement. J'ai pu faire mes études avec un stress en moins concernant les finances. Merci d'avoir toujours été diplomate, compréhensible et d'une grande gentillesse et prévenance. Cela a été une première expérience de recherche enrichissante où j'ai beaucoup appris. Maintenant, j'ai une idée plus claire de la recherche, ce qui me permet d'affiner mes centres d'intérêt. J'ai pu élargir mon champ de technique et grandir dans l'analyse de données, la communication et l'écriture scientifique.

Je tiens à remercier mes collègues, Andres Oroya, Linda Castoun-Puckett et Hien Tu Thai qui m'ont énormément aidé tout au long de ma maîtrise. Andres, qui est devenu un ami, a été un soutien dans les périodes stressantes et difficiles. Il a été là pour me faire rire avec ces traductions rigolotes du français ! Gérer les cours avec plusieurs projets n'était pas évident, mais il a été de bons conseils pour m'aider à organiser mon temps et à gérer mes émotions. J'ai beaucoup appris d'eux et je les remercie de leur patience à mon égard.

Je veux remercier aussi ma mère et mes amis qui ont été un soutien infaillible pour moi. Ils ont toujours été là pour me donner le courage de continuer même quand je pensais que je n'y arriverais pas. Ils ont su m'écouter, me conseiller et m'encourager tout au long de mon parcours universitaire. Si je réussis aujourd'hui, c'est en partie grâce à eux.

Pour finir, le dernier, mais non le moindre, je tiens à remercier Dieu, car étant chrétienne, je crois qu'Il est ma force et mon soutien dans les moments difficiles et que c'est par Sa grâce que j'ai pu finir ma maîtrise et être diplômée.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Introduction à l'immunologie

L'immunologie est une science complexe consistant en l'étude des mécanismes de protection du corps humain contre les pathogènes et les maladies causées par ces derniers. Notre organisme est constamment exposé à des microorganismes. Pour se protéger et se défendre, il use de divers barrières et systèmes. En effet, les barrières anatomiques telles que la peau ou les muqueuses, ou encore les barrières physiologiques telles que le pH faible ou la température sont les premiers remparts naturels de protection. Le deuxième rempart est le système immunitaire. Il peut être divisé en deux catégories : la réponse immunitaire innée, aussi appelée réponse immunitaire naturelle, et la réponse immunitaire adaptative, aussi appelée réponse immunitaire acquise.

1.1.1 L'immunité innée

Le système immunitaire inné est dit inné, puisque les mécanismes de défense, qui le constituent, trouvent leurs origines dans le génome de l'hôte[1]. Il est constitué de défenses non spécifiques, catégorisées en quatre types de barrières : anatomique (peau et muqueuses), physiologique (pH, température et médiateurs chimiques), endocytaires/phagocytaire, et inflammatoire[2].

Les mécanismes de l'immunité innée ont été largement étudiés. Une de ses caractéristiques principales est l'inflammation et la vitesse de recrutement de diverses cellules immunitaires innées, au lieu de l'infection[2]. En effet, puisque cette réponse est indépendante de l'antigène, elle prendra effet dans les heures ou les minutes qui suivent la reconnaissance de ce dernier et sera donc très rapide. Cette indépendance est due au fait que la réponse innée ne possède pas de cellules mémoires lui permettant de

reconnaître différents antigènes[3]. L'ensemble des cellules immunitaires innées est composé de : macrophages, granulocytes, mastocytes, monocytes, et de cellules NK[2]. Elles sont capables de discerner le soi du non-soi[4]. Au moyen de leur récepteur PRR (*Patterns Recognition Receptor*)[2], dont il existe plusieurs catégories, elles peuvent détecter une large gamme de pathogènes. Ces récepteurs sont sensibles à différentes molécules communes trouvées à la surface de nombreux pathogènes : les PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*). Une fois ces cellules activées, par leur PRR, une cascade de mécanismes se met en place afin de neutraliser rapidement l'agent pathogène. Ainsi, des mécanismes tels que la phagocytose, la dégranulation des cellules permettant la dégranulation de cytokines, ou encore l'activation du complément jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire innée.

Finalement, au milieu de cette réponse, des cellules présentatrices d'antigène (CPA), telles que les cellules dendritiques, agissent comme des intermédiaires entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les CPA, agents de l'immunité innée, sont capables, une fois stimulées, d'activer à leur tour des lymphocytes T et B, acteurs de l'immunité adaptative.

1.1.2 L'immunité adaptative

L'immunité adaptative seconde l'immunité innée. Tandis que l'immunité innée repose sur la reconnaissance d'antigènes non spécifiques, l'immunité adaptative repose sur la reconnaissance spécifique du « non-soi ». Cette dernière est dépendante d'antigènes précis et peut prendre des jours, voir des semaines pour développer une réponse maximale, après la première rencontre avec un antigène. Grâce à sa capacité de générer des cellules mémoires, lors de la seconde exposition au même antigène, la réponse adaptative sera plus rapide et efficace[3]. Les principaux intervenants de cette dernière sont les lymphocytes B, T et les NK[4]. Le terme « adaptative » est utilisé ici, car les cellules immunitaires sont capables de s'adapter et se spécialiser à un pathogène spécifique. Elles

peuvent également développer une mémoire à long terme[4]. La génération d'une réponse plus rapide, spécifique et persistante lors de la deuxième rencontre avec le pathogène spécifique, en fait une réponse plus efficace[1].

Les cellules T

Comme cité précédemment, les lymphocytes T sont activés par les CPA. À la surface de ces dernières, est exprimée une protéine appelée CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Il en existe deux types : les molécules de CMH de classe 1 (présentant des peptides endogènes) et les molécules de CMH de classe 2 (présentant des peptides exogènes). Le CMH 1 est reconnu par le récepteur T CD8⁺ et le CMH 2 par le récepteur T CD4⁺. En effet, lors de leur développement thymique, les cellules T se différencient en LT CD4⁺ (cellules auxiliaires) ou en CD8⁺ (cellules cytotoxiques) sécrétant des cytokines et contrôlant majoritairement la réponse immunitaire[5]. Suite à leur activation en périphérie avec divers antigènes, chaque lymphocyte T exprime à sa surface un TCR (*T Cell Receptor*) spécifique à un peptide étranger, rencontré au cours de la vie. Ils sont activés lorsqu'il y a formation du complexe CMH-antigène-TCR[2]. Ainsi, le rôle des LT CD8⁺ est de lyser des cellules infectées ou cancéreuses tandis que le rôle des LT CD4⁺ repose sur la maximisation ou la suppression de la réponse immunitaire[2].

Les cellules B

Un autre type cellulaire est impliqué dans l'immunité adaptative, les lymphocytes B. De même que les lymphocytes T, elles sont activées par les CPA au moyen de leur BCR (*B Cell Receptor*), qui sont des immunoglobulines (Ig). En revanche, alors que les cellules T se différencient en cellules cytotoxiques ou auxiliaires, les cellules B se différencient en plasmocytes (machine de production d'anticorps) ou en cellules B mémoires[2]. Une fois activées, elles développent, par mutations somatiques, des récepteurs spécifiques à

l'antigène présenté par la CPA. Liées à cet antigène à la surface du pathogène, elles sécrèteront une grande quantité d'anticorps. En conséquence, les anticorps sécrétés se lient aux pathogènes et promeuvent sa destruction[2]. En effet, le pathogène entouré d'anticorps sera plus visible par les cellules phagocytaires, ce qui favorisera son élimination par phagocytose. Ce complexe anticorps pathogène peut aussi être éliminé par le mécanisme du complément[2].

Finalement deux branches de l'immunité adaptative se distinguent. L'immunité à médiation cellulaire, principalement contrôlée par les lymphocytes T, éliminant les pathogènes endogènes et l'immunité humorale, contrôlée par les lymphocytes B par le biais des anticorps, éliminant les pathogènes exogènes.

1.2. Signalisation du TCR dans les lymphocytes T

L'activation des lymphocytes T commence par la formation de la synapse immunologique (SI) dont le maintien se fait par des molécules d'adhésions[6]. Elle nécessite trois signaux en ordre : (1) la reconnaissance de l'antigène par le TCR, (2) la co-stimulation par les co-récepteurs et (3) le signal donné par les cytokines[7]. Le mécanisme de signalisation peut être divisé en plusieurs étapes. La présentation de l'antigène par la CPA, la reconnaissance de l'antigène par les cellules T et la transduction du signal. La mobilisation de calcium est partie intégrante du processus d'activation[8]. Ici, notre attention se portera sur la transduction du signal et plus particulièrement sur la signalisation du TCR (**Figure 1**).

Les molécules CD4 et CD8 remplissent le rôle de co-récepteur et aide le TCR à choisir entre les molécules de CMH de classe 1 ou les CMH de classe 2. Ces co-récepteurs contiennent une partie cytoplasmique appelée Lck[9, 10]. L'activation de ces co-récepteurs va conduire le complexe CD4/CD8-p56^{lck} à phosphoryler les ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) contenus dans la queue cytosolique du co-récepteur CD3[9, 11]. Par la suite, la protéine ZAP-70 recrutée et phosphorylée, provoquera une cascade de phosphorylations[12]. ZAP-70 va phosphoryler des protéines adaptatrices telles que LAT

(Linker for activation of T cell), ADAP (Adhesion and Degranulation promoting Adapter Protein), SKAP-1 (Src Kinase–Associated Phosphoprotein) et SLP-76 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa). Ces protéines adaptatrices forment un échafaudage permettant de guider le signal vers différentes voies de signalisation du lymphocyte T[13]. Parmi celles-ci, il y a la voie Ca^{2+} -calcineurine-NFAT, la voie PKC-IKK-NFκB et la voie Ras-Raf-MEK-ERK-AP-1 induisant l'activation et la prolifération cellulaire[9].

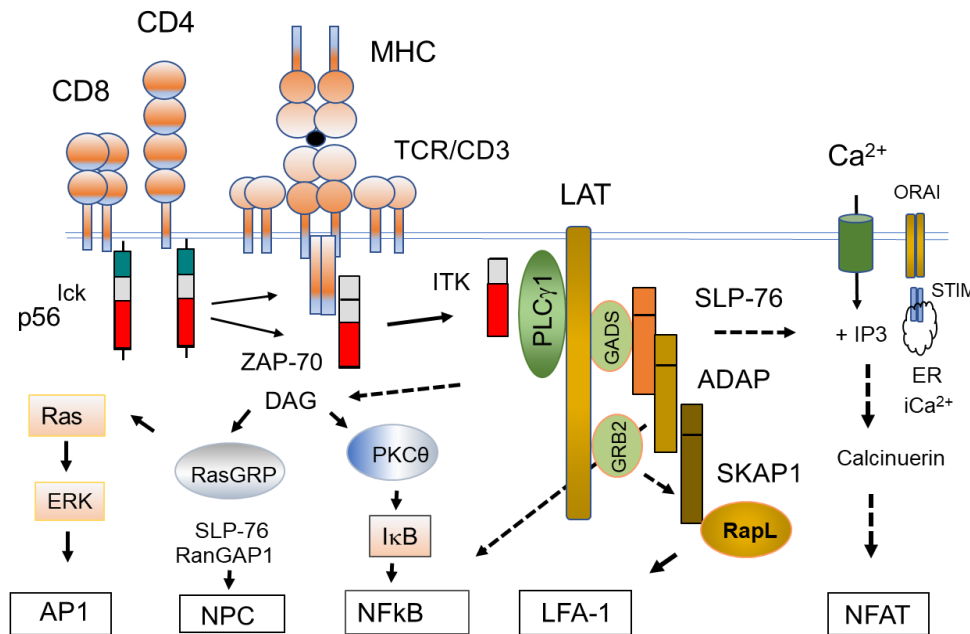


Figure 1. - Complexes de signalisations proximaux et les réponses initiées en aval par les complexes CD4/CD8-p56^{lck} (Adapté de Rudd, 2022). *Modèle décrivant l'initiation de la signalisation du TCR par le complexe CD4/CD8-p56^{lck} de la cascade. La phosphorylation par CD4/CD8-p56^{lck} des ITAM du TCR entraîne le recrutement et l'activation de ZAP-70. Sa phosphorylation entraîne la formation du signalosome LAT. pLAT recrute plusieurs protéines, dont la phospholipase Cγ-1 (PLCγ1), la protéine 2 liée au récepteur du facteur de croissance (GRB2) et la protéine adaptatrice liée à GRB2 (GADS). La protéine inducible kinase Interleukin-2 (ITK) et la kinase des lymphocytes au repos (RLK) phosphorylés activent la PLCγ1, ce qui entraîne l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en inositol 3,4,5-triphosphate (IP3), et en diacylglycérol (DAG). Par la suite, SLP-76 phosphorylé s'associe également aux adaptateurs des cellules immunitaires ADAP et SKAP1. SKAP1 contrôle la formation du complexe Rap1-RapL nécessaire à l'activation de LFA-1. Finalement, SLP-76 interagit également avec RanGAP1 dans le complexe nucléaire pour augmenter le transport nucléaire des facteurs de transcription NFAT et NFκB dans le noyau.*

1.3. La mutation K56E de la protéine SLP-76 dans les lymphocytes T

1.3.1 Structure de SLP-76

Comme cité précédemment, la protéine SLP-76 est une protéine adaptatrice faisant partie de la signalisation des lymphocytes T. Étant un élément principal de l'échafaudage, la stabilité de ce support de signalisation est primordiale au succès de la réponse immunitaire[14].

Elle est composée de plusieurs domaines (**Figure 2**) : un domaine central riche en proline, un domaine SAM N-terminal et d'un domaine SH2 C-terminal[15]. Le domaine SAM a de nombreuses fonctionnalités, il est donc difficile de lui en attribuer une en particulier. Parmi celles-ci, la formation de complexe cellulaire protéique, qui lui vaut un rôle important dans l'architecture cellulaire[16, 17]. Quant au domaine SH2, l'une de ses fonctions principales est la reconnaissance et la liaison de résidus tyrosines phosphorylés situés sur d'autres protéines, conduisant à leur activation[18].

SLP-76 possède également trois tyrosines phosphorylables pouvant interagir avec les domaines SH2 des protéines Vav1 (famille de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire) Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1*) et Itk (*interleukin-2-inducible T-cell kinase*) [12]. Le domaine riche en proline est capable de lier les protéines GADS (*Grb2-related adaptor downstream of Shc*) et PLC γ (*Phospholipase C gamma 1*) [12]. Finalement, le domaine C-terminal favorise la liaison des protéines ADAP (*adhesion and degranulation promoting adapter protein*) et HPK1 (*Hematopoietic progenitor kinase 1*) à la protéine SLP-76[12]. Après l'activation du TCR et la cascade de phosphorylation dont fait partie et est maintenu par SLP-76, s'en suit le mécanisme de mobilisation de calcium, l'activation de la voie mitogénique MAP *kinase* et une activation complète de la cellule T[19].

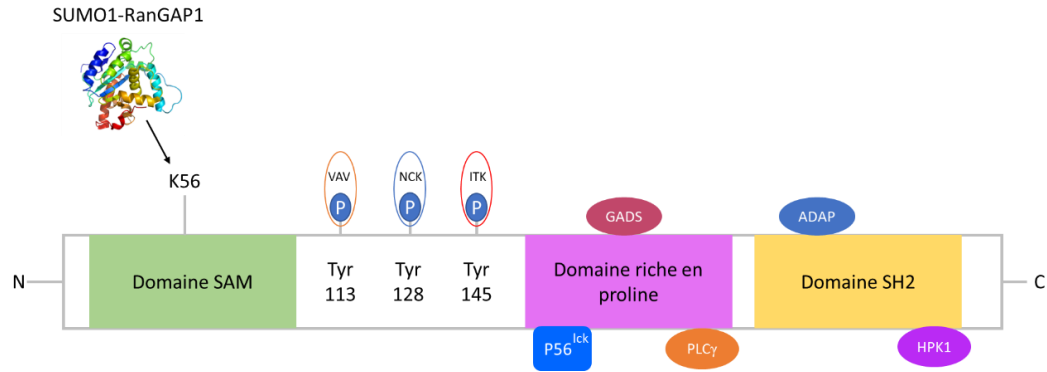


Figure 2. - Structure de la protéine SLP-76 et ces protéines partenaires. *Figure montrant de domaine SAM se liant à SUMO1-RanGAP1 à la lysine 56, suivi de trois tyrosine clés, d'un domaine riche en proline et d'un domaine SH2 permettant l'arrimage de plusieurs protéines.*

1.3.2 SLP-76 et facteurs de transcriptions

Toutefois, SLP-76 possède un autre rôle tout aussi important dans la cellule T. En effet, déjà impliquée dans la réorganisation du cytosquelette (des cellules T en se liant à SKAP et ADAP pour l'adhésion à l'intégrine) et la mobilisation de calcium, elle joue aussi un rôle au niveau de l'activation et la translocation des facteurs de transcription tels que NFAT et NFκB[4, 20, 21]. Ultimement, elle induit donc la prolifération, la différenciation et les fonctions effectrices des cellules T[14]. Le rôle du NFAT est d'induire des cytokines effectrices ainsi que des marqueurs d'activations[22]. De l'autre côté, le rôle de NFκB est d'activer des gènes codant pour des chimiokines, des cytokines et des molécules d'adhésions ayant part importante dans la réponse immunitaire adaptative[23].

1.3.3 SLP-76 et le complexe de pore nucléaire

Pour activer les gènes, les facteurs de transcription ont besoin d'être transloqués du cytoplasme au noyau. Ainsi, ce transport est médié par le complexe de pores nucléaires, appelé CPN[24]. Le CPN est un canal composé d'une trentaine de nucléoporines (Nups),

dont seuls les filaments composés de RanBP2 et RanGAP1 (ayant une activité GTPase) s'étendent dans le cytoplasme. De plus, RanGAP1 subit une modification post-traditionnelle. Elle est donc sumoylée par la protéine SUMO-1, avec laquelle elle est conjuguée.

Les protéines importées par les importines dans le noyau sont relâchées lorsque le GTP est lié à la protéine Ran. Cela a aussi pour effet d'accumuler le Ran-GTP au niveau des filaments du CPN[24]. C'est ici que le rôle de SLP-76 prend tout son sens. En effet, SUMO-RanGAP1 se lie à SLP-76 au niveau de la lysine 56, dans le domaine SAM N-terminal. Cette interaction stratégique est nécessaire à la régulation de l'entrée des facteurs de transcription dans le noyau[24].

La protéine mutante K56E SLP-76 se trouve n'avoir aucun effet sur la signalisation proximale du TCR. En revanche, elle semble inhiber la translocation des facteurs de transcription NFAT et NFκB dans le noyau[24], ainsi que le métabolisme et la production de cytokines effectrices[25].

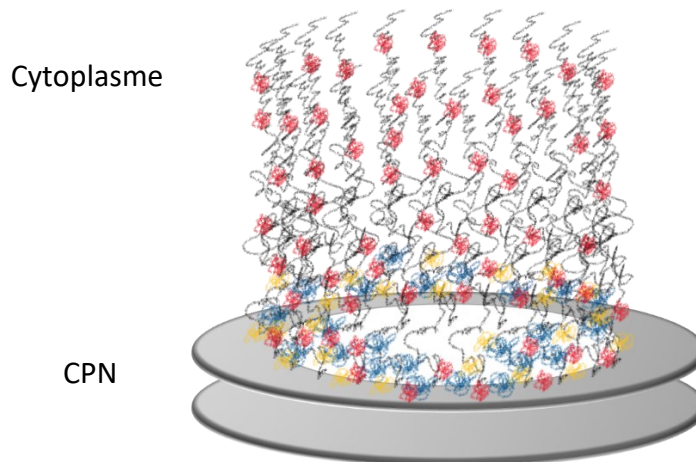


Figure 3. - Structure du complexe de pore nucléaire avec les filaments cytoplasmiques. Corps du complexe de pores nucléaires (cercle gris). Protéine RanGAP (rouge). Nucléoporines (bleu et jaune). (Adapté de Hoelz, 2022)

1.3.4 SLP-76 et le thymus

La signalisation du TCR est un mécanisme nécessaire à la prolifération et à la maturation des lymphocytes T dans le thymus [26]. De ce fait, en plus de son rôle dans la mobilisation du calcium, SLP-76 joue aussi un rôle dans le développement des thymocytes[8, 9, 15, 27]. Plus précisément dans l'exclusion allélique au locus du TCR β [26]. SLP-76 et LAT sont toutes deux essentielles pour l'expansion et à la différenciation des thymocytes[10]. Au niveau du thymus, durant le processus de maturation, les lymphocytes T sont en contact avec divers antigènes provenant des organes périphériques de l'hôte[28]. La délétion de SLP-76 bloque profondément le développement des thymocytes du stade double négatif (CD4⁻CD8⁻) au stade double positif [27-29]. De plus, cette délétion produit un manque de thymocyte double positif[27], une réduction du thymus, une diminution de l'activation de PLC γ 1, de la prolifération, de cellules T périphériques et de la sécrétion de Ca²⁺ [28]. Ce blocage n'a pas pu être surmonté par un traitement *in vivo* avec des anti-CD3. D'autres études ont montré qu'il y avait une expression anormale de TCR et de CD3 à la surface des lymphocytes T. Pour toutes ces raisons, la présence de SLP-76 est plus qu'importante, car sa délétion au niveau du thymus provoque une lymphopénie périphérique[30].

1.4. Récepteurs transgéniques et les peptides de l'Ovalbumine

L'ovalbumine est une protéine retrouvée essentiellement dans le blanc d'œuf. Elle est utilisée comme allergène dans les modèles animaliers[31]. Plusieurs études ont démontré que les peptides de l'ovalbumine présentés par la CPA via leur CMH pouvaient induire une réponse immunologique. En outre, les peptides de l'ovalbumine sont capables d'induire la prolifération des splénocytes *in vitro*[31].

Dans ce mémoire, des souris OT-1 et des souris KOT-1 ont été utilisées pour les expériences. Les souris KOT-1 ont été obtenues dans notre laboratoire par croisement de souris homozygotes OT-1 et de souris homozygotes SLP-76 K56E.

Le TCR des souris OT-1 est un récepteur transgénique, capable de reconnaître le peptide ovalbumine de poulet OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL)[32]. Quant aux TCR des souris KOT-1, ils ont non seulement le récepteur transgénique, mais aussi la mutation K56E dans la protéine SLP-76. Plusieurs peptides de l'ovalbumine, possédant des affinités différentes pour le TCR ont été caractérisés. En outre, l'affinité dépend de la séquence peptidique primaire de la protéine. Ici, deux peptides ont été utilisés en plus du peptide original OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) : OVA-Q4 et OVA-T4[33].



Figure 4.- Degré d'affinité des différents peptides d'OVA.

1.5. Les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs

1.5.1 Marqueurs d'activations

Une fois activés, les lymphocytes T subissent des changements phénotypiques. En effet, les cellules T effectrices expriment à leur surface des molécules telles que CD25, CD69 et CD71[8, 34]. De plus, ces cellules expriment des cytokines effectrices telles que perforine, granzyme B, TNF α et IFN γ [8, 35].

1.5.2 Métabolisme

La coordination entre la phosphorylation oxydative et la glycolyse est importante pour le bon fonctionnement du métabolisme de la cellule T. L'activation de la cellule T va engendrer un basculement de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse, qui

permettrait à la cellule de fonctionner normalement sous des conditions hypoxiques. Cependant, la glycolyse ne produit qu'un trop faible rendement d'ATP pour chaque molécule de glucose. À contrario, la phosphorylation oxydative produit un plus grand rendement d'ATP. Pour pallier cette défaillance, la cellule T activée surexprime le récepteur GLUT1[36]. L'augmentation de GLUT1 à la surface des cellules entraîne une augmentation de l'absorption de glucose et donc une augmentation d'ATP au moyen de la glycolyse. Ainsi, GLUT1 sera utilisé afin de satisfaire la consommation énergétique de la cellule. Il est à mentionner que NFAT joue un rôle important lors de l'activation des cellules T, puisqu'il augmente l'expression du facteur HIF1 α , qui promeut la glycolyse[37].

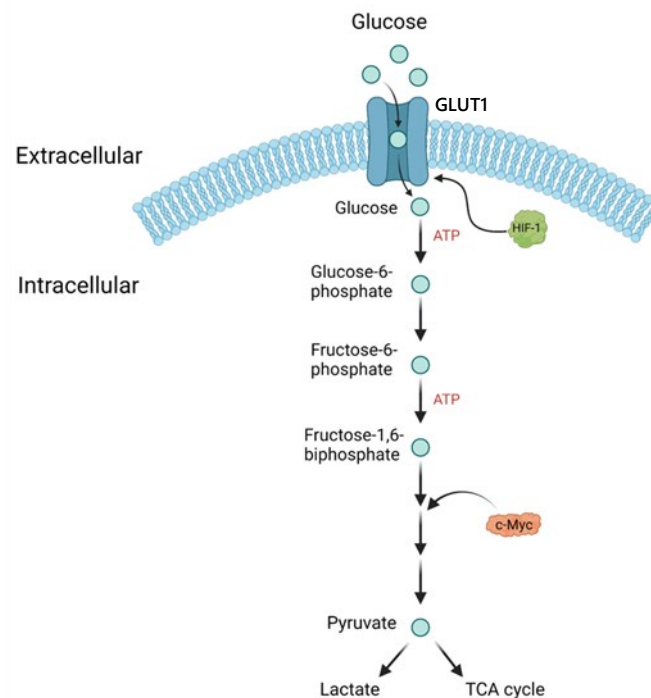


Figure 5. - Divers composants de la glycolyse dans les cellules T. Après l'entrée du glucose, ce dernier se transforme en divers composants afin de donner comme produit final le pyruvate. Ce produit final peut soit se transformer en lactate ou être utilisé dans le cycle de Krebs.

1.6. Hypothèse et objectifs

La protéine SLP-76 ne se lie qu'au filament composé de RanGAP1 sumoylé lors de l'activation du TCR. Cette interaction est cruciale pour le bon fonctionnement du CPN et donc le transport de NFAT et de NFκB. Lors de la mutation de la lysine 56 (en acide glutamique), la liaison entre la protéine SLP-76 et la protéine RanGAP1 sumoylé est déstabilisée, rompu et le transport des facteurs de transcription est diminué. Après activation, la force du signal transmis intracellulairement dépend de l'affinité du ligand au TCR. Ainsi, les différentes affinités des différents peptides OVA influencent la force du signal et donc les fonctions effectrices de la cellule.

D'autre part, contrairement aux souris déficientes de la protéine SLP-76 dont le développement thymique est bloqué, les souris ayant la mutation K56E possèdent un développement normal (observation par Dr Tu, laboratoire Rudd) et donc des cellules T périphériques qui peuvent être étudiées.

Premièrement, mon hypothèse est que les cellules T K56E montreront des réponses différentes (au niveau de la prolifération ou des capacités cytotoxiques) à différents peptides d'affinité distincte par rapport aux cellules T sauvages.

Deuxièmement, que l'importance de la mutation de SLP-76 sera observée au niveau du métabolisme, des cellules T. J'é mets l'hypothèse que les cellules T mutantes K56E présentent des défauts dans la glycolyse, dans la phosphorylation oxydative, ou dans les deux. Une telle démonstration apporterait la première preuve que le SLP-76 joue un rôle important dans le métabolisme des cellules T.

L'objectif de ce mémoire est donc de comprendre l'impact de la mutation K56E SLP-76 sur les différentes fonctions de la cellule T.

Chapitre 2 - Matériels et méthodes

2.1. Souris

L'utilisation des souris a été contrôlée par le comité de protection des animaux du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont afin de respecter la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement). Les souris de type sauvage C57BL_6J (WT) ont été achetées chez la compagnie « *The Jackson Laboratory* » et élevées à l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les souris mutantes SLP-76 K56E (K56E), ont été générées par notre laboratoire, élevées à l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont et possèdent une mutation dans la protéine SLP-76. Les souris de type sauvage transgénique OT-1Rag1 (OT1), sont déficientes pour le gène 1 activateur de recombinaison (Rag1) et possèdent un récepteur T transgénique spécifique au peptide de l'ovalbumine de poulet (257-264). De même, les souris mutantes transgéniques K56E-OT-1Rag1 (KOT1) sont déficientes pour le gène 1 activateur de recombinaison (Rag1) et possèdent un récepteur T transgénique spécifique au peptide de l'ovalbumine de poulet (257-264). Cependant, elles possèdent aussi la mutation de la protéine SLP-76. Les souris transgéniques de type sauvage OT-1 et les souris mutantes transgéniques KOT1 ont été générées par notre laboratoire et élevées à l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

2.2. Milieu de culture

<i>RPMI complet</i>	1% de L-glutamine
	1% de pénicilline streptomycine
	0,5% de tampon HEPES
	10% de FBS
	50µM de β-mercaptoéthanol

<i>Milieu XF (avec glucose)</i>	46 mL de base de milieu XF
	25 mM de glucose
	2 mM sodium pyruvate
	2 mM de glutamine
<i>Milieu XF (sans glucose)</i>	49,5 mL de base de milieu XF
	2 mM de glutamine

Tableau 1. - Composition des différents milieux utilisés

2.3. Activation *in vitro* avec les peptides OVA₂₅₇₋₂₆₄, OVA-Q4 et OVA-T4

Les rates de souris (OT-1Rag1 et KOT-1Rag1) âgées entre 19 et 26 semaines ont été prélevées dans la matinée dans 1 mL de milieu RPMI 1640. Par la suite, les splénocytes ont été isolés mécaniquement à l'aide d'un piston et d'un filtre cellulaire 70 µm. Les lymphocytes T CD8+ ont été isolés de la suspension cellulaire par une lyse des globules rouges contenant du chlorure d'ammonium, carbonate de potassium et de l'EDTA. Les cellules ont été incubées pendant 4 minutes, à température pièce (TP) et la lyse cellulaire a été stoppé par du milieu RPMI complet. Après lavage, les LT CD8+ ont été resuspendus dans 5 mL de milieu complet et comptés. Les cellules ont été incubées avec une solution de *Tag-it violet* (dilution 1/5000 dans du PBS) pendant 10 minutes à 37°C. Le marquage a été arrêté avec 25 mL de milieu complet. Après lavage, les cellules ont été resuspendues à 2x10⁶ cellules/mL. Entre-temps, les solutions de peptides d'OVA ont été préparées, dans du milieu complet, aux concentrations suivantes : 5-0.5-0.05-0.005 µM. Puis dans une plaque de 96 puits, 100 µL de cellules ont été mise en culture avec 100 µL de solution de peptide aux différentes concentrations, pendant deux jours à 37°C. Après les 48h, du BFA à la dilution 1/1000, a été rajouté dans les puits pour 5 heures. Finalement, les cellules

ont été collectées, ont subi un marquage de viabilité, de surface et intracellulaire pour enfin être analysées par FACS.

2.4. Essai cytotoxique *in vitro*

Les rates de souris (OT-1 et KOT-1) âgées de 23 à 30 semaines ont été prélevées et les LT CD8⁺ isolés comme cité précédemment. Après avoir été resuspendues à 4×10^6 cellules/mL, les cellules ont été stimulées avec $0.5 \mu\text{M}$ de peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ ou OVA-Q4 ou OVA-T4 pendant 4 jours dans une plaque de 24 puits. Entre-temps la lignée cellulaire cancéreuse EL4, étant des lymphoblastes conduisant au lymphome (provenant de la compagnie ATCC), a été mise en culture. Après 4 jours de culture, les EL4 ont été collectées et marquées avec $1 \mu\text{g}$ du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ pendant 1 heure. Après lavage, elles ont été resuspendues dans du RPMI complet à 0.5×10^6 cellules/mL pour 50 000 cellules par ratio. Les cellules OT-1 et KOT-1 ont été collectées, préparées et mises aux concentrations finales appropriées de façon à respecter les ratios effecteurs et cibles. Les cibles et les effecteurs ont été mis en co-culture pendant 4 heures avant d'être marqués par le marqueur de viabilité efluor780 (APC-Cy7). Finalement, elles ont été fixées avec du PFA 2% avant d'être analysées par FACS.

2.5. Seahorse avec les souris de type sauvages WT et les souris mutantes K56E

Les rates de souris (WT et K56E), âgées de 7 à 10 semaines, ont été prélevées et isolées comme cité précédemment. Les LT CD3⁺ ont été isolés des splénocytes par colonne à sélection négative (kit d'enrichissement des cellules T CD3⁺ de *R&Dsystems*). Postérieurement les cellules ont été séparées en trois groupes. Un groupe contrôle, avec des cellules inactivées, un groupe activé avec $1 \mu\text{g/mL}$ d'anti-CD3 et un groupe activé avec $1 \mu\text{g/mL}$ d'anti-CD3 et $1 \mu\text{g/mL}$ d'anti-CD28, appelé *combo*. Entre-temps, la plaque allant

contenir les cellules a été enduite avec 10 µL de lysine poly-D, et mise à 4°C pour la nuit, afin de favoriser l'adhérence des cellules. Aussi, la plaque d'injection a été calibrée avec 200µL de *calibrant XF* et placée dans un incubateur à 37°C sans CO₂, pour la nuit. Le lendemain, les cellules ont été collectées, resuspendu dans du milieu XF et placées dans la plaque prévue à cet effet. Le même jour, trois tests ont été utilisés. Le test du stress mitochondrial, le test du taux glycolytique et le test du taux d'ATP. Les différentes drogues ont été placées dans la plaque à injection. Par la suite, la machine *XFe96 analyzer* a été calibrée et la plaque d'injection mise au-dessus de la plaque de cellules. Les injections ont été effectuées par la machine ainsi que la réalisation graphique.

2.6. Seahorse avec les souris transgéniques de type sauvage OT1 et les souris mutantes KOT1

Les rates de souris (OT1 et KOT1), âgées de 7 à 10 semaines, ont été prélevées et les LT CD8 ont été isolés comme cité précédemment (voire point (3)). Postérieurement, les cellules ont été séparées en trois groupes. Un groupe contrôle, avec des cellules inactivées, un groupe activé avec 5µg/mL de peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄, un groupe activé avec 5µg/mL de peptide OVA-Q4 et un groupe activé avec 5µg/mL de peptide OVA-T4. Entre-temps, la plaque allant contenir les cellules a été enduit avec 10 µL de lysine poly-D, et mise à 4°C pour la nuit, afin de favoriser l'adhérence des cellules. Aussi, la plaque d'injection a été calibrée et placée dans un incubateur à 37°C sans CO₂. Le lendemain, les cellules ont été collectées, resuspendu dans du milieu XF et placées dans la plaque prévue à cet effet. Le même jour, quatre tests ont été utilisés. Le test du stress mitochondrial, le test du stress de la glycolyse, le test du niveau glycolytique et le test du niveau d'ATP. Les différentes drogues ont été placées dans la plaque à injection. Par la suite, la machine *XF96 analyzer* a été calibrée et la plaque d'injection mise au-dessus de la plaque de cellules. Les injections ont été effectuées par la machine ainsi que la réalisation graphique.

2.7. Analyses statistiques

L'analyse des données a été faite par le logiciel *Graphpad Prism*. Afin de comparer les deux groupes entre eux, le test *two way ANOVA* a été utilisé. Les données considérées comme statistiquement significatives ont été appointé d'un astérisque. Si la valeur p est inférieure à 0,05, le résultat est marqué d'un astérisque (*), si la valeur p est inférieure à 0,01, le résultat est marqué de deux astérisques (**), si la valeur p est inférieure à 0,001, le résultat est marqué de trois astérisques (***) et si la valeur p est inférieure à 0,0001, le résultat est marqué de quatre astérisques (****). Dans le cas contraire où le résultat n'est pas statistiquement significatif, avec une valeur de $p > 0,05$, le résultat est laissé sans astérisque ou noté *ns*. De plus, l'indice de prolifération généré par le logiciel *Flowjo* a été ajouté aux résultats obtenus.

2.8. Cytométrie de flux

Anticorps	Conjugué	Isotype	Clone	Concentration	Compagnie
<i>Viability staining</i>	BV510			1/1000	Biolegend
<i>Tagit violet</i>	BV421			1/1000	Biolegend
CD69	BV605	Armenian Hamster IgG	H1.2F3	0.5µg/ml	Biolegend
CD8	BV650	Rat LOU/ Rat IgG2a, κ	53-6.7	0.5µg/ml	Biolegend
PD1	BV786	Rat IgG2a, κ	29F.1A12	0.5µg/ml	Biolegend
IFNγ	PE-dazzle	Rat / IgG1, kappa	XMG1.2	0.2µg/ml	eBiosciences
CD25	BUV395	Mouse BALB/c IgG1, κ	M-A251	0.2µg/ml	BD
CTLA-4	PE	Armenian Hamster IgG	UC10-4B9	0.2µg/ml	Biolegend

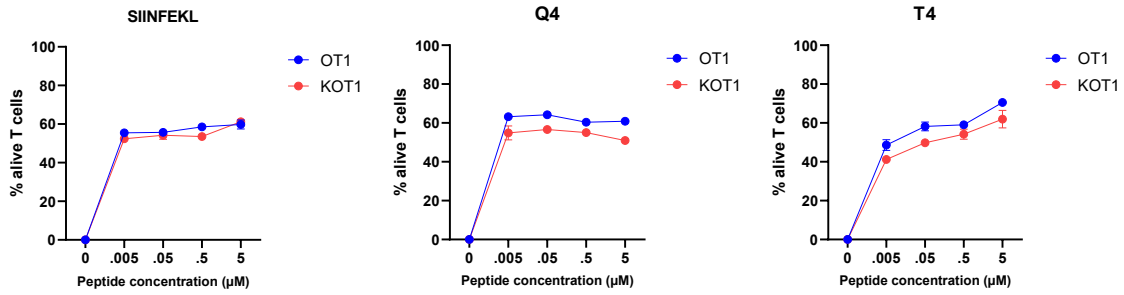
Tableau 2. - Anticorps utilisés pour les analyses par FACS

Chapitre 3 - Résultats

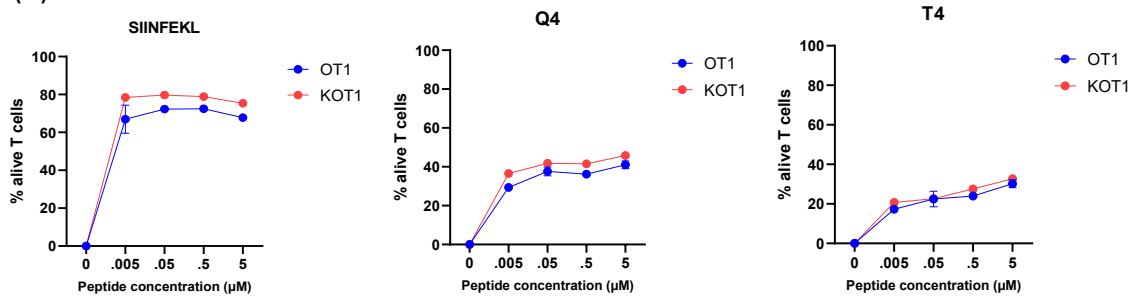
3.1 K56E n'affecte pas le pourcentage de cellules viables, mais diminue la prolifération cellulaire

Des études antérieures ont montré que la mutation K56E affectait l'entrée des facteurs de transcriptions NF κ B et NFAT. Nous avons enquêté afin de savoir si cette mutation avait un impact sur la viabilité des cellules T. Après une activation de 48h avec différents peptides d'OVA à différentes concentrations, les cellules ont été traitées avec un marqueur de viabilité. D'autres marquages ont été effectués par la suite, avant que les cellules ne soient analysées par le cytomètre. Ainsi nous avons pu détecter le pourcentage de cellules vivantes dans chaque échantillon. Sur la **figure 6**, la viabilité a été mesurée par cytométrie de flux. Nous pouvons donc constater qu'aux différentes concentrations de peptides, la mutation ne réduit pas la viabilité des cellules KOT1. En revanche, la force du signal au niveau du TCR semble réguler le pourcentage de cellules viables tant pour les cellules OT1 que pour les cellules KOT1. L'activation avec le peptide SIINFEKL génère entre 80 à 100% de cellules viables. Ce pourcentage décroît suivant l'activation avec le peptide Q4. Nous pouvons observer un pourcentage de cellules vivantes aux alentours de 40 à 70%. Enfin, le pourcentage de cellules viables suivant l'activation avec le peptide T4, se trouve autour de 20 à 60%. Finalement, après deux jours d'activation, le peptide à forte affinité (SIINFEKL) semblerait donné à un plus grand nombre de cellules, une meilleure capacité de survie. En effet, dû à la forte affinité du ligand pour son récepteur, une fois le peptide lié au TCR, l'interaction chimique entre les deux, gardera le peptide attaché plus longtemps et le signal qui s'en suivra sera plus long. À contrario, en considérant le même nombre de cellules, le peptide T4 à faible affinité va engendrer une interaction plus faible et possiblement moins longue avec le TCR. Cela aurait pour effet d'activer moins de cellules d'où le pourcentage faible de cellules vivantes.

(A)



(B)



(C)

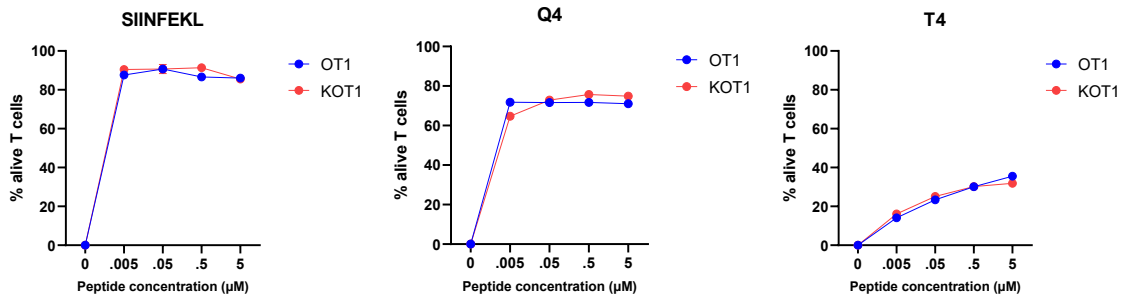
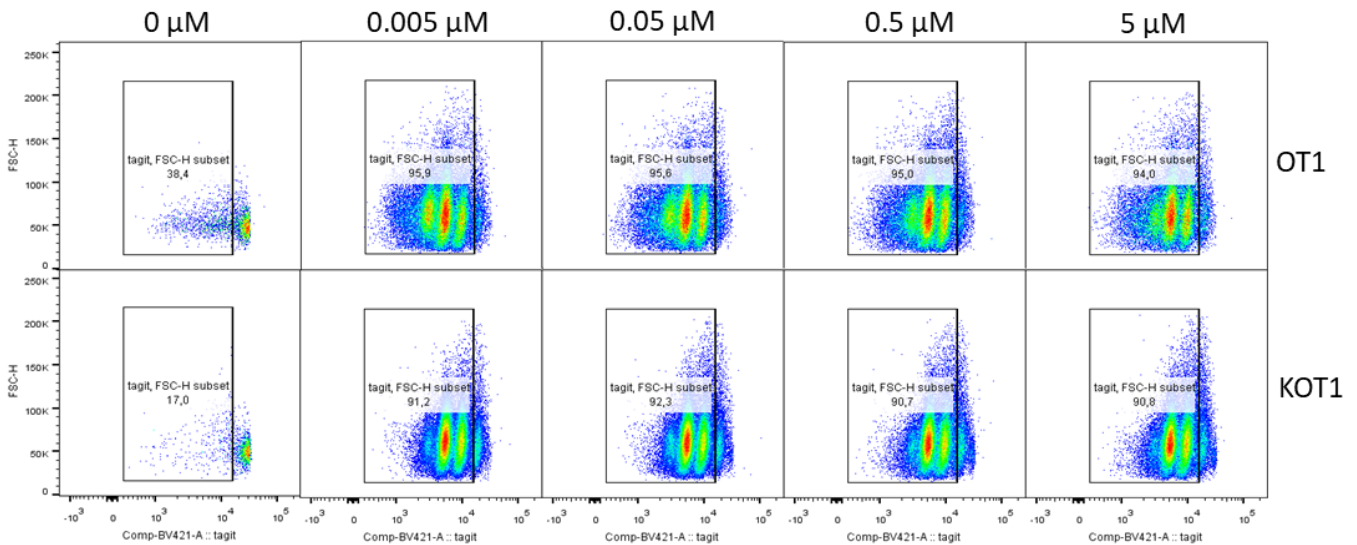


Figure 6. - Titration of the viability of mouse WT and K56E splenocytes after OVA peptide stimulation. OT1 and KOT1 mouse T cells (20-30 weeks) were isolated from splenocytes and activated for two days with different peptide concentrations (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μ M). The following peptides, having different affinities for the T receptor, were used for activation: SIINFEKL (high affinity), Q4 (medium affinity), T4 (low affinity). (A) Subsequently, the cells were labeled with a viability marker detectable by flow cytometry, at different concentrations. The same experiment was performed two additional times (B-C).

Précédemment, nous avons montré que la mutation n'affectait pas la viabilité des cellules T. Néanmoins, le pourcentage de cellules T viables dépendrait de l'affinité du peptide pour son récepteur. Étant donné l'importance de SLP-76 dans les cellules immunitaires, nous avons décidé d'explorer les conséquences de cette mutation sur la prolifération cellulaire. Les cellules ont été marquées par un traceur de prolifération cellulaire, nommée *tagit-it violet*, et activée pendant 48 h. La **figure 7** nous montre les résultats analysés par le logiciel *flowjo*. Sur la première ligne de la **figure 7A** nous voyons la prolifération cellulaire des OT1 à différentes concentrations et sur la deuxième, la prolifération cellulaire des KOT1. Ces cellules T ont été activées avec le peptide SIINFEKL. Nous observons trois divisions cellulaires chez les OT1 contre deux divisions pour les KOT1. À toutes les concentrations, le nombre maximal de cellules se retrouve à la deuxième division. Chez les OT1, après 48 h, une population plus grande que les KOT1 a entamé leur troisième division. Une minorité de cellules KOT1 semblent continuer leur cycle jusqu'à la troisième division. Les histogrammes de la **figure 8A**, permettent de mieux visualiser ce constat. En effet, le pic numéro 2 est le plus élevé tant chez les OT1 que chez les KOT1. La différence entre les OT1 et les KOT1, dans le nombre de cellules procédant à la troisième division, est plus appréciable et évidente sur la **figure 8A**. Aussi, le nombre de cellules allant en première division (pic 1) est plus élevé chez les KOT1. Cette observation ne peut être faite qu'avec la concentration 0.005 μM de peptide SIINFEKL bien que pour toutes les concentrations, les KOT1 ne semblent pas arriver jusqu'à la troisième division. En comparant les OT1 activés avec les trois peptides SIINFEKL (**figure 8A**), Q4 (**figure 8B**) et T4 (**figure 8C**), nous avons remarqué que plus la concentration de peptide est élevée, moins il y a de cellules arrivant à la dernière division sur le total de division observée. À la suite de l'activation avec le peptide Q4 et T4, jusqu'à quatre divisions ont été observées pour les OT1 contre trois pour les KOT1 (**figure 7B et 7C**). Avec le peptide à moyenne affinité, nous voyons qu'une plus grande population de cellules OT1 et KOT1 arrive en troisième division (**figure 8B**) comparée aux cellules activées avec le peptide SIINFEKL (**figure 8A**). De plus, nous avons constaté que l'activation avec le peptide à faible affinité T4 (**figure 8C**) engendrait une population d'OT1 légèrement plus grande à

la quatrième division contrairement au peptide Q4 (**figure 8B**). Ceci, même à une concentration élevée telle que 5 μM . Finalement, la mutation semble réduire le nombre de divisions cellulaires. Il est probable qu'elle ralentisse le cycle de division cellulaire puisqu'en 48h, il y a toujours une division en moins chez les cellules KOT1. L'indice de prolifération (IP) des KOT1 est, indépendamment du peptide et de la concentration, inférieur à celui des OT1. Ces résultats suggèrent que la rupture de la liaison de SLP-76 à RanGAP semble agir sur le temps de division cellulaire des cellules T. Si nous portons un regard global sur les **figures 6 et 8**, nous remarquons quelque chose d'intéressant. En effet, plus l'affinité du peptide d'OVA diminue, plus la viabilité des cellules T diminue. Pourtant, lorsque l'affinité ainsi que la concentration du peptide diminuent, la prolifération cellulaire augmente.

(A)



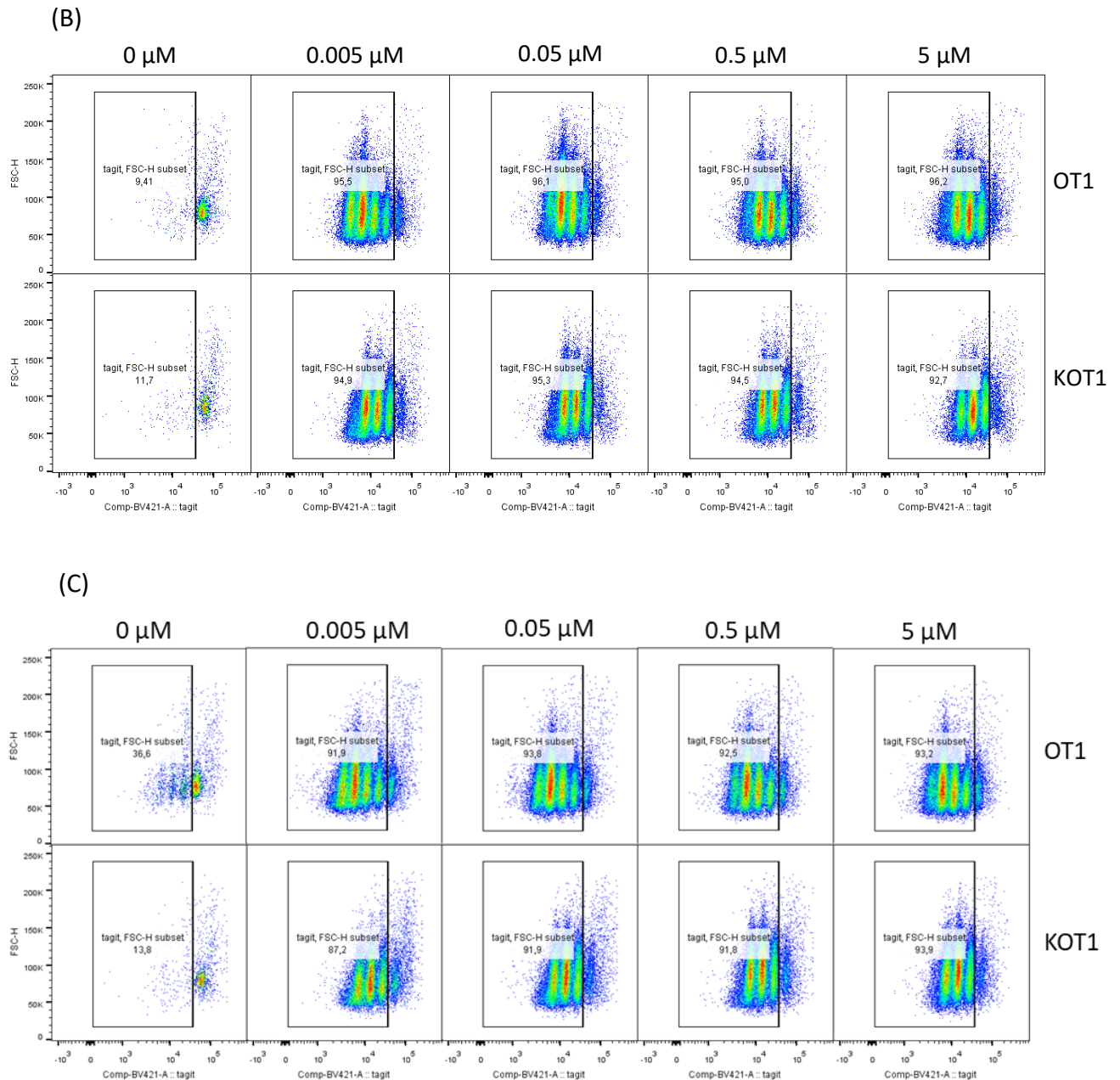


Figure 7.- Impact de l'affinité des peptides d'OVA sur la prolifération cellulaire. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (6-10 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes, marquées avec un traceur de prolifération et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μM). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFELK (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). Par la suite, les cellules ont été analysées par cytométrie de flux, aux différentes concentrations. Prolifération des cellules T OT1 et KOT1 activées avec 0,5 μM de peptide SIINFELK (A), 0,5 μM de peptide Q4 (B) et 0,5 μM de peptide T4 (C). (n=3)

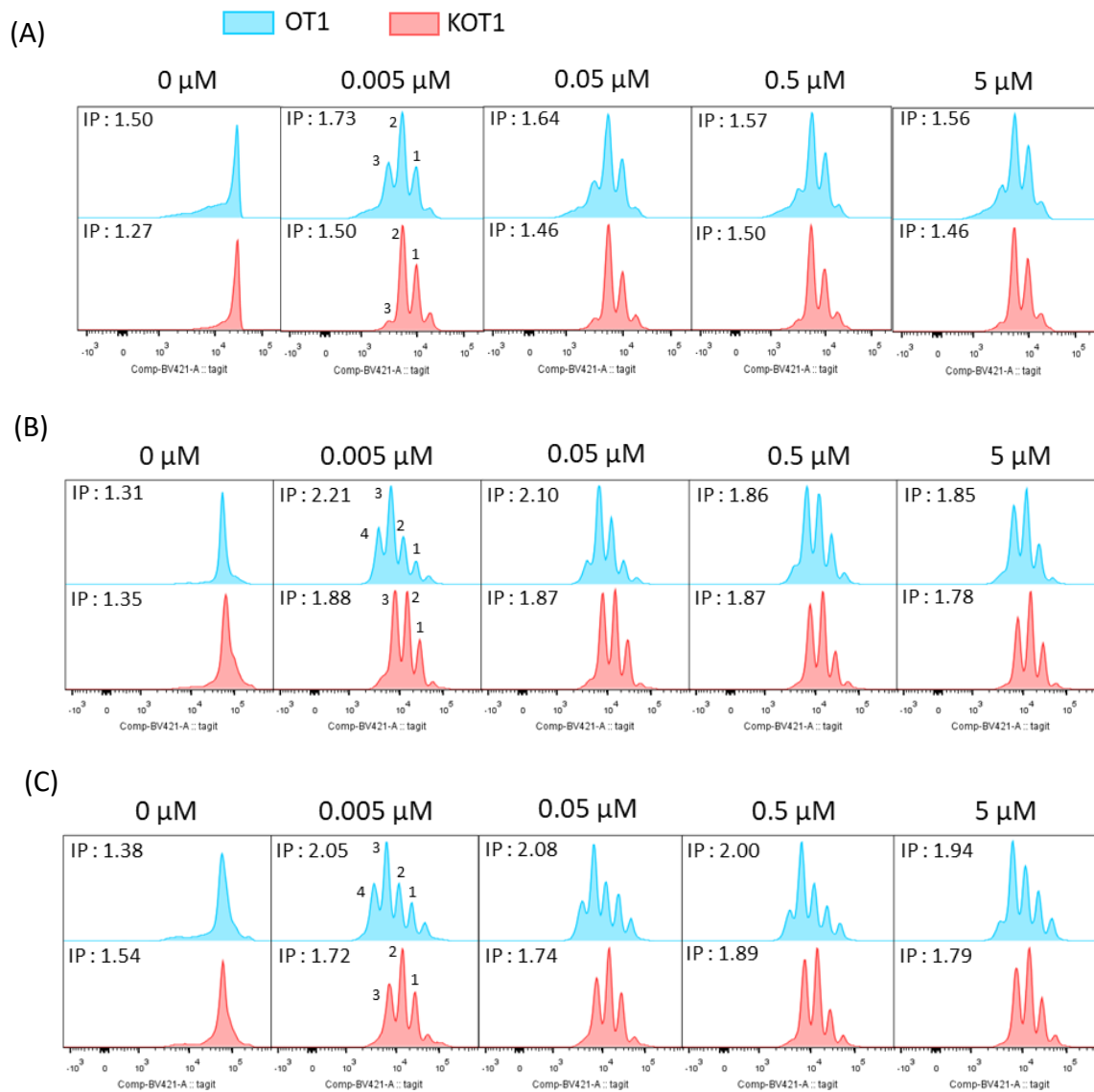


Figure 8. - Impact de l'affinité des peptides d'OVA sur la prolifération cellulaire telle que montré par le diagramme à point (*dot plot*). Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (6-10 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes, marquées avec un traceur de prolifération et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μM). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). Par la suite, les cellules ont été analysées par cytométrie de flux, aux différentes concentrations. Histogrammes de la prolifération des cellules T OT1 et KOT1 activés avec (A) 0,5 μM de peptide SIINFEKL, (B) 0,5 μM de peptide Q4 et (C) 0,5 μM de peptide T4. Au moyen du logiciel FlowJo les indices de prolifération (IP) ont été ajoutés sur les histogrammes. (n=3)

3.2 L'affinité des peptides affecte l'expression de PD1

Ensuite, nous avons procédé à l'analyse du marqueur d'activation et d'épuisement, PD1 (**figure 11 – annexes 2 et 6**). Sur deux expériences sur trois, PD1 était exprimé à environ 80 % avec le peptide SIINFEKL chez les souris âgées de 20 à 30 semaines (**figure 11A**). Pour des raisons que l'on ignore, à la troisième expérience, l'expression de PD1 n'atteint que 20 % (pour les OT1) et 35 % (pour les KOT1). Sur la figure de gauche et de droite (**figure 11A**) PD1 est exprimé à 30-40 % pour les peptides Q4 et T4. À contrario, sur le graphique central, l'expression de PD1 atteint les 70-80%. Malgré certains résultats significatifs, le niveau d'expression de PD1 reste semblable entre les groupes OT1 et KOT1. Ces résultats suggèrent que la dépendance du signal aux peptides diffère pour IFN γ et PD1. Cependant, malgré un contraste évident entre le comportement d'IFN γ (**figure 11**) et de PD1, il semble il y avoir une dépendance entre la force du signal et l'expression de PD1. Afin de comparer si l'âge avait un impact sur l'expression de PD1, nous avons effectué la même expérience avec des souris âgées entre 7 et 10 semaines (**figure 11B**). De manière surprenante, nous avons pu observer que chez les souris plus jeunes, les cellules T mutantes semblent avoir une expression de PD1 inférieur ou égal aux cellules T de type sauvage. De plus, chez les jeunes souris, l'expression de PD1 s'avère ne pas être influencée, par la force du signal délivré par le peptide. Finalement, la mutation K56E SLP-76 ne semble pas impacter les cellules activées avec le peptide à fortes et à faible affinité.

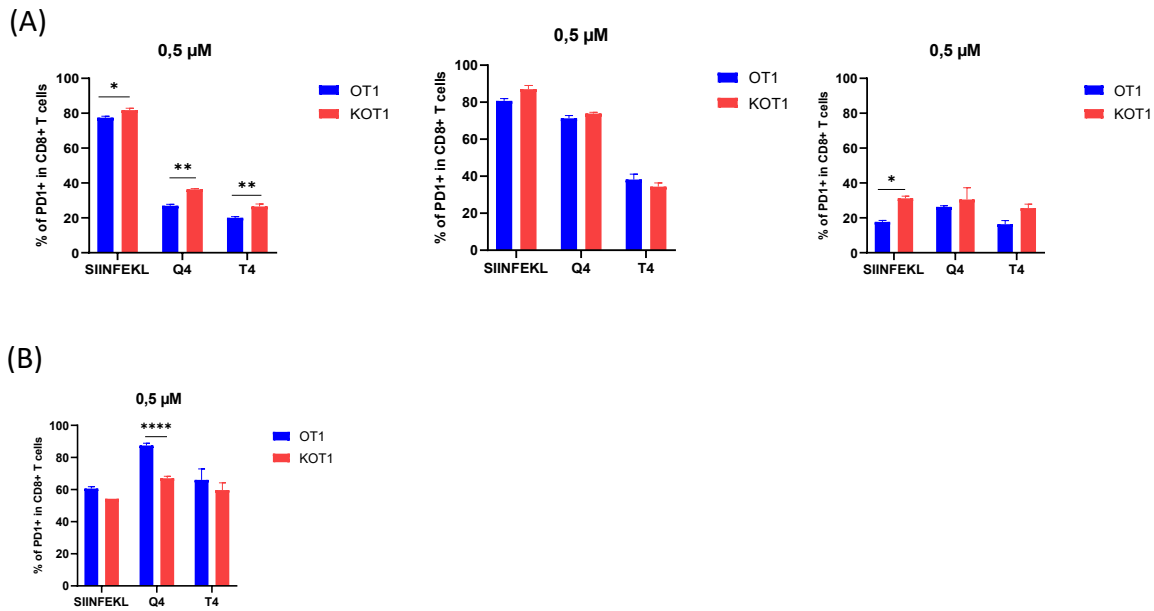


Figure 11. - L'affinité des différents peptides d'OVA peut contrôler l'expression de PD1 à la surface des cellules T des souris OT1 (sauvages) et chez les KOT1 (mutantes). Les cellules T de souris OT1 et KOT1 ont été isolées à partir de splénocytes et activées pendant 2 jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μM). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). Par la suite, la quantité de PD1 exprimés à la surface des cellules T, a été détectée par cytométrie de flux. (A) Comparaison de la proportion de cellules T CD8⁺PD1⁺ entre les différents peptides chez les souris OT1 et KOT1 (20 à 30 semaines) à la concentration 0.5 μM. (B) Proportion de cellules T CD8⁺PD1⁺ entre les différents peptides chez les souris OT1 et KOT1 (7 à 10 semaines) à la concentration 0.5 μM. (n=3)

3.3 K56E réduit l'expression des récepteurs CTLA-4 et CD25 induit par peptides

En continuant sur l'analyse des marqueurs de surface, nous avons utilisé une approche similaire pour évaluer l'expression du récepteur de l'IL-2, CD25 et le point de contrôle, CTLA-4 (**figure 12 – annexe 4**). L'expression de CD25 et CTLA-4 est similaire à celle d'IFN γ (**figure 12**). Ces résultats ont été obtenus à partir de cellules T de souris jeunes (7-10 semaines). Toutefois, il est possible de voir une différence statistiquement significative entre les OT1 et les KOT1, et ce, pour chaque peptide (**figure 12 A et B**). Ces résultats suggèrent la possibilité que le signal 3, délivré via le récepteur de l'IL-2 (CD25), influence

la réponse d'IFN γ (**figure 11**). CTLA-4, qui est un récepteur inhibiteur, est aussi un indicateur d'activation de la cellule. Ainsi, sur la **figure 12A**, nous observons que pour chaque concentration et chaque peptide, les cellules OT1 sont plus activées que les cellules KOT1. Cette différence, dans l'expression de CD25, entre les OT1 et les KOT1 (**figure 12A**) pourrait aussi expliquer la différence dans le nombre de divisions cellulaires (**figure 8**). Alors que les OT1 expriment davantage le récepteur CD25 que les KOT1, elles prolifèrent aussi davantage (**figure 8**).

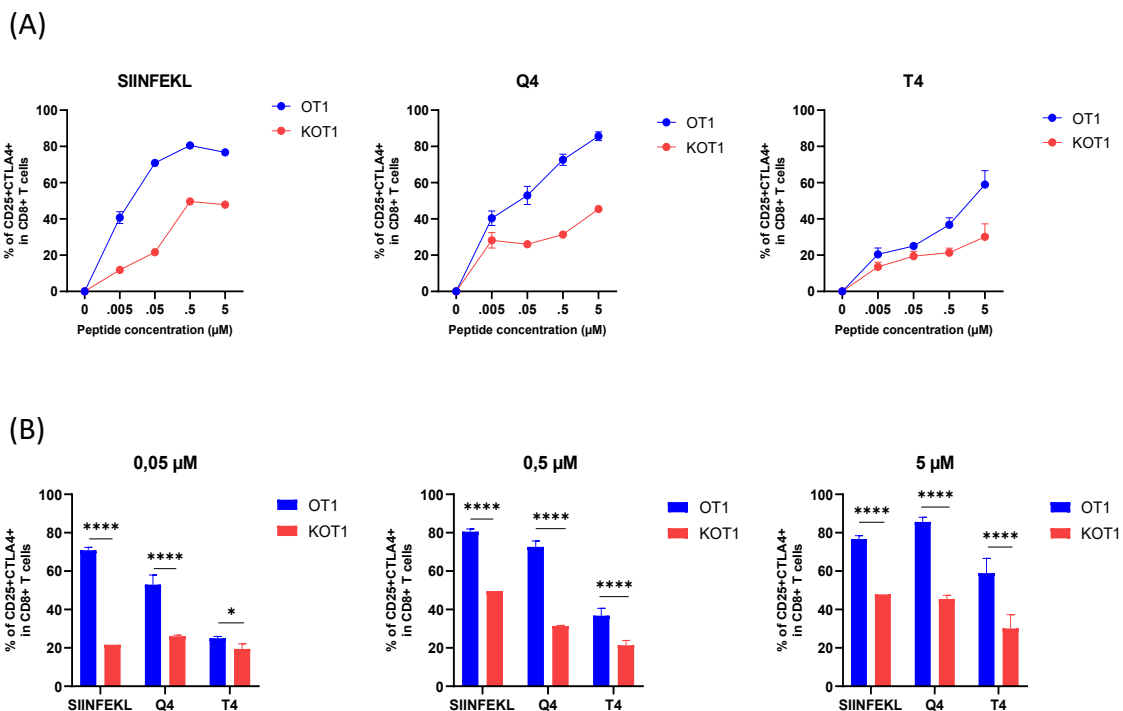


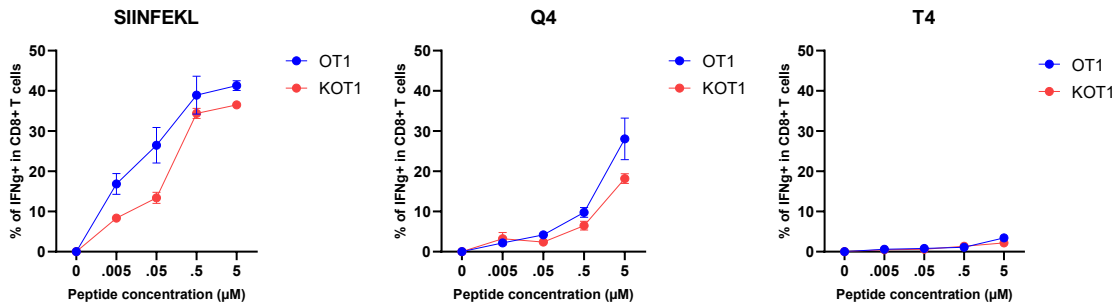
Figure 12. - La mutation K56E peut contrôler l'expression de CTLA-4 et CD25. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (7-10 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μM). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). (A) Par la suite l'expression du récepteur de surface a été détectée par cytométrie de flux, par marquage de surface, aux différentes concentrations. (B) Comparaison de la proportion de cellules T CD8⁺CTLA-4⁺CD25⁺ entre les différents peptides chez les souris OT1 et KOT1 aux concentrations 0.05 μM, 0.5 μM, 5 μM (de gauche à droite). (C) Comparaison de la proportion de cellules T CD8⁺CTLA-4⁺CD25⁺ en fonction de l'affinité de chaque peptide chez les souris OT1 (à gauche) et les souris KOT1 (à droite).

3.4 K56E affecte l'induction de la cytokine effectrice IFN γ , induit par des peptides

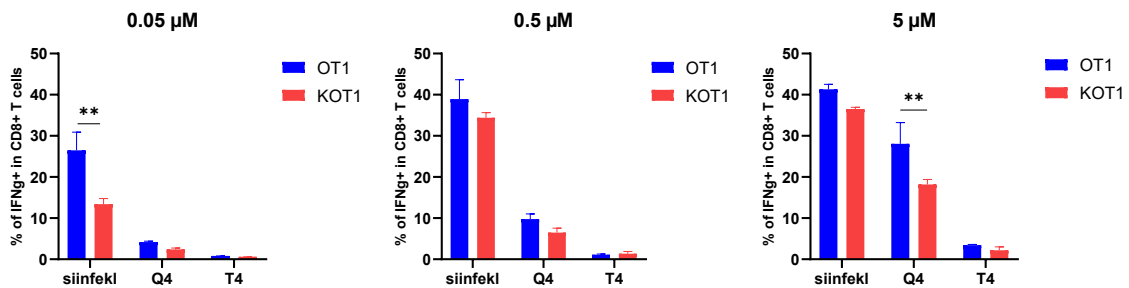
L'étape suivante a été d'observer l'effet de K56E sur les fonctions effectrices des cellules T. La **figure 11 (et annexe 5)** représente des analyses faites sur des souris âgées de 20 à 30 semaines. La **figure 12 (et annexe 3)** représente des analyses faites sur des souris âgées de 7 à 10 semaines. Les peptides SIINFEKL, Q4 et T4 induisent tous l'expression d'IFN γ entre 0.005 μ M et 5 μ M. Comparées aux cellules OT1, les cellules mutantes semblent induire un niveau plus faible d'IFN γ . Suivant l'activation avec le peptide SIINFEKL, l'expression maximale se trouve autour de 40% (**figure 11A**). Après activation avec le peptide Q4, il n'y avait que peu de réponses (**figure 11A**). Quant à l'activation avec le peptide T4, elle n'engendre pratiquement aucune réponse. Plus l'affinité du peptide pour le TCR diminue, plus la production d'IFN γ diminue aussi. Nous avons pu faire cette observation non seulement chez les souris âgées de 20 à 30 semaines (**figure 11**), mais aussi sur les souris âgées de 7 à 10 semaines (**figure 12**). Cette tendance est d'autant plus visible lorsque nous comparons la production d'IFN γ entre les peptides à la même concentration (**figure 11B**). La mutation de SLP-76 ne semble pas impacter la production d'IFN γ de manière significative, de façon générale. En revanche, la mutation semble avoir un effet sur les cellules activées par le peptide SIINFEKL à 0.05 μ M. Par la suite, nous avons effectué une expérience similaire sur des souris de 7 à 10 semaines. Tandis que les cellules T des souris plus âgées (20-30 semaines) produisaient jusqu'à 50% d'IFN γ , les cellules T des souris plus jeunes (7-10 semaines) en produisaient jusqu'à 90% (**figure 12A**). La mutation paraît avoir un effet significatif sur les jeunes souris (**figure 12B**). En effet, à de faibles concentrations telles que 0.05 μ M la production d'IFN γ est plus faible chez les KOT1. Cet effet est couvert à des concentrations plus élevées telles que 0.5 μ M et 5 μ M (**figure 12B**) avec le peptide SIINFEKL. Qu'importe la concentration de peptides à moyenne affinité, la production d'IFN γ est régulée par la mutation (**figure 12B**). En revanche, la mutation ne semble réguler la réponse du TCR qu'à des concentrations supérieures à 0.05 μ M pour le peptide T4 (**figure 12B**). À la **figure 11C** et **figure 12C** nous observons les effets de l'affinité des peptides. Plus l'affinité du peptide est faible, plus le

pourcentage d'IFN γ produit par les cellules T est faible. Cette observation peut être faite aux différentes concentrations d'activation. Ces résultats suggèrent que la production d'IFN γ , des cellules T OT1 et KOT1 des souris plus âgées, est régulée préférentiellement par l'affinité des peptides. De plus, ces résultats suggèrent que les cellules T de souris plus jeunes sont plus sensibles à la mutation SLP-76 K56E, mais également à l'affinité des peptides.

(A)



(B)



(C)

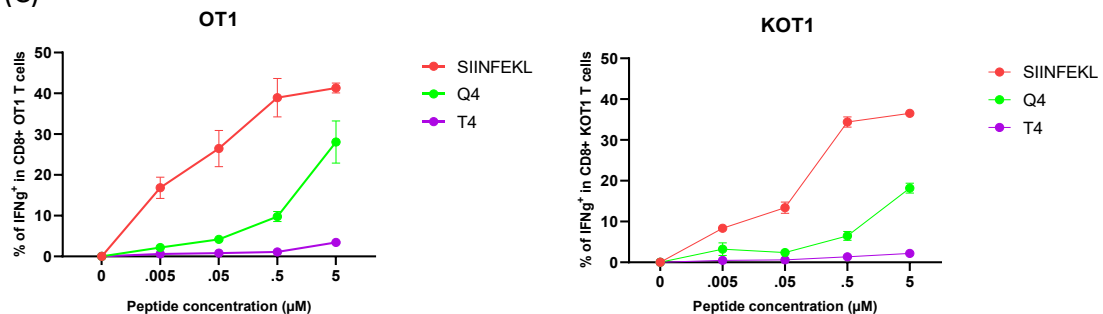
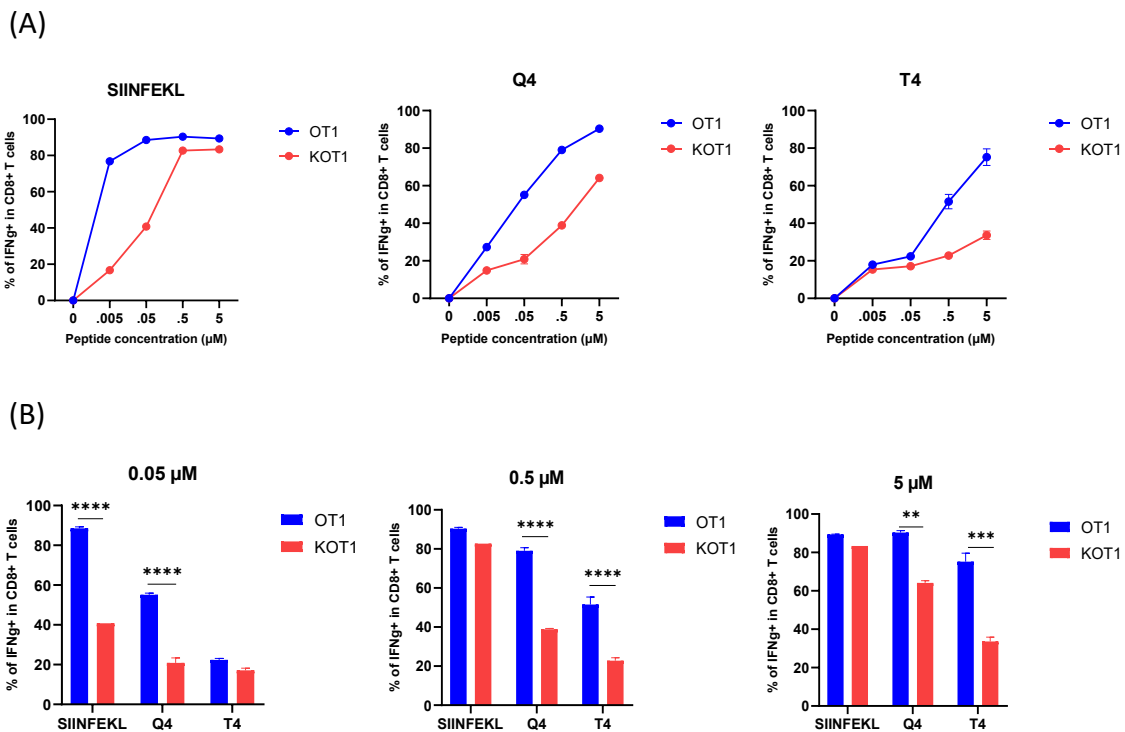


Figure 11. - L'affinité des différents peptides d'OVA peut contrôler la production d'IFN γ dans les splénocytes des souris OT1 (sauvages) et KOT1 (mutantes) âgées de 20 à 30 semaines. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (20-30 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μ M). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). (A) Par la suite, la quantité d'IFN γ produite à l'intérieur des cellules T, a été détectée par cytométrie de flux, par marquage intracellulaire. (B) Comparaison de la proportion de cellules T CD8⁺IFN γ ⁺ entre les différents peptides chez les souris OT1 et KOT1 aux concentrations 0.05 μ M, 0.5 μ M, 5 μ M (de gauche à droite). (C) Comparaison de la proportion de cellules T CD8⁺IFN γ ⁺ en fonction de l'affinité de chaque peptide chez les souris OT1 (à gauche) et les souris KOT1 (à droite). (n=3)



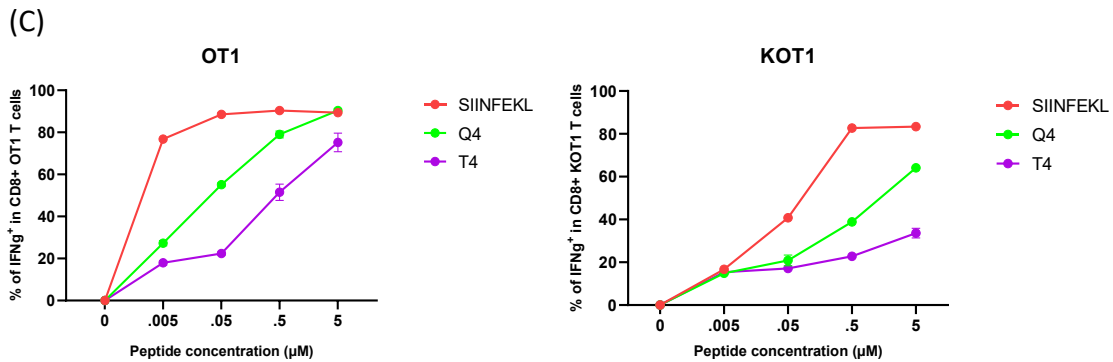


Figure 12. - L'affinité des différents peptides d'OVA peut contrôler la production d'IFN γ dans les splénocytes des souris OT1 (sauvages) et KOT1 (mutantes) âgées de 7 à 10 semaines. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (7-10 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μ M). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). (A) Par la suite, la quantité d'IFN γ produite à l'intérieur des cellules T a été détectée par cytométrie de flux, par marquage intracellulaire. (B) Comparaison de la proportion de cellules T CD8⁺IFN γ ⁺ entre les différents peptides chez les souris OT1 et KOT1 aux concentrations 0.05 μ M, 0.5 μ M, 5 μ M (de gauche à droite). (C) Comparaison de la proportion de cellules T CD8⁺IFN γ ⁺ en fonction de l'affinité de chaque peptide chez les souris OT1 (à gauche) et les souris KOT1 (à droite). (n=3)

3.5 K56E affecte les fonctions cytotoxiques des cellules T induites par peptides

Jusqu'ici, nous avons montré comment la réponse à l'antigène OVA et ses variants pouvaient moduler l'expression de cytokines et de récepteur de surface cellulaire. Par la suite, nous avons procédé à l'évaluation de la fonction des cellules OT1 et KOT1 en réponse aux peptides d'OVA. Nous avons donc mis en place un essai cytotoxique. Après avoir activé les cellules pendant 4 jours avec les peptides, elles ont été mises en co-culture avec les cellules cibles à différents ratios *Effector : Target* (E:T). Ces dernières sont des cellules cancéreuses du mélanome, nommées EL4 exprimant OVA (**figure 13**). Nous avons donc évalué le pourcentage de cellules cibles *pulsed* (exprimant le peptide OVA) tuées par

les lymphocytes T au cours d'un essai cytotoxique. Après activation avec le peptide SIINFEKL (en haut à gauche) nous observons qu'au ratio 5 : 1 les cellules OT1 tuent davantage les cellules cible que les cellules KOT1. Cela pourrait refléter leur moindre niveau d'activation. Au ratio le plus élevé 10 : 1, il y a aussi une différence significative entre les OT1 et les KOT1. La mutation K56E SLP-76 semble contrôler la capacité de tuer à de faibles ratios. En réponse à l'activation par Q4 (en haut à droite), il y a de différence statistiquement significative entre les OT1 et les KOT1 à tous les ratios. Alors que le peptide SIINFEKL donnait la capacité aux cellules T de tuer jusqu'à 100 % des cellules cibles au ratio 20 : 1, le peptide Q4 ne permettait qu'une mortalité de 60 % au même ratio (résultats non montrés). Étonnement, lors d'une activation de faible intensité avec le peptide T4, les cellules KOT1 tuent davantage de cellules cible au ratio 10 :1. Au ratio plus faible 5 : 1, il n'y a pas de différence entre les OT1 et les KOT1. Tandis que les cellules KOT1 avaient une capacité de tuer moindre, comparée aux cellules OT1 avec les peptides SIINFEKL et Q4, nous observons le contraire avec l'activation au T4. En effet, au ratio 10:1, le pourcentage d'EL4 morte est significativement supérieur chez les KOT1. Malgré ce résultat, nous voyons une tendance liant l'affinité du peptide aux fonctions effectrices des cellules T. Les cellules *unpulsed* (n'exprimant pas le peptide OVA) ont été utilisées comme contrôle afin de montrer l'efficacité de l'expression d'OVA par les cellules cibles. Avec les peptides SIINFEKL, Q4 et T4, il y a une augmentation du pourcentage de cellules mortes avec l'augmentation du ratio *effector : target*. Finalement, ces résultats suggèrent que la mutation K56E n'agit sur la fonction effectrice des cellules que lorsqu'elles sont activées par SIINFEKL et Q4.

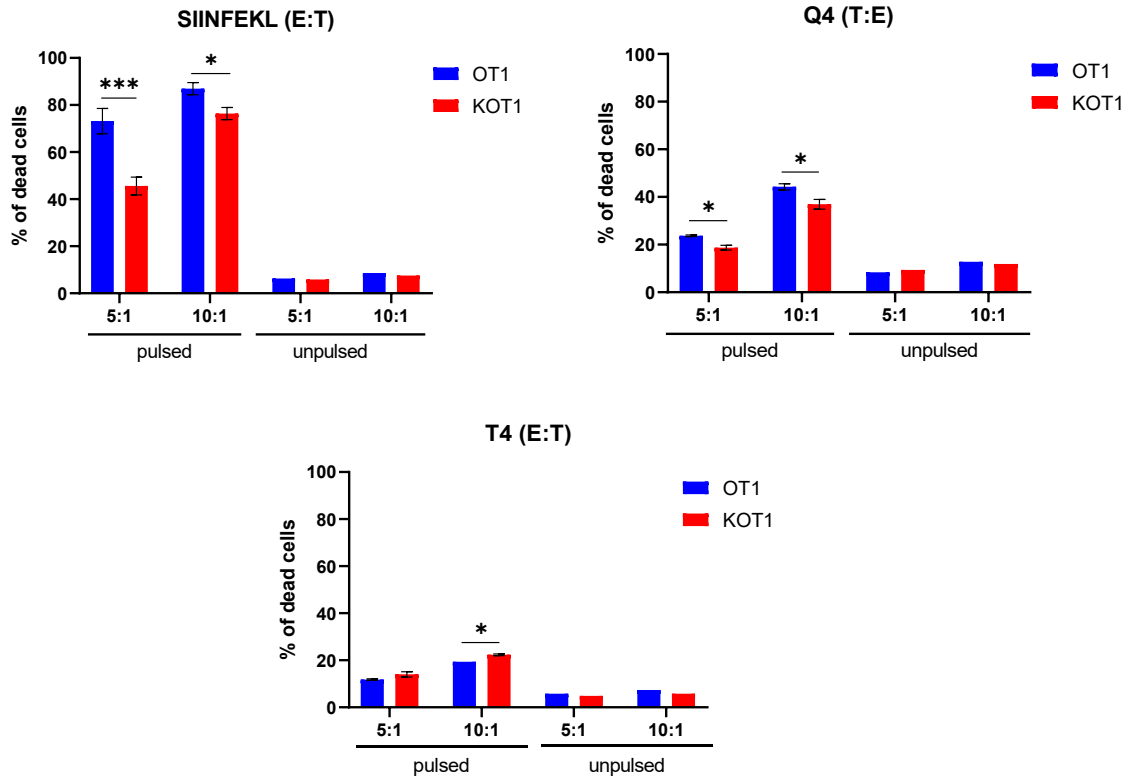


Figure 13. - Le degré de force d'activation des cellules T chez les souris OT1 et KOT1 impacte la cytotoxicité des cellules T à différents ratios. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 ont été isolées et activées avec 0,5 μ M des différents peptides d'ovalbumine (SIINFEKL ; Q4 ; T4). Après trois jours d'activation, l'essai cytotoxique a été réalisé à différents ratio (E:T). La lignée cellulaire cancéreuse EL4 a été utilisée comme cibles pour les cellules cytotoxiques. Ces dernières ont été forcées à exprimer la molécule d'ovalbumine (groupe « pulse ») tandis que d'autres ne l'ont pas été (groupe « unpulsed »). Le pourcentage de cellules mortes a été mesuré par cytométrie de flux et les résultats ont été analysés par le logiciel Prism. ($P < 0.05 = *$; $P < 0.01 = **$; $P < 0.001 = ***$; $P < 0.0001 = ****$).

La **Figure 14** nous permet de mieux observer l'effet de la force du signal au TCR sur la fonction cytotoxique de la cellule T. Au ratio 5 : 1, la mutation semble contrôler la cytotoxicité de la cellule. Ce contrôle ne s'exerce que lorsque les cellules T sont activées par SIINFEKL et Q4. La réponse des cellules T KOT1 ne semble pas être impactée par la mutation, lorsqu'activée avec le peptide T4 au ration 5:1. Cette observation semble révéler le fait que la liaison entre SLP-76 et RanGAP1 régule les réponses qui ont un fort signal d'activation. À un ratio plus élevé tel que 10 : 1, le peptide T4 semble renverser la

tendance. En effet, pour une raison inconnue, les cellules KOT1 semblent tuer plus de cellules cibles en réponse à l'activation au peptide T4. Plus le ratio (*Effector : Target*) augmente, plus le pourcentage de cellules cibles tuées augmente, autant chez les OT1 et les KOT1. Aussi, plus l'affinité du peptide est faible plus la cytotoxicité de la cellule diminue.

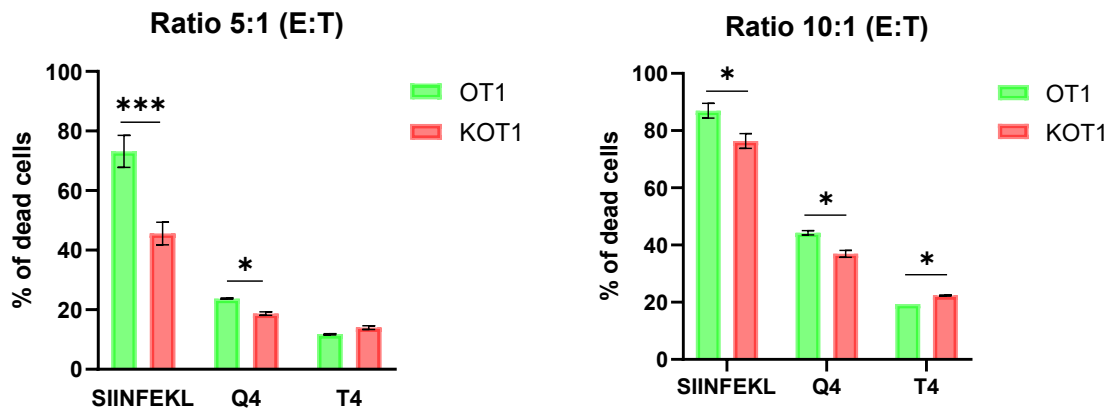


Figure 14. - Le peptide à faible affinité semble renverser l'impact de la mutation K56E. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 ont été isolées et activées avec 0,5 μ M des différents peptides d'ovalbumine (SIINFEKL ; Q4 ; T4). Après quatre jours d'activation, l'essai cytotoxique a été réalisé à différents ratio. La lignée cellulaire cancéreuse EL4 a été utilisée comme cibles pour les cellules cytotoxiques. Le pourcentage de cellules mortes a été mesuré par cytométrie de flux et les résultats ont été analysés par le logiciel Prism. ($P < 0.05 = *$; $P < 0.01 = **$; $P < 0.001 = ***$; $P < 0.0001 = ****$).

3.6 K56E affecte le métabolisme induit par anti-CD3/CD28 et par peptides

Après avoir évalué différents marqueurs intra et extracellulaires, il était évident de regarder les propriétés métaboliques des cellules. De plus, il était intéressant de se demander si la cytotoxicité élevée des lymphocytes T WT comparés aux K56E était due à un changement métabolique dans la glycolyse ou dans la phosphorylation oxydative. Nous avons donc procédé à un *seahorse* pour évaluer le métabolisme (**figure 15**).

Initialement, les cellules T WT et K56E ont été utilisées afin de confirmer d'autres résultats obtenus par notre laboratoire.

Les kits de la compagnie *Agilent* nous ont permis d'analyser les différents processus entourant la glycolyse. De nombreux résultats ont pu être extraits de cette expérience. Dans le kit du taux glycolytique (**figure 15A**), deux drogues sont utilisées : la roténone/Antimycine A (Rot/AA) et le 2-Désoxy- glucose (2-DG). Respectivement, ces drogues permettent l'inhibition de la chaîne de transport d'électrons dans la mitochondrie et l'inhibition de la première enzyme impliquée de la glycolyse. À la première injection, il y aura augmentation de la glycolyse pour pallier à la perte de proton H^+ dans la glycolyse. Tandis qu'à la deuxième injection, la glycolyse va diminuer. Dans le test de stress mitochondrial (**figure 15B**), les drogues utilisées étaient l'oligomycine, le FCCP (*Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxy phenylhydrazone*) et la Rot/AA. Ces drogues agissent toutes sur différents complexes de la chaîne de transport d'électron. L'oligomycine inhibe le complexe V (ATP synthase) et réduit à son niveau basal, la consommation d'oxygène. En revanche, le FCCP va favoriser la consommation d'oxygène, en inhibant le flux de proton à travers la membrane mitochondriale. La cellule atteindra alors sa consommation d'oxygène maximale. La Rot/AA va par la suite diminuer le transport d'électron sans ramener la consommation d'oxygène à son niveau basal. Finalement, dans le test du taux d'ATP en temps réel (**figure 15C**), l'oligomycine et la Rot/AA ont été utilisés. Sachant que ces deux drogues régulent à la baisse la chaîne d'électron, d'un côté l'*ECAR* augmentera tandis que de l'autre, l'*OCR* diminuera.

Afin d'évaluer le métabolisme glycolytique, les cellules ont été divisées en trois groupes : le groupe sans activation (Ctrl), le groupe activé avec seulement de l'anti-CD3 et le groupe combo (activé avec anti-CD3 et anti-CD28). Si l'on fait une comparaison entre WT et KE, nous remarquons sur la **figure 15A** que le taux d'acidité extracellulaire du groupe WT est supérieur à celui du groupe KE. D'autre part, lors de l'analyse des courbes Ctrl, CD3 et Combo, nous voyons que ce taux d'acidité augmente avec le degré d'activation des cellules. En effet, le groupe contrôle semble avoir un taux d'acidité presque nul. Les cellules étant inactivées, ce résultat était attendu. Quant aux cellules activées avec de

l'anti-CD3, elles possèdent un *ECAR* plus élevé que celles inactivées. Néanmoins, leur *ECAR* est plus faible que celui des cellules activées avec l'anti-CD3 et l'anti-CD28 (combo). Selon la littérature, la voie du récepteur CD28 est intégrante du signal 2 qui participe à la pleine activation des cellules T. Ainsi, les cellules du groupe combo étant plus activées que celles du groupe CD3 utilisent plus la glycolyse que les deux autres groupes. Le même constat peut être fait pour la respiration mitochondriale (**figure 15B**) et la production d'ATP glycolytique ou mitochondriale (**figure 15C**). La mutation K56E semble réguler à la baisse la glycolyse, la respiration mitochondriale et la production d'ATP glycolytique et mitochondriale, après activation induite par anti-CD3 ou anti-CD3 et anti-CD28. Cette observation diffère d'autres altérations telles que la ligature de PD1 qui cible et inhibe la glycolyse[38].

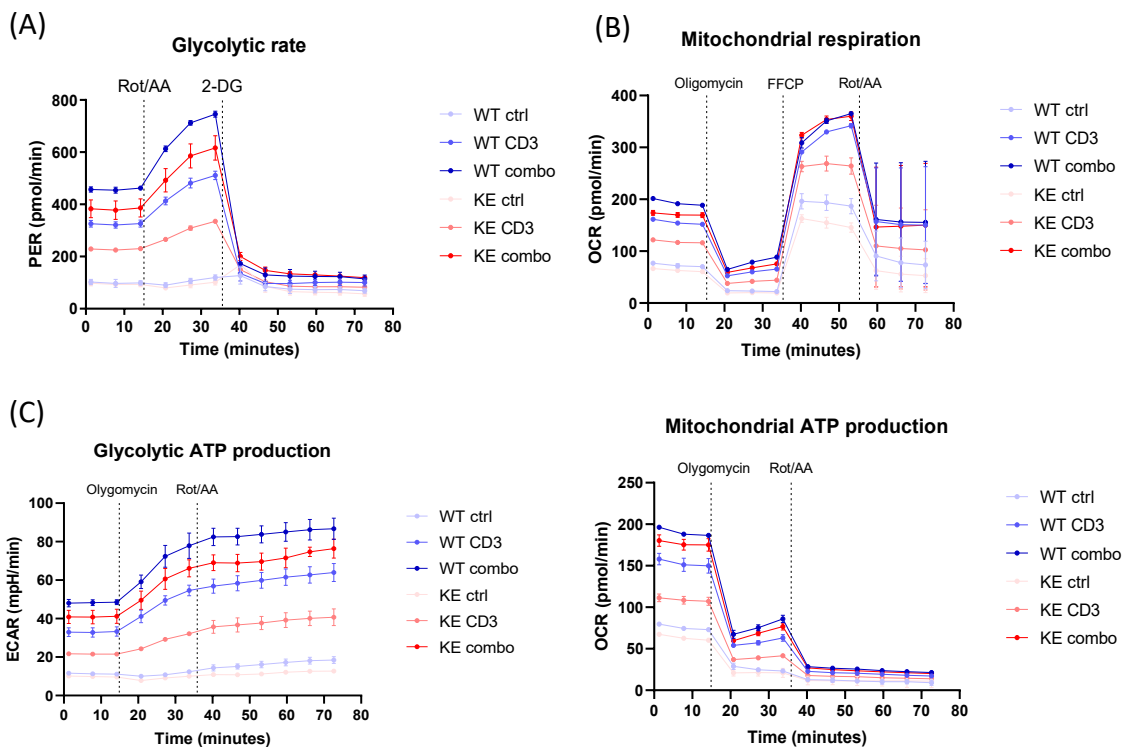


Figure 15. - Le métabolisme des cellules T est diminué par la mutation K56E de la protéine SLP-76. Les cellules T CD3⁺ des splénocytes WT et K56E ont été isolées et activées avec 1 µg d'anti-CD3 ou 1 µg d'anti-CD3 et d'anti CD28, pendant 24h à 1-2x10⁶ cellules/ml.

L'utilisation des kits de la compagnie Agilent a permis d'analyser l'effet de la mutation K56E sur les différents aspects du métabolisme cellulaire. (A) Observation de la glycolyse par mesure du taux d'acidité extracellulaire (ECAR). (B) Mesure de la respiration mitochondriale par le taux de consommation d'oxygène (OCR). (C) Mesure de la production d'ATP par la glycolyse et par la respiration mitochondriale. (n=3)

3.7 La force du signal du TCR affecte le métabolisme

Après avoir vérifié l'impact de la mutation K56E sur le métabolisme, il semblait intéressant de pousser un peu plus loin en intégrant l'impact de la force du signal. La **figure 16** est représentative des trois répétitions de cette expérience. En effet, contrairement à l'expérience précédente, les cellules ont été préparées en trois groupes : les cellules inactivées (Ctrl), celles activées avec le peptide OVA SIINFEKL (forte affinité) et celles activées avec le peptide OVA T4 (faible affinité). Des découvertes surprenantes ont été obtenues. Sur la **figure 16A**, il est possible de voir une différence marquée entre les groupes SIINFEKL et T4. Le groupe contrôle montre une glycolyse quasi nulle puisque les cellules sont inactives. Le groupe T4 semble moins utiliser la glycolyse que le groupe SIINFEKL. Pourtant la mutation ne semble pas affecter l'utilisation de la glycolyse dans les cellules activées par le peptide T4 ou SIINFEKL. Sur la **figure 16B**, le groupe contrôle a un métabolisme de glycolyse quasi nulle. Cette observation peut être faite dans tous les graphes de la **figure 16**. Ainsi, il ne serait pas présomptueux de dire que le groupe Ctrl n'a pas d'activité métabolique, quelle qu'elle soit, puisque les cellules sont inactivées. L'injection de glucose va augmenter la glycolyse donc l'acidification du milieu (**figure 16B**). Pourtant, il n'y a pas de différence apparente entre les OT1 et les KOT1 dans le groupe SIINFEKL. Constat effectué dans les trois répétitions de cette expérience. D'un autre côté, un écart semble se dessiner dans le groupe T4 entre les OT1 et KOT1 où les OT1 ont un métabolisme plus élevé. Après la deuxième injection, il semble y avoir une différence entre les OT1 et les KOT1 dans le groupe T4. En revanche, une légère différence semble être observée entre les groupes T4 et SIINFEKL. À la première comme à la deuxième

injection, le groupe SIINFEKL a un métabolisme plus élevé que le groupe T4. Cependant, à partir de l'injection de 2-DG, l'ECAR de tous les groupes diminue et se confond, ce qui était attendu. En termes de respiration mitochondriale, il y a une différence marquée entre les groupes SIINFEKL et T4 (**figure 16C**) à la deuxième injection. En outre, la mutation semble affecter la respiration mitochondriale seulement dans le groupe activé par le peptide T4, lorsque la cellule atteint sa respiration maximale. Néanmoins, à l'injection de FCCP, l'OCR est pratiquement identique entre les OT1 et KOT1 dans le groupe SIINFEKL et T4. Concernant la production d'ATP glycolytique (**figure 16D**), elle semble similaire pour les OT1 et KOT1 du groupe SIINFEKL. Pourtant, dans le groupe T4, les OT1 semblent utiliser la glycolyse plus que les KOT1. Encore une fois, la mutation ne semble pas avoir d'effet sur les cellules activées par le peptide SIINFEKL, mais sur les cellules activées par le T4. Quant à la production d'ATP mitochondriale (**figure 16D**), nous remarquons que le groupe T4 consomme moins d'oxygène que le groupe SIINFEKL, au niveau basal. Outre cette observation, il n'y a pas une différence apparente entre les OT1 et KOT1, que ce soit dans le groupe SIINFEKL ou T4. Ensemble, ces résultats suggèrent que la mutation K56E a plus d'impact sur le métabolisme en condition *ex vivo* (cellules activées avec des anticorps anti-CD3 /CD28) que dans des conditions plus physiologiques *in vitro* (cellules activées avec des peptides). Cette expérience a été répétée trois fois. Ces résultats suggèrent que le peptide de faible affinité interfère préférentiellement avec le métabolisme des cellules T.

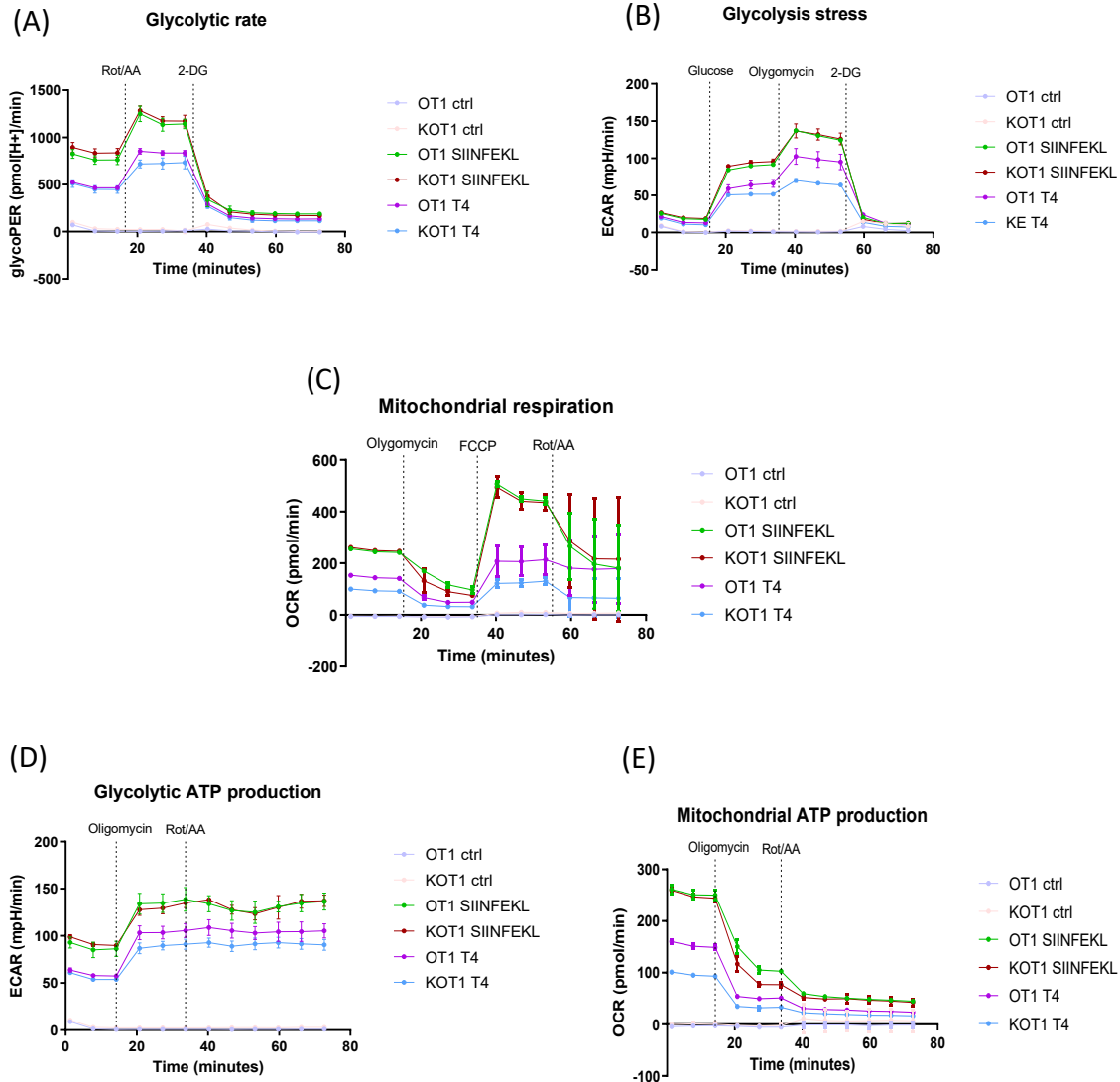


Figure 16. - Le métabolisme des cellules T transgénique est diminué par la mutation K563 de la protéine SLP-76. Les cellules T CD8⁺ des splénocytes OT1 et KOT1 ont été isolées et activées pendant 3 jours, avec 5 µg de peptides d'OVA à 1-2x10⁶ cellules/ml. L'utilisation des kits de la compagnie Agilent a permis d'analyser l'effet de la mutation K56E sur les différents aspects du métabolisme cellulaire. (A) Observation de la glycolyse par mesure du taux du flux de proton (PER) avec le kit Agilent. (B) Observation de la glycolyse par mesure du taux d'acidité extracellulaire (ECAR) avec le kit fait par notre laboratoire. (C) Mesure de la respiration mitochondriale par le taux de consommation d'oxygène. (D) Mesure de la production d'ATP par la glycolyse et par la respiration mitochondriale. (n=3)

Chapitre 4 - Discussion

Les cellules T font partie d'un sous-ensemble des cellules immunitaires de l'immunité adaptative. Elles ont un rôle de suppresseur et de régulateur de la réponse immunitaire, face aux attaques infectieuses et/ou tumorales. Leurs activations via leur TCR et la signalisation qui en découle sont les clés de leur potentiel destructeur et régulateur.

Alors que différentes protéines sont impliquées dans le processus de signalisation des cellules T, mon mémoire se concentrera sur le rôle de l'interaction entre SLP-76 et la protéine RanGAP1 en réponse à l'activation par antigène. SLP-76 est une protéine adaptatrice possédant un domaine SAM (*sterile- α motif*) N-terminal, des motifs tyrosine, un domaine riche en proline et un domaine SH2 (*Src homology 2*) C-terminal. Ces derniers sont nécessaires à la différenciation et à la fonction des cellules T[39]. Des études antérieures ont démontré que la phosphorylation des tyrosines de SLP-76 par ZAP-70 contribuait, de façon importante, à la pleine activation et la fonction des cellules T[40]. En effet, les cellules T déficientes en SLP-76 présentent une altération dans l'activation de la phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$), dans la mobilisation du calcium, dans l'activation de la protéine ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) et dans la réponse transcriptionnelle[41, 42].

L'importance de SLP-76 est d'autant plus soulignée par son rôle dans le thymus[43]. Des études ont montré que la déficience de cette protéine bloquait le développement thymique des lymphoïdes. En effet, ils ont constaté une absence de thymocytes doublement positifs ($\text{CD4}^+\text{CD8}^+$) qui ne pouvaient pas être restaurés par un traitement in vivo avec des anti-CD3. D'autre part, SLP-76 est également nécessaire en aval pour permettre l'activation des facteurs de transcription NFAT et NF κ B[42].

Précédemment, le laboratoire Rudd a montré que SLP-76 lié à la protéine RanGAP1 sumoylé avait une grande importance au niveau du CPN. Ce n'est que par cette interaction qu'il peut y avoir une entrée optimale des facteurs de transcription NFAT et NF κ B dans les cellules T[24]. Par microscopie électronique à transmission, ils ont montré

que la majorité des anticorps anti-SLP-76 se situait au niveau des CPN des cellules T activées par anti-CD3[24]. Ils ont aussi cartographié la liaison de RanGAP1 au résidu 56 à la position de la lysine dont la mutation empêche cette liaison et réduit la translocation des facteurs de transcription dans le noyau. Ce mémoire pose la question à savoir si la liaison entre SLP-76 et RanGAP1 est préférentiellement impliquée dans les réponses aux peptides à haute ou faible affinité. Un autre aspect qu'aborde ce mémoire est le rôle de SLP-76 dans le métabolisme des cellules T.

Mon mémoire a permis de définir le rôle de SLP-76 au niveau des fonctions intrinsèques de la cellule. En effet, nous avons observé que malgré la diminution du facteur de transcription menant à la prolifération, le pourcentage de cellules viables n'était pas affecté. Nous avons constaté que le nombre de cellules vivantes ne diminuait pas de façon significative avec la mutation. Or, l'affinité des peptides d'OVA pour le TCR semble diminuer ce pourcentage.

Tandis que nous avons utilisé les peptides SIINFEKL, Q4 et T4, une autre étude, a utilisé les peptides V4, S4, G4 et D7 (par ordre d'affinité décroissant)[44]. Notre fourchette de concentrations se situait entre 0.005 μM et 5 μM tandis qu'eux, ont utilisé les concentrations 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.001 $\mu\text{g/ml}$ et 0.00001 $\mu\text{g/ml}$ (μM et $\mu\text{g/ml}$ étant similaire pour les peptides d'OVA). Malgré ces différences de méthodologie, nous avons trouvé des résultats similaires aux leurs. Après 24h, plus l'affinité du peptide était faible plus le nombre de cellules vivantes décroissait. Après 48h, nous avons observé le même phénomène. Pour expliquer ces évènements, ils ont divisé la mort cellulaire en deux composantes : le taux de mort initiale et le taux de mort subséquent[44]. Nos résultats prouvent que la survie des cellules après 48h ne dépend pas de la mutation SLP-76 K56E, ni de la concentration du peptide, mais plutôt de l'affinité du peptide. Notre approche montre l'influence des paramètres concentrations et mutation sur la viabilité cellulaire. Il aurait été aussi intéressant de montrer comment le facteur temps influence la survie des cellules, ce qu'a montré le groupe de Mirja Hommel[44].

L'ovalbumine est une protéine, provenant du blanc d'œuf, qui a été très bien caractérisé et utilisé dans de nombreux modèles comme antigène. Dans la littérature, l'induction immunologique par l'antigène OVA peut se faire de différentes manières[45-51].

Activer des cellules T avec un antigène se rapproche plus d'un mécanisme physiologique qu'une activation avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Malgré une activation *in vitro*, il aurait été intéressant d'essayer de mimer encore plus des conditions physiologiques comme l'on fait le groupe de Thaddeus C. George[50] et le groupe de Leandro J. Carreno[52]. L'une des limites de notre méthode est qu'elle est peu semblable à la réalité du vivant. Incuber les cellules T avec des CPA présentant le peptide OVA, nous aurais permis d'observer le comportement des cellules dans des conditions plus physiologiques. Finalement, au niveau de la survie cellulaire, la mutation n'agit pas préférentiellement au peptide à forte affinité ou à faible affinité. Ce résultat était inattendu. Le transport du cytoplasme au noyau étant régulé à la baisse par la mutation, nous nous attendions à voir une diminution de la survie chez les KOT1. Il serait envisageable de dire que la mutation n'affecte pas directement les mécanismes de survie de la cellule, bien qu'elle ralentisse le transport de facteur de transcription.

Après avoir observé la viabilité cellulaire, nous avons procédé à une analyse de la prolifération des cellules OT1 et KOT1. Pour cela, nous avons activé les cellules pendant 48h en les marquant au préalable avec un marqueur de prolifération. Par la suite, nous avons procédé à l'analyse par cytométrie de flux. La mutation K56E diminue le transport de NFAT et NFκB selon l'étude du laboratoire Rudd. Ces derniers étant impliqués dans la prolifération cellulaire, les résultats obtenus étaient attendus. Nous avons pu constater que la mutation K56E diminuait la prolifération des cellules T sans influence de la concentration ou de l'affinité du peptide. Grâce au logiciel *FlowJo*, nous avons pu intégrer à nos résultats, l'indice de prolifération (IP). L'IP nous donne une information supplémentaire sur la capacité proliférative de la cellule T[53]. Ce dernier appuie notre propos, car il montre que les cellules OT1 répondent mieux à l'activation, en termes de prolifération. Ainsi, cela confirme que la mutation réduit la capacité proliférative des cellules T suite à leur activation. Pourtant, la viabilité des cellules OT1 et KOT1 *in vitro* est

similaire. Ce constat a été quelque peu surprenant. Les cellules KOT1 sont aussi viables que les OT1, mais se divisent moins que ces dernières. Une hypothèse serait que la mutation accélère le processus de sénescence, ainsi, bien que les cellules soient viables, elles ne se diviseraient pas. De plus, nous avons remarqué que plus l'affinité et la concentration de peptide sont faibles, meilleure est la prolifération. Or, la plus faible viabilité est celle des cellules activées avec le peptide de faible affinité T4. Ce résultat a été très surprenant et inattendu. Mon hypothèse est qu'avec le peptide à faible affinité, bien que les cellules ne soient pas activées suffisamment pour rester en vie, le peu de cellules activées l'est suffisamment pour proliférer. En poussant la réflexion, on pourrait se demander si la mutation K56E SLP-76 n'agirait pas sur le temps de division des cellules. Une étude faite *in vivo* a aussi montré que les cellules T, provenant des ganglions lymphatiques, activés avec un peptide OVA de faible affinité, proliféraient plus que celles activées avec un peptide de haute affinité[54]. Pourtant, le pourcentage de cellules non divisées était plus grand chez les cellules T, activées avec le peptide de faible affinité. Ils ont émis une hypothèse intéressante. Selon eux, il y aurait une fenêtre critique de force du signal au TCR permettant de maintenir les fonctions intrinsèques de la cellule, sans effet antitumoral. Ces résultats sont en accord avec les nôtres puisque la cytotoxicité des cellules activées avec un peptide OVA de faible affinité est diminuée par rapport à celle de cellules activées avec un peptide de forte affinité. Les résultats *in vitro* du groupe du Dr Labrecque et du groupe du Dr Sanchèz ont aussi montré qu'il y avait une fenêtre de faibles concentrations de peptides OVA, auxquelles il y avait un pic de prolifération[55, 56]. Sortie de cette fenêtre, la prolifération diminuait. L'explication du groupe du Dr Sanchèz pourrait aussi nous aider à expliquer nos résultats. Dans leur étude, ils ont activé les cellules T avec des macrophages préalablement incubés avec différentes concentrations de peptides OVA. Seuls les macrophages exposés avec une faible concentration de peptides ont pu induire la prolifération des cellules T. Ils ont montré que la prolifération des cellules T est dépendante de l'activation des macrophages[56]. Basé sur cette étude, il serait possible d'expliquer les résultats obtenus dans ce mémoire. En effet, l'accroissement de la prolifération avec de faibles concentrations de peptides

d'OVA, pourrait être dû à la présence de CPA dans le milieu, qui aurait une meilleure capacité d'activation. Finalement, ces résultats suggèrent que la force du signal ainsi que l'affinité du peptide, au niveau du TCR, influe grandement sur les fonctions intrinsèques des cellules T.

D'autre part, il aurait été intéressant de poursuivre ses recherches afin de savoir le temps de liaison entre le peptide et le récepteur, mais aussi le nombre de fois qu'il y a contact entre les deux. Cela nous aurait permis d'avoir une autre perspective du rôle de l'affinité du peptide.

Par la suite, nous avons voulu identifier l'effet de la mutation sur les fonctions effectrices des cellules T. Toujours après 48 heures d'activation avec différents peptides (SIINFEKL, Q4 et T4), les cellules ont été marquées avec différents anticorps couplés avec différents fluorophores. Les résultats ont montré que la population de cellules OT1 et KOT1 exprimant la cytokine IFN γ était dépendante de l'affinité du peptide et de sa concentration.

Une autre étude a démontré le même résultat. Dans cette étude, des souris de type sauvage ont subi un transfert adoptif de cellules OT-1 après avoir été inoculées avec un immunostimulant. Suite à cette inoculation, les splénocytes ont été isolés et stimulés *ex vivo* avec des peptides à affinité différente. Tout comme moi, ils ont analysé le pourcentage de cellules exprimant IFN γ . Bien que les cellules OT-1 n'aient pas été activées *in vitro* directement, plus l'affinité du peptide était faible plus le pourcentage de cellules exprimant IFN γ diminuait[57]. Il aurait été intéressant de faire une activation de cellules OT1 et KOT1 *in vivo*, avec différents peptides et d'en analyser les splénocytes. Une autre étude, à la méthodologie plus proche de la mienne, a aussi montré des résultats similaires. Après avoir incubé des cellules péritonéales avec le peptide OVA, ces dernières ont été mises en contact avec les OT-1 pendant 24h. La quantité d'IFN γ en ng/ml a été mesurée et ils ont observé une corrélation positive entre la production d'IFN γ et la concentration de peptide OVA[46]. Cette étude ne se concentre que sur la quantité d'IFN γ produite et non sur le nombre de cellules en produisant. Malgré cette différence, il serait

possible de dire que la concentration du peptide OVA impacte le pourcentage de cellule T produisant de l'IFN γ , mais aussi sa production. Plusieurs autres études ont montré une corrélation positive entre l'affinité des peptides d'OVA, leur concentration et la production d'IFN γ ou de cellules en produisant[58-64]. Cette observation est constante malgré les différentes méthodes d'activation. Ces résultats suggèrent que pour une activation complète des fonctions effectrices, les cellules T ont besoin d'un signal suffisamment puissant. Pourtant, plus l'affinité et la concentration sont faibles, plus les cellules T prolifèrent. Ces résultats suggèrent qu'il y a une concentration et affinité optimale différente pour une meilleure prolifération ou activation complète des fonctions effectrices des cellules T.

En faisant l'évaluation de la réponse de l'IFN γ , nous avons remarqué une tendance dans l'effet de la mutation qui était plus important en réponse à SIINFEKL que le peptide Q4 (affinité intermédiaire) et T4 (affinité faible). Systématiquement, les cellules KOT1 démontraient une réponse plus faible après activation au SIINFEKL. Cela avait plus tendance à être observé à de faibles concentrations de peptide SIINFEKL (soit 0.05 μ M) et non aux concentrations élevées (soit 0.5 μ M et 5 μ M). Malgré de légères variations entre les expériences, cette tendance était générale. Ces résultats suggèrent que l'effet inhibiteur de K56E peut être corrigé lorsque les récepteurs de surface sont plus occupés à cause des concentrations élevées de peptide. Donc, nous pouvons supposer que cet effet est dû au titrage de peptides et non spécifiquement à la force du signal, lui-même. Notre hypothèse est que si la force du signal primait sur les concentrations, nous aurions observé une différence significative entre les OT1 et les KOT1, avec le peptide SIINFEKL, à toutes les concentrations. Ce qui n'est pas le cas, ici. L'impact de K56E sur les cellules T activées par Q4 et T4 s'est observé sur des souris plus jeunes. En effet, alors que chez des souris plus âgées, la concentration élevée de peptide corrige l'effet de la mutation, il en est autrement chez les souris plus jeunes. Aux concentrations 0.5 μ M et 5 μ M, nous avons observé une diminution du pourcentage de cellules KOT1 IFN γ ⁺. Ainsi, chez les jeunes souris, malgré l'augmentation de la concentration de peptides, l'effet de K56E reste dominant. Ces résultats suggèrent que la mutation agit préférentiellement sur les cellules

KOT1 plus jeunes en réduisant leurs fonctions effectrices. Selon la littérature, la force du signal au TCR est un élément décisif dans l'activation et la différenciation des cellules T et donc dans l'immunothérapie[54]. Bien que le modèle de force du signal ne soit pas en tous points compris, il suggère que l'activité des cellules T dépend de l'affinité du ligand au TCR[65]. Lorsque nous avons comparé les peptides de différentes affinités, nous avons pu constater que la force du signal influençait le pourcentage de la population produisant de l'IFN γ . Il y a donc, une corrélation positive entre l'affinité du peptide et la production d'IFN γ . Cette observation suggère qu'indépendamment de la mutation, la production d'IFN γ suit le modèle de force du signal au TCR. De plus, la réponse IFN γ est importante à soulever étant donné le rôle crucial de cette cytokine dans les fonctions immunitaires, telle que la destruction des cellules tumorales. Nous avons également évalué l'effet de l'affinité des peptides, ainsi que celui de la mutation sur la production de granzyme B. Les résultats ont été volontairement omis, car ils étaient très divergents et ne permettaient pas d'établir une conclusion. Cependant, basé sur les résultats de la production d'IFN γ et de la cytotoxicité des cellules, nous nous attendrions à une augmentation de la production de Granzyme B suivant l'affinité du peptide. Deux études confrontent cette hypothèse, l'une la confirmant[63], tandis que l'autre la réfute[57]. Cette divergence au niveau de la littérature rend d'autant plus l'analyse des résultats. Néanmoins, une corrélation positive entre l'affinité du peptide et la production de granzyme B pourrait expliquer la corrélation entre la cytotoxicité des cellules T et l'affinité du peptide. De même, l'analyse de perforine aurait été pertinente afin de vérifier s'il y avait une corrélation avec la cytotoxicité des cellules T.

Fait intéressant, la mutation K56E ne semble pas affecter, de manière constante, le pourcentage de cellules exprimant PD-1. De même, l'expression en surface de PD1 ne semble pas être affectée (résultats non montrés). Ce résultat est surprenant puisque nous nous attendions à une augmentation du pourcentage de cellules exprimant PD1 chez les cellules KOT1 par rapport aux cellules OT1. Pourtant, malgré une différence de pourcentage entre les expériences, une légère tendance a été observée dans cette population suivant l'affinité du peptide. Ces résultats suggèrent que la mutation K56E ne

contrôle pas l'expression de PD1, que les souris soient jeunes ou âgées. Nous avons aussi analysé le pourcentage de la population des cellules T exprimant CD69 à la surface (**annexe 1**). Il a été possible d'observer que cette population ne dépendait ni de l'affinité du peptide ni de la mutation. Il y avait une augmentation de la population exprimant CD69, en fonction de la concentration du peptide, seulement chez les cellules T activées par OVA-SIINFEKL. Ce résultat était surprenant. En effet, selon la littérature, non seulement la population exprimant CD69 varie en fonction de l'affinité du peptide, mais aussi son expression à la surface des cellules T[45, 60, 66].

En revanche, l'effet sur le récepteur de l'IL-2, CD25 et le point de contrôle CTLA-4 est bien plus évident à chaque peptide. Finalement, ces données suggèrent que K56E régule différemment les différents points de contrôle des lymphocytes T. Dans une étude faite *in vivo*, les données sur PD-1 montraient une corrélation positive, statistiquement significative entre les peptides de différentes affinités[54]. Ce qui vient confronter nos résultats. À contrario, plusieurs études ont conforté nos résultats sur CD25 et CTLA-4. En effet, ces études ont montré que le pourcentage de cellules exprimant CD25 et CTLA-4 dépend non seulement de l'affinité du peptide, mais aussi de sa concentration[50, 56, 60, 62, 67]. Peu de recherches sont faites sur l'impact de la force d'activation du TCR sur les différents points de contrôle immunologique. Cela laisse place à un nouveau champ de recherches ouvert par notre étude. Néanmoins, les résultats de ce mémoire suggèrent que les marqueurs tels que IFN γ , CTLA-4, CD25 et PD-1 suivent le modèle de force du signal au TCR. Plus haute est l'affinité, plus grande est la population exprimant ces marqueurs.

L'aspect intéressant de mon travail était de connaître les effets de la mutation K56E sur les différentes fonctions de la cellule. L'un des effets importants de cette mutation était la diminution de la fonction cytotoxique de la cellule T. Les peptides à différentes affinités ont montré des dissimilitudes dans leur capacité à induire des lymphocytes T cytotoxiques. Néanmoins, une corrélation positive se définit entre l'affinité du peptide et ces fonctions cytotoxiques. Nous avons pu observer que le ratio *effector* : *target* contribuait à l'effet de K56E. Aux ratios 5 : 1, l'effet inhibiteur de K56E est statistiquement significatif avec

presque tous les peptides d'OVA. Cette différence est plus évidente avec SIINFEKL. Avec le peptide T4, de faible d'affinité, la mutation semble ne pas réduire la cytotoxicité des cellules T. En revanche, l'effet inhibiteur de K56E était retrouvé seulement avec les peptides de forte et moyenne affinité, SIINFEKL et Q4 au ratio 10 : 1. Étonnement, K56E renverse la tendance en augmentant la capacité cytotoxique des KOT1 au ratio 10 : 1. L'augmentation du ratio semble couvrir petit à petit l'effet de la mutation pour SIINFEKL et Q4. Ces résultats suggèrent que K56E diminue le potentiel cytolytique des cellules T préférentiellement avec SIINFEKL à un ratio faible. En revanche, avec le peptide T4, l'augmentation du ratio augmente significativement le potentiel cytotoxique de la cellule T. Nous ne pouvons pas expliquer ces résultats cependant nos données soutiennent l'idée que K56E est davantage impliquée dans la réponse avec les peptides à forte affinité et moyenne affinité. Une autre étude où les cellules T ont été activées aussi pendant deux jours avec les peptides SIINFEKL (N4) et T4 et maintenu quatre jours avec de l'IL-2 ont montré des résultats similaires. En effet, eux aussi ont observé une réponse cytolytique diminuée avec le peptide à faible affinité. D'autre part, à de faibles ratios E : T, les cellules activées avec T4 semblent aussi avoir des fonctions cytotoxiques similaires à celles de SIINFEKL (N4). En revanche, avec un peptide à plus faible affinité (V4) la réponse cytolytique est diminuée de manière bien plus évidente par rapport au N4[61]. Ces résultats soutiennent les nôtres, en montrant cette corrélation positive entre l'affinité du peptide et la capacité cytolytique des cellules T. D'autres études montrent aussi cette même corrélation[68, 69].

L'un des effets les plus impressionnants de la mutation K56E était sur la glycolyse, un processus important pour l'activation des cellules T. Cette régulation à la baisse de la glycolyse pourrait être la cause de certains effets inhibiteurs liés à la fonction cytotoxique de la cellule, par exemple. Après avoir été activé, avec de l'anti-CD3 ou le combo (anti-CD3 + anti-CD28), les cellules T de type sauvage ont montré un métabolisme plus actif que les cellules K56E. En effet, le taux glycolytique ainsi que la production d'ATP via la glycolyse sont plus élevés chez les cellules WT que chez les cellules K56E. Cela suggère que la mutation agit préférentiellement sur le processus de la glycolyse. En revanche, la

mutation ne semble pas affecter le processus métabolique mitochondrial. Le niveau basal de la glycolyse ainsi que la compensation glycolytique et la production glycolytique d'ATP semblent être affectées par la mutation. L'induction de la respiration maximale par le FCCP couvre les effets de la mutation pour les cellules WT et K56E activées avec le combo. Cependant, cet effet couvrant du FCCP, est plus faible chez les cellules WT et K56E activées seulement de l'anti-CD3. Aussi, au niveau de la production d'ATP mitochondriale, la mutation n'a d'effet que sur la production basale d'ATP des cellules WT et K56E activées avec de l'anti-CD3. Ces résultats montrent que le métabolisme mitochondrial est sensible au degré d'activation de la cellule. De plus, la mutation K56E ne semble agir sur le métabolisme de la mitochondrie que lorsque la cellule est stimulée avec de l'anti-CD3. Cela suggère aussi que l'impact de la mutation est dépendant de CD28 en ce qui concerne la mitochondrie.

Pour aller plus loin, nous avons utilisé des cellules OT1 activées avec les peptides d'OVA, SIINFEKL et T4. Nous cherchions à observer les effets de la force du signal sur le métabolisme de cellules transgéniques reconnaissant spécifiquement les peptides de l'ovalbumine. Au niveau de la glycolyse, deux expériences sur trois ont montré une réduction de métabolisme dû à l'activation au T4, peptide de faible affinité. Cette tendance avait aussi été observée avec l'activation à l'anti-CD3 et l'anti-CD28. En revanche, le taux glycolytique des cellules KOT1 semble ne pas être affecté par la mutation, mais seulement par la force du signal. Une tendance s'est aussi observée au niveau du test du stress de la glycolyse où il y a eu une réduction du métabolisme glycolytique entre les OT1 et les KOT1 activées avec T4. Pareillement, deux expériences sur trois ont montré une réduction du métabolisme mitochondrial avec l'activation au T4. L'effet de K56E sur n'a pu être observé que sur les groupes de cellules activées avec T4 après l'ajout de FCCP. Les résultats sur la production d'ATP mitochondriale et glycolytique sont moins concluants. Finalement, ces résultats suggèrent que la force du signal au niveau du TCR peut influencer le métabolisme de la cellule OT1 indépendamment de la mutation et que pour certains processus, la mutation agit préférentiellement sur un signal faible dans les cellules transgéniques.

Une autre observation très intéressante était que les cellules T WT comparées aux cellules T OT-1 avaient un métabolisme glycolytique plus important. À contrario, les cellules T OT-1 avaient un métabolisme mitochondrial plus élevé que celui des cellules WT. Les résultats d'une étude sur l'effet de l'âge des souris sur l'immunité antitumorale ont démontré que les souris OT-1 plus âgées sont moins sensibles à l'antigène spécifique OVA. Ainsi, leur métabolisme s'en trouvait diminué[47]. Nous avons observé ce phénomène avec la production d'IFN γ . Elle était plus élevée chez les souris de moins de 10 semaines. Ceci révèle que si les fonctions antitumorales sont affectées alors hypothétiquement le métabolisme aussi. Il aurait été donc intéressant de comparer l'effet de K56E sur le métabolisme sur des souris jeunes versus des souris âgées. D'autre part, les fonctions mitochondriales augmentaient avec le nombre de jours d'activation *in vitro*[70]. Des études plus approfondies sur ce point permettraient de connaître l'effet de la mutation dans le temps et de déterminer la fourchette dans laquelle l'effet serait maximal.

Nous avons aussi observé une différence entre le métabolisme des cellules de type sauvage et les cellules mutantes. En effet, l'analyse de seahorse comparant les cellules WT et K56E, a été faite après 24h d'activation. Or, celle comparant les cellules OT1 et KOT1 a été faite après 72h. Après 24h d'activation, nous avons pu voir une différence marquée entre le métabolisme des WT et K56E. En revanche, après 72h d'activation cette différence est moins perceptible. Il serait intéressant de pousser l'étude dans ce sens, car ce résultat est étonnant. En effet, cette différence de métabolisme pourrait prendre son origine dans le nombre de jours d'activations ou encore la façon dont ont été activées les cellules. De plus, le défi serait de savoir ce qui influence quoi en premier. Est-ce l'activation qui influence le métabolisme ou un métabolisme endommagé qui influence l'activation de la cellule? La question reste en suspens et ouvre à la réflexion. Une hypothèse serait que cette différence proviendrait de l'environnement dans lequel se trouvent les cellules après 24h puis après 72h. Par exemple, le pourcentage de cellules mortes ou de CPA pourrait éventuellement influencer ou biaiser les résultats de seahorse.

Rappelons-nous que la protéine SLP-76 joue un rôle dans le développement des thymocytes et que sa délétion provoque une lymphopénie[27, 30]. À travers les différents

stades du développement thymique, la cellule T passe par de multiples réarrangements métaboliques. Notre étude était focalisée sur les LT CD8⁺, cependant étudier l'impact de la mutation K56E sur les différents stades du développement de la cellule T permettrait de mieux comprendre l'effet de la mutation, lors des différents réarrangements métaboliques.

Chapitre 5 – Conclusion

Jusqu'ici, peu d'études ont été faites sur la mutation de SLP-76 K56E. Cela en fait un sujet de choix puisque cette protéine est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette, la mobilisation du calcium, l'activation et la translocation de facteurs de transcription, dont NFAT et NFκB[4, 20, 21]. Son rôle s'étend jusqu'à la maturation des thymocytes[26]. Dans ce mémoire, nous avons montré la portée de l'impact de cette mutation. Bien qu'au niveau de la viabilité, l'effet inhibiteur de la mutation soit très faible, voire inexistant, il en est autrement au niveau de la prolifération. Nos études ont montré que la mutation K56E réduisait les capacités de la cellule en termes de prolifération, de production de cytokines, d'expression de récepteurs de surface, de cytotoxicité et de métabolisme. D'autre part, nous avons pu constater que l'effet de cette mutation était conditionné par l'âge des souris, mais aussi à la force du signal du TCR. En effet, sur divers processus tels que la production de cytokine ou encore la glycolyse, les cellules T mutantes ou non, étaient beaucoup plus affectées par la force du signal au TCR que par la mutation. Finalement, nos résultats se sont limités à des tests *in vitro*. Cela ouvre la voie à d'autres expériences plus approfondies *in vitro*, mais aussi *in vivo*. Ainsi, en connaissant les effets de cette mutation sur les cellules tumorales, il serait possible de déterminer si nos recherches seront applicables du point de vue clinique.

Chapitre 6 – Perspectives

Jusqu'à présent, très peu d'études sont faites sur la mutation SLP-76 K56E. Cela permet d'avoir le loisir d'explorer un nouveau champ de recherche. De même, les études faites sur l'effet de l'affinité des ligands au TCR, sur les points de contrôles immunologiques, sont peu nombreuses.

En effet, la mutation joue un rôle au niveau du NPC, mais aussi au niveau du développement thymique. Ce mémoire n'est qu'un petit pas vers ce champ méconnu. Il serait donc pertinent de continuer plus loin les recherches. D'une part, il serait intéressant de voir si d'autres facteurs de transcription, autre que NFAT ou NF κ B, sont impactés par cette mutation. Si tel est le cas, quelles en seraient les conséquences sur les propriétés des cellules T CD8⁺ ? Quant au développement thymique, des analyses plus poussées, sur l'effet de K56E, au niveau des différentes étapes du développement, pourraient nous donner plus de renseignements sur la spécificité de l'effet de cette mutation.

Pareillement, nos études pourraient être couplées avec des études enzymatiques. En effet, elles permettraient de mesurer le temps de liaison de différents peptides au TCR et nous informeraient davantage sur la raison pour laquelle avec un peptide de faibles affinités engendrent plus de prolifération qu'un peptide à haute affinité.

Au niveau métabolique, il serait pertinent de tester les effets de la mutation et/ou de l'affinité des peptides OVA dans le temps (après un, deux, trois jours par exemple).

Pour finir, ce mémoire s'est spécifiquement concentré sur l'analyse des LT CD8⁺ *in vitro*, cependant il serait excitant de connaître la portée de cette mutation sur les différents types de cellulaires immunitaires et dans des conditions plus physiologiques.

Références bibliographiques

1. Chaplin DD: **Overview of the immune response.** *J Allergy Clin Immunol* 2010, **125**(2 Suppl 2):S3-S23.
2. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL: **An introduction to immunology and immunopathology.** *Allergy Asthma Clin Immunol* 2018, **14**(Suppl 2):49.
3. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL: **An introduction to immunology and immunopathology.** *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2018, **14**(2):49.
4. Yatim KM, Lakkis FG: **A brief journey through the immune system.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2015, **10**(7):1274-1281.
5. Li Y, Li K, Zhu L, Li B, Zong D, Cai P, Jiang C, Du P, Lin J, Qu K: **Development of double-positive thymocytes at single-cell resolution.** *Genome Medicine* 2021, **13**(1):49.
6. Tai Y, Wang Q, Korner H, Zhang L, Wei W: **Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases.** *Front Pharmacol* 2018, **9**:642.
7. Sckisel GD, Bouchlaka MN, Monjazeb AM, Crittenden M, Curti BD, Wilkins DE, Alderson KA, Sungur CM, Ames E, Mirsoian A *et al*: **Out-of-Sequence Signal 3 Paralyzes Primary CD4(+) T-Cell-Dependent Immunity.** *Immunity* 2015, **43**(2):240-250.
8. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC: **Cytotoxic T cells.** *J Invest Dermatol* 2006, **126**(1):32-41.
9. Shah K, Al-Haidari A, Sun J, Kazi JU: **T cell receptor (TCR) signaling in health and disease.** *Signal Transduct Target Ther* 2021, **6**(1):412.
10. Rudd CE, Trevillyan JM, Dasgupta JD, Wong LL, Schlossman SF: **The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**(14):5190-5194.
11. Rudd CE: **How the Discovery of the CD4/CD8-p56(lck) Complexes Changed Immunology and Immunotherapy.** *Front Cell Dev Biol* 2021, **9**:626095.
12. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS: **T cell activation.** *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:591-619.
13. Cantrell DA: **T-cell antigen receptor signal transduction.** *Immunology* 2002, **105**(4):369-374.
14. Navas VH, Cucho C, Alcover A, Di Bartolo V: **Serine Phosphorylation of SLP76 Is Dispensable for T Cell Development but Modulates Helper T Cell Function.** *PLoS One* 2017, **12**(1):e0170396.
15. Kumar L, Pivniouk V, de la Fuente MA, Laouini D, Geha RS: **Differential role of SLP-76 domains in T cell development and function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(2):884-889.
16. Kim CA, Bowie JU: **SAM domains: uniform structure, diversity of function.** *Trends Biochem Sci* 2003, **28**(12):625-628.
17. Knight MJ, Leettola C, Gingery M, Li H, Bowie JU: **A human sterile alpha motif domain polymerizome.** *Protein Sci* 2011, **20**(10):1697-1706.
18. Grucza RA, Bradshaw JM, Fütterer K, Waksman G: **SH2 domains: From structure to energetics, a dual approach to the study of structure–function relationships.** *Medicinal Research Reviews* 1999, **19**(4):273-293.
19. Bounab Y, Hesse AM, Iannascoli B, Grieco L, Couté Y, Niarakis A, Roncagalli R, Lie E, Lam KP, Demangel C *et al*: **Proteomic analysis of the SH2 domain-containing leukocyte**

- protein of 76 kDa (SLP76) interactome in resting and activated primary mast cells [corrected].** *Mol Cell Proteomics* 2013, **12**(10):2874-2889.
20. Raab M, Wang H, Lu Y, Smith X, Wu Z, Strebhardt K, Ladbury JE, Rudd CE: **T cell receptor "inside-out" pathway via signaling module SKAP1-RapL regulates T cell motility and interactions in lymph nodes.** *Immunity* 2010, **32**(4):541-556.
 21. Raab M, Smith X, Matthes Y, Strebhardt K, Rudd CE: **SKAP1 protein PH domain determines RapL membrane localization and Rap1 protein complex formation for T cell receptor (TCR) activation of LFA-1.** *J Biol Chem* 2011, **286**(34):29663-29670.
 22. Hogan PG: **Calcium-NFAT transcriptional signalling in T cell activation and T cell exhaustion.** *Cell Calcium* 2017, **63**:66-69.
 23. Ghosh S, Karin M: **Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle.** *Cell* 2002, **109**(2, Supplement 1):S81-S96.
 24. Liu H, Schneider H, Recino A, Richardson C, Goldberg MW, Rudd CE: **The Immune Adaptor SLP-76 Binds to SUMO-RANGAP1 at Nuclear Pore Complex Filaments to Regulate Nuclear Import of Transcription Factors in T Cells.** *Mol Cell* 2015, **59**(5):840-849.
 25. Tu TH, Hulea L, Rudd CE: **A novel SLP-76 signaling pathway T-cells that controls cancer immunotherapy.** *The Journal of Immunology* 2021, **206**(1 Supplement):25.03.
 26. Aifantis I, Pivniouk VI, Gärtner F, Feinberg J, Swat W, Alt FW, von Boehmer H, Geha RS: **Allelic exclusion of the T cell receptor beta locus requires the SH2 domain-containing leukocyte protein (SLP)-76 adaptor protein.** *J Exp Med* 1999, **190**(8):1093-1102.
 27. Shen S, Lau J, Zhu M, Zou J, Fuller D, Li QJ, Zhang W: **The importance of Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kilodaltons sterile-alpha motif domain in thymic selection and T-cell activation.** *Blood* 2009, **114**(1):74-84.
 28. Burns JC, Corbo E, Degen J, Gohil M, Anterasian C, Schraven B, Koretzky GA, Kliche S, Jordan MS: **The SLP-76 Src homology 2 domain is required for T cell development and activation.** *J Immunol* 2011, **187**(9):4459-4466.
 29. Clements JL, Yang B, Ross-Barta SE, Eliason SL, Hrstka RF, Williamson RA, Koretzky GA: **Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development.** *Science* 1998, **281**(5375):416-419.
 30. Maltzman JS, Kovoov L, Clements JL, Koretzky GA: **Conditional deletion reveals a cell-autonomous requirement of SLP-76 for thymocyte selection.** *J Exp Med* 2005, **202**(7):893-900.
 31. Sun LZ, Elsayed S, Aasen TB, Van Do T, Aardal NP, Florvaag E, Vaali K: **Comparison between ovalbumin and ovalbumin peptide 323-339 responses in allergic mice: humoral and cellular aspects.** *Scand J Immunol* 2010, **71**(5):329-335.
 32. Chua XY, Salomon A: **Ovalbumin antigen-specific activation of T cell receptor closely resembles soluble antibody stimulation as revealed by BOOST phosphotyrosine proteomics.** *bioRxiv* 2021:2021.2003.2025.436968.
 33. Zehn D, Lee SY, Bevan MJ: **Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen.** *Nature* 2009, **458**(7235):211-214.
 34. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A *et al*: **Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation.** *Cytometry* 1997, **27**(1):71-76.
 35. Rangel Rivera GO, Knochelmann HM, Dwyer CJ, Smith AS, Wyatt MM, Rivera-Reyes AM, Thaxton JE, Paulos CM: **Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy.** *Frontiers in Immunology* 2021, **12**.

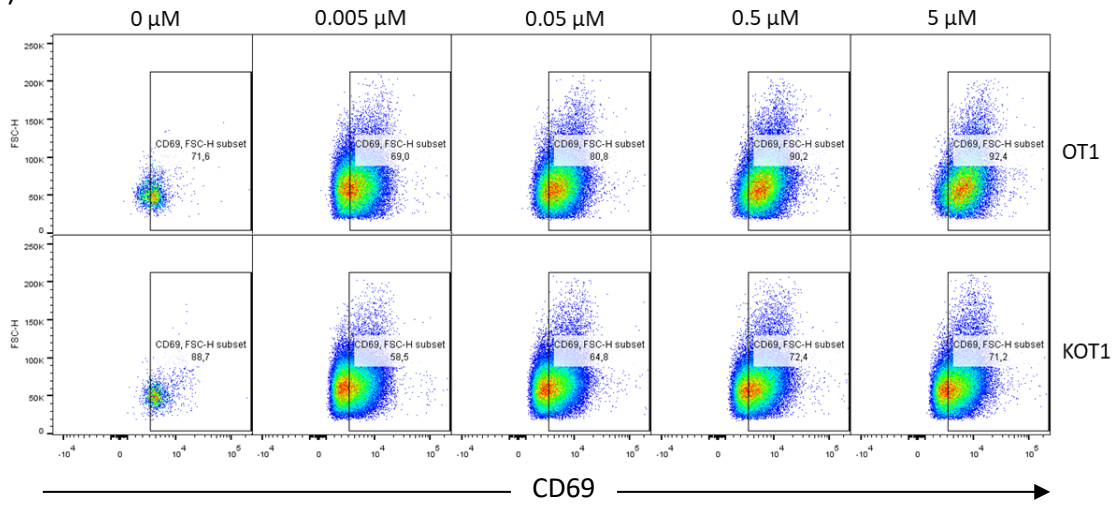
36. Finlay D, Cantrell DA: **Metabolism, migration and memory in cytotoxic T cells.** *Nat Rev Immunol* 2011, **11**(2):109-117.
37. Gupta SS, Wang J, Chen M: **Metabolic Reprogramming in CD8+ T Cells During Acute Viral Infections.** *Frontiers in Immunology* 2020, **11**.
38. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, Karoly ED, Freeman GJ, Petkova V, Seth P *et al*: **PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation.** *Nature Communications* 2015, **6**(1):6692.
39. Jackman JK, Motto DG, Sun Q, Tanemoto M, Turck CW, Peltz GA, Koretzky GA, Findell PR: **Molecular Cloning of SLP-76, a 76-kDa Tyrosine Phosphoprotein Associated with Grb2 in T Cells (*).** *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**(13):7029-7032.
40. Bubeck Wardenburg J, Fu C, Jackman JK, Flotow H, Wilkinson SE, Williams DH, Johnson R, Kong G, Chan AC, Findell PR: **Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function.** *J Biol Chem* 1996, **271**(33):19641-19644.
41. Yablonski D, Kadlecsek T, Weiss A: **Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(13):4208-4218.
42. Yablonski D, Kuhne MR, Kadlecsek T, Weiss A: **Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC-gamma1 in an SLP-76-deficient T cell.** *Science* 1998, **281**(5375):413-416.
43. Pivniouk V, Tsitsikov E, Swinton P, Rathbun G, Alt FW, Geha RS: **Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76.** *Cell* 1998, **94**(2):229-238.
44. Hommel M, Hodgkin PD: **TCR Affinity Promotes CD8+ T Cell Expansion by Regulating Survival1.** *The Journal of Immunology* 2007, **179**(4):2250-2260.
45. Khanom US, Ohigashi I, Fujimori S, Kondo K, Takada K, Takahama Y: **TCR Affinity for In Vivo Peptide-Induced Thymic Positive Selection Fine-Tunes TCR Responsiveness of Peripheral CD8(+) T Cells.** *J Immunol* 2019, **203**(4):881-887.
46. Kezuka T, Streilein JW: **In vitro generation of regulatory CD8+ T cells similar to those found in mice with anterior chamber-associated immune deviation.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**(7):1803-1811.
47. Nakajima Y, Chamoto K, Oura T, Honjo T: **Critical role of the CD44(low)CD62L(low) CD8(+) T cell subset in restoring antitumor immunity in aged mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021, **118**(23).
48. Salaman MR, Britton S: **Antibody response to a protein antigen (ovalbumin) in dissociated spleen cell cultures from primed mice. Evidence for a suppressive effect of antigen.** *Immunology* 1973, **24**(1):55-65.
49. Yoshida H, Yoshida O, Iwamoto H, Nishino K, Hashida M, Fukushima A, Ueno H: **Analysis of effects of stimulation in vitro of ovalbumin primed lymph node cells on adoptive transfer of experimental immune mediated blepharoconjunctivitis in Lewis rats.** *Br J Ophthalmol* 1998, **82**(10):1189-1194.
50. George TC, Bilsborough J, Viney JL, Norment AM: **High antigen dose and activated dendritic cells enable Th cells to escape regulatory T cell-mediated suppression in vitro.** *Eur J Immunol* 2003, **33**(2):502-511.
51. Chua XY, Salomon A: **Ovalbumin Antigen-Specific Activation of Human T Cell Receptor Closely Resembles Soluble Antibody Stimulation as Revealed by BOOST Phosphotyrosine Proteomics.** *J Proteome Res* 2021, **20**(6):3330-3344.

52. Carreño LJ, Bueno SM, Bull P, Nathenson SG, Kalergis AM: **The half-life of the T-cell receptor/peptide-major histocompatibility complex interaction can modulate T-cell activation in response to bacterial challenge.** *Immunology* 2007, **121**(2):227-237.
53. Roederer M: **Interpretation of cellular proliferation data: Avoid the panglossian.** *Cytometry Part A* 2011, **79A**(2):95-101.
54. Shakiba M, Zumbo P, Espinosa-Carrasco G, Menocal L, Dünder F, Carson SE, Bruno EM, Sanchez-Rivera FJ, Lowe SW, Camara S *et al*: **TCR signal strength defines distinct mechanisms of T cell dysfunction and cancer evasion.** *Journal of Experimental Medicine* 2021, **219**(2).
55. Boulet S, Daudelin JF, Odagiu L, Pelletier AN, Yun TJ, Lesage S, Cheong C, Labrecque N: **The orphan nuclear receptor NR4A3 controls the differentiation of monocyte-derived dendritic cells following microbial stimulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019, **116**(30):15150-15159.
56. Olazabal IM, Martín-Cofreces NB, Mittelbrunn M, Martínez del Hoyo G, Alarcón B, Sánchez-Madrid F: **Activation outcomes induced in naïve CD8 T-cells by macrophages primed via "phagocytic" and nonphagocytic pathways.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**(2):701-710.
57. Urban SL, Berg LJ, Welsh RM: **Type 1 interferon licenses naïve CD8 T cells to mediate anti-viral cytotoxicity.** *Virology* 2016, **493**:52-59.
58. Yang L, Baltimore D: **Long-term in vivo provision of antigen-specific T cell immunity by programming hematopoietic stem cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(12):4518-4523.
59. Gurnani K, Kennedy J, Sad S, Sprott GD, Krishnan L: **Phosphatidylserine Receptor-Mediated Recognition of Archaeosome Adjuvant Promotes Endocytosis and MHC Class I Cross-Presentation of the Entrapped Antigen by Phagosome-to-Cytosol Transport and Classical Processing1.** *The Journal of Immunology* 2004, **173**(1):566-578.
60. King CG, Koehli S, Hausmann B, Schmalzer M, Zehn D, Palmer E: **T cell affinity regulates asymmetric division, effector cell differentiation, and tissue pathology.** *Immunity* 2012, **37**(4):709-720.
61. Brownlie RJ, Wright D, Zamoyska R, Salmond RJ: **Deletion of PTPN22 improves effector and memory CD8+ T cell responses to tumors.** In: *JCI Insight*. vol. 5; 2019: 127847.
62. Kumar R, Ferez M, Swamy M, Arechaga I, Rejas MT, Valpuesta JM, Schamel WW, Alarcon B, van Santen HM: **Increased sensitivity of antigen-experienced T cells through the enrichment of oligomeric T cell receptor complexes.** *Immunity* 2011, **35**(3):375-387.
63. Oberle Susanne G, Hanna-El-Daher L, Chennupati V, Enouz S, Scherer S, Prlic M, Zehn D: **A Minimum Epitope Overlap between Infections Strongly Narrows the Emerging T Cell Repertoire.** *Cell Reports* 2016, **17**(3):627-635.
64. Salerno F, Guislain A, Freen-Van Heeren JJ, Nicolet BP, Young HA, Wolkers MC: **Critical role of post-transcriptional regulation for IFN- γ in tumor-infiltrating T cells.** *Oncolmmunology* 2019, **8**(2):e1532762.
65. Bhattacharyya ND, Feng CG: **Regulation of T Helper Cell Fate by TCR Signal Strength.** *Front Immunol* 2020, **11**:624.
66. Krummey SM, Martinez RJ, Andargachew R, Liu D, Wagener M, Kohlmeier JE, Evavold BD, Larsen CP, Ford ML: **Low-Affinity Memory CD8+ T Cells Mediate Robust Heterologous Immunity.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2016, **196**(6):2838-2846.

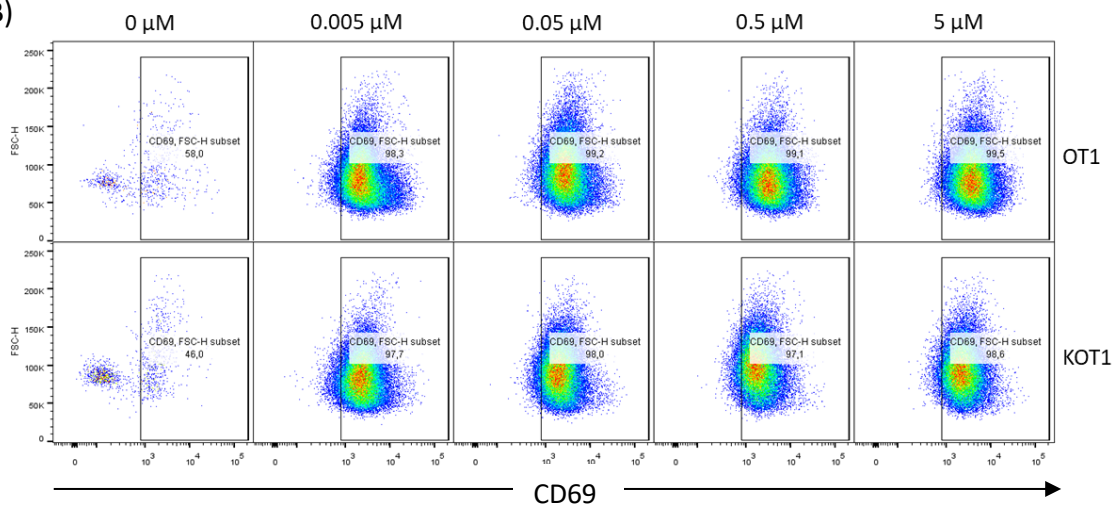
67. Zahm CD, Colluru VT, McNeel DG: **Vaccination with High-Affinity Epitopes Impairs Antitumor Efficacy by Increasing PD-1 Expression on CD8(+) T Cells.** *Cancer Immunol Res* 2017, **5**(8):630-641.
68. Jenkins MR, Tsun A, Stinchcombe JC, Griffiths GM: **The strength of T cell receptor signal controls the polarization of cytotoxic machinery to the immunological synapse.** *Immunity* 2009, **31**(4):621-631.
69. Frazer GL, Gawden-Bone CM, Dieckmann NMG, Asano Y, Griffiths GM: **Signal strength controls the rate of polarization within CTLs during killing.** *Journal of Cell Biology* 2021, **220**(10):e202104093.
70. Amitrano AM, Berry BJ, Lim K, Kim K-D, Waugh RE, Wojtovich AP, Kim M: **Optical Control of CD8+ T Cell Metabolism and Effector Functions.** *Frontiers in Immunology* 2021, **12**.

Annexes

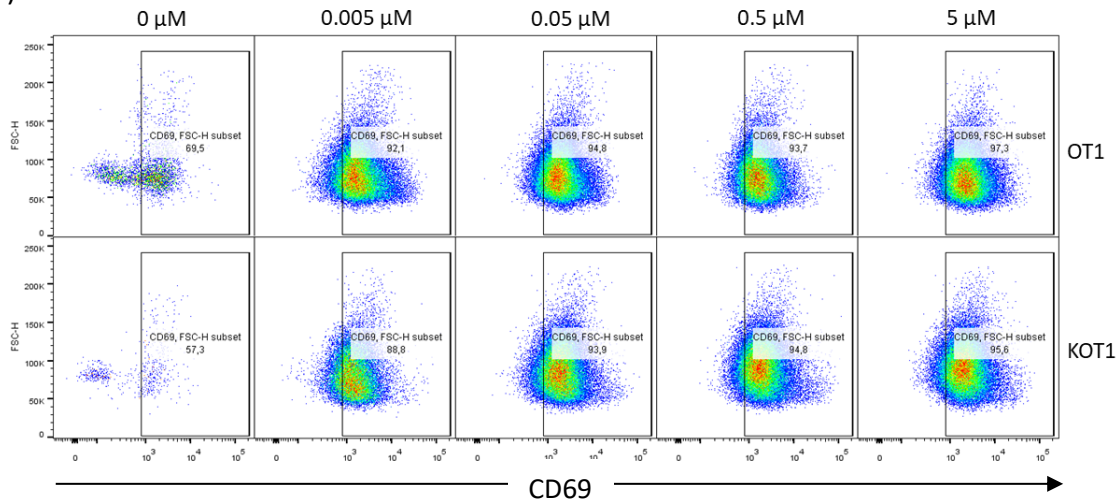
(A)



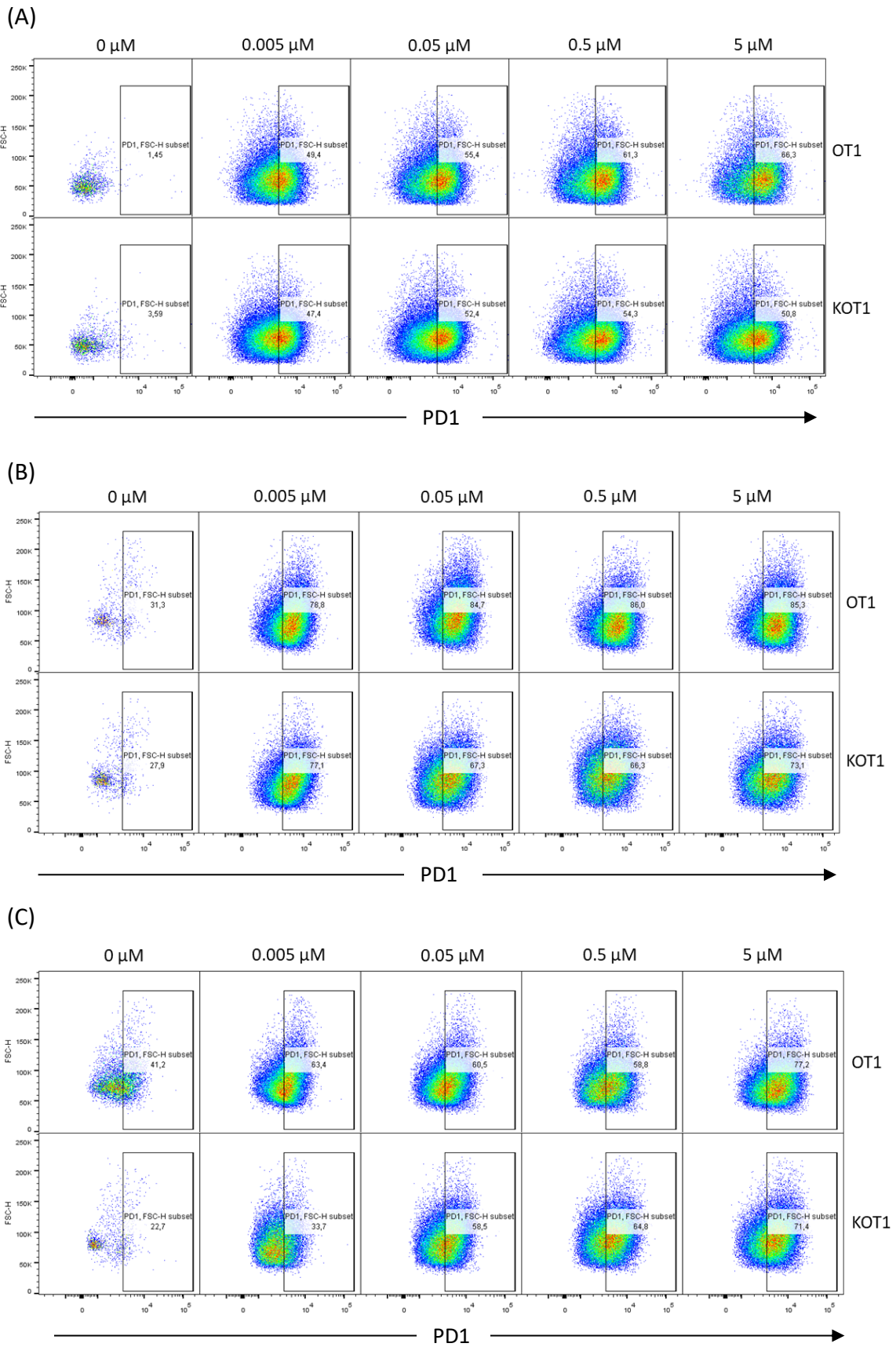
(B)



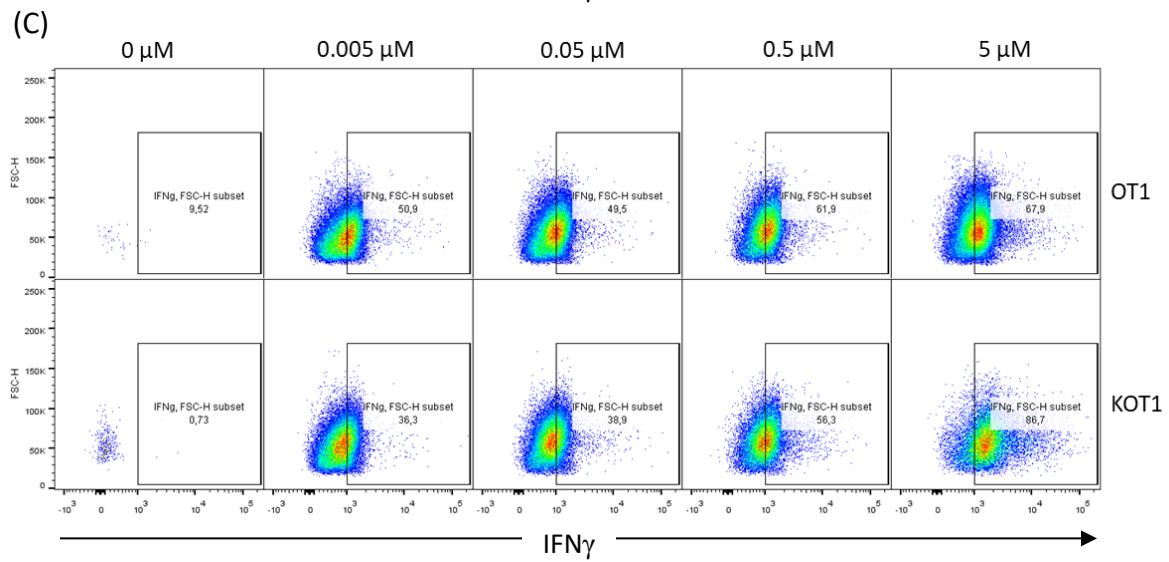
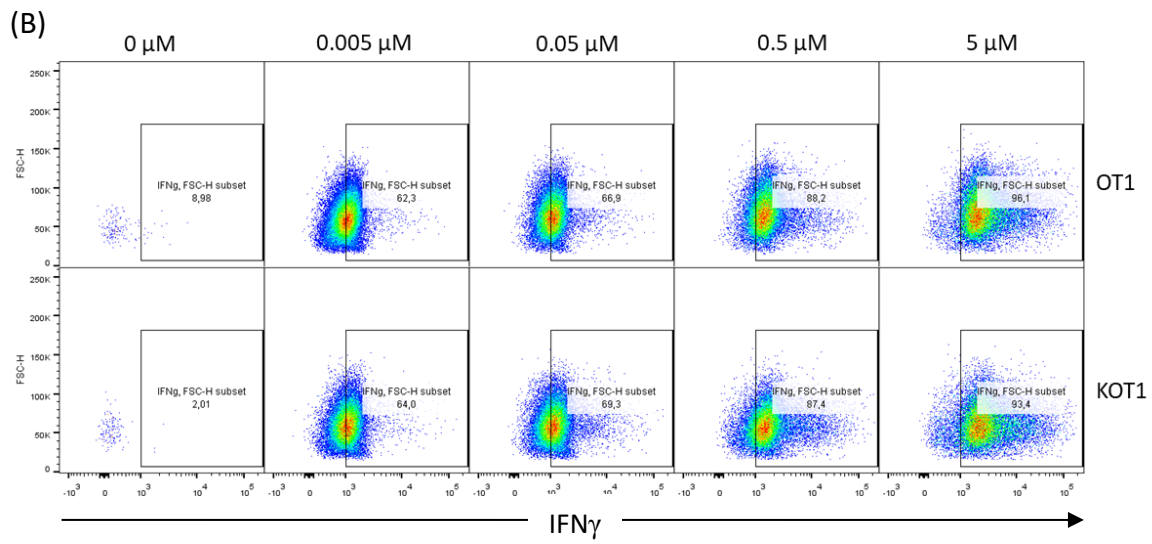
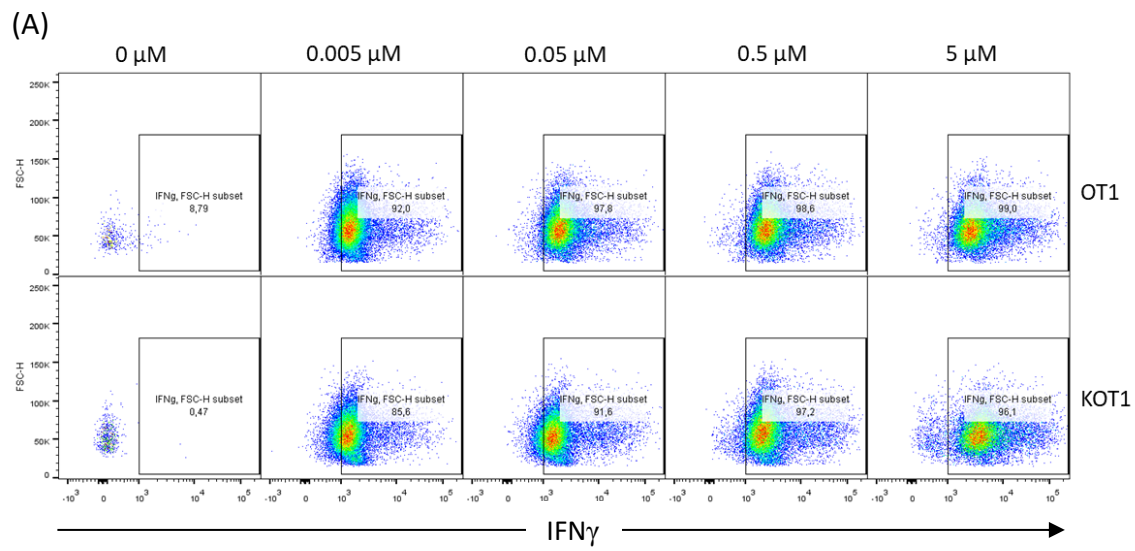
(C)



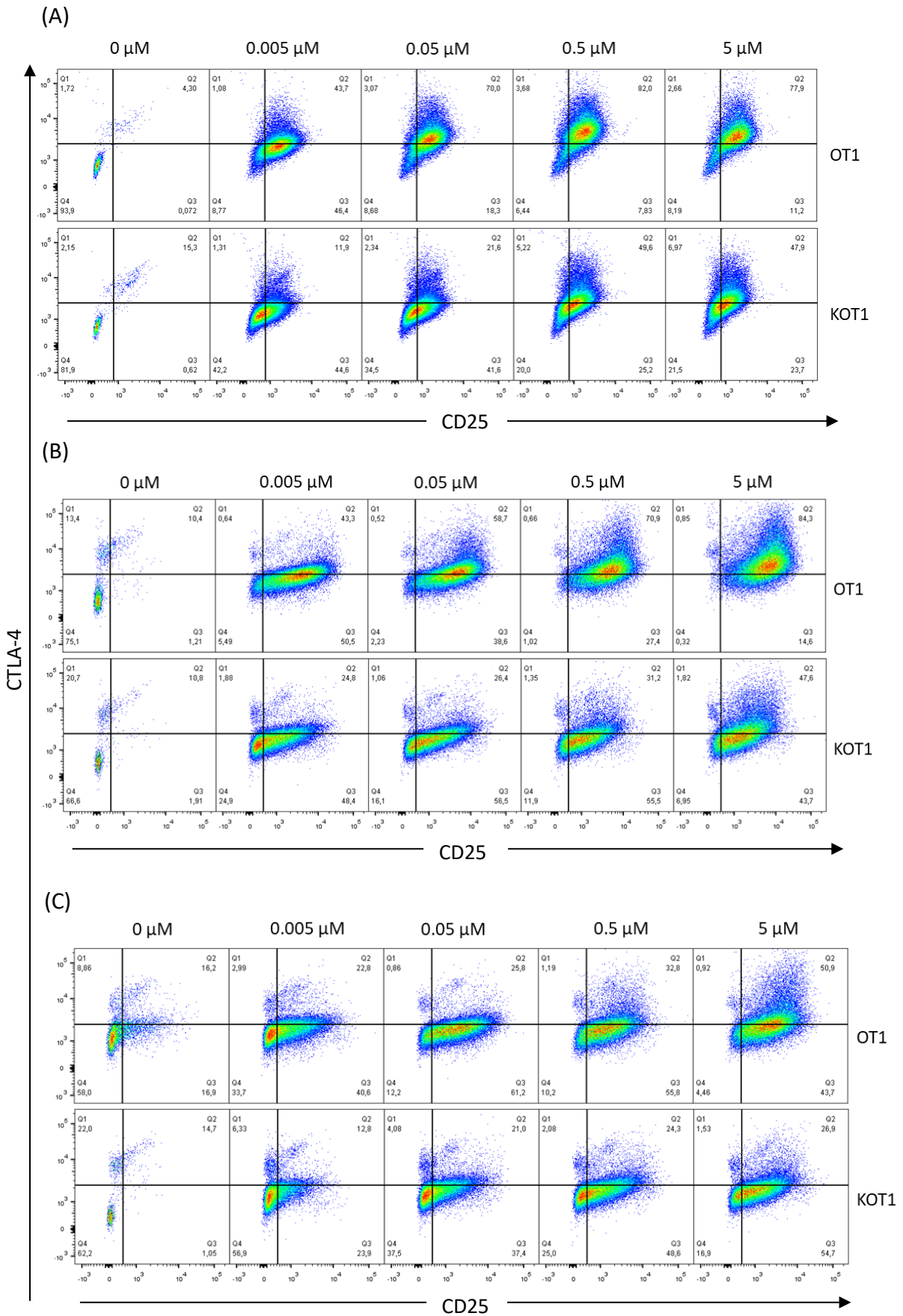
Annexe 1. – L'expression en surface du récepteur CD69 est indépendante de la force du signal du TCR et de l'effet de la mutation K56E. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (7-10 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μ M). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). Par la suite, l'expression de CD69 à la surface des cellules CD8⁺ a été détectée par cytométrie de flux, au moyen d'un marquage de surface. (A) Pourcentage de la population CD69⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA SIINFEKL. (B) Pourcentage de la population CD69⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA Q4. (C) Pourcentage de la population CD69⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA T4.



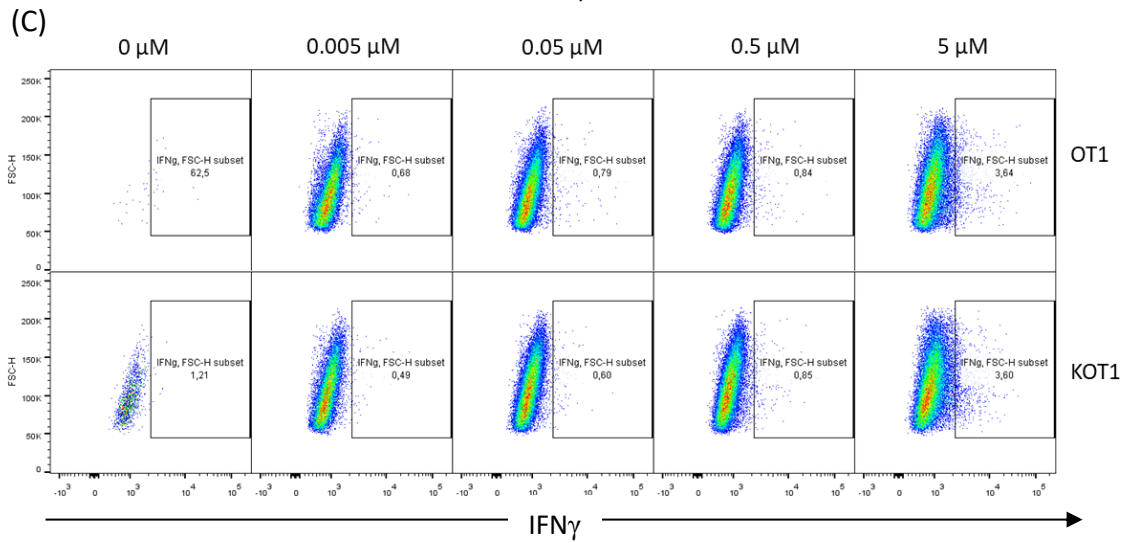
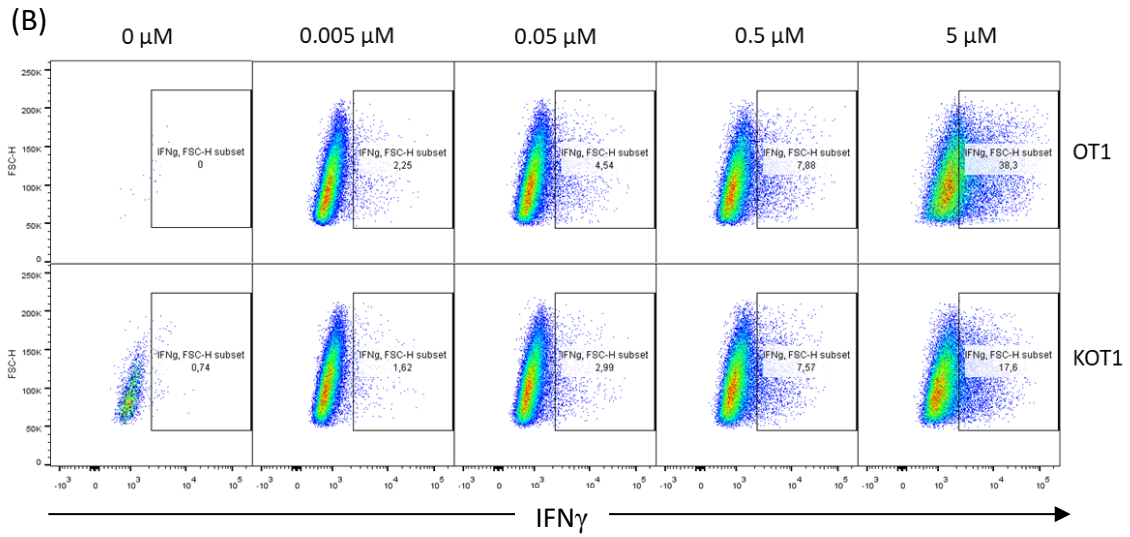
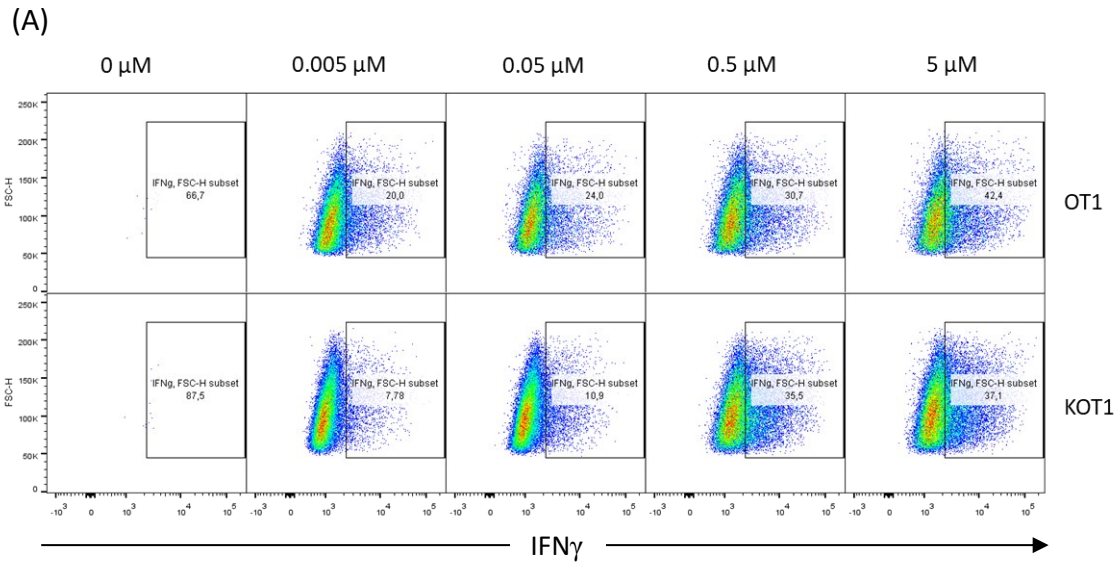
Annexe 2. – L'expression de PD1 est contrôlée par l'affinité des peptides au TCR des cellules OT1 et KOT1. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (7-10 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μ M). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). Par la suite, l'expression de PD1 à la surface des cellules CD8⁺ a été détectée par cytométrie de flux, au moyen d'un marquage de surface. (A) Pourcentage de la population PD1⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA SIINFEKL. (B) Pourcentage de la population PD1⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA Q4. (C) Pourcentage de la population PD1⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA T4.



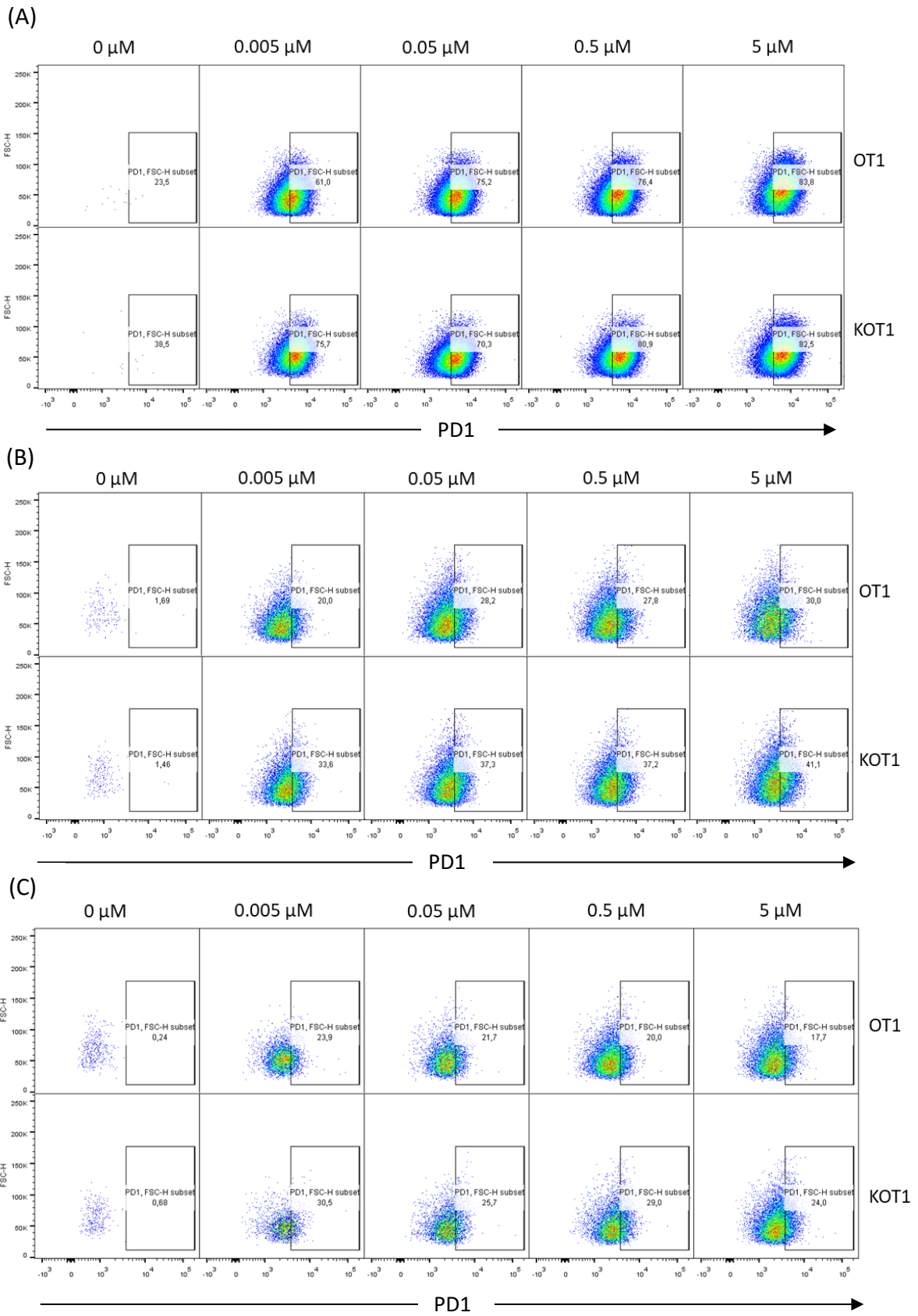
Annexe 3. – La production de la cytokine IFN γ est contrôlée par la force du signal au TCR chez les souris OT1 et KOT1. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (7-10 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μ M). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). Par la suite, la production intracellulaire d'IFN γ chez les cellules CD8⁺ a été détectée par cytométrie de flux. (A) Pourcentage de la population IFN γ ⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA SIINFEKL. (B) Pourcentage de la population IFN γ ⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA Q4. (C) Pourcentage de la population IFN γ ⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA T4.



Annexe 4. – L'expression de CTLA-4 et CD25 est contrôlée par l'affinité des peptides d'OVA. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (7-10 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μ M). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). Par la suite, l'expression de CTLA-4 et CD25 à la surface des cellules CD8⁺ a été détectée par cytométrie de flux, au moyen d'un marquage de surface. La population d'intérêt est la population double positive CTLA-4⁺ CD25⁺ (carré supérieur droit). (A) Pourcentage de la population CTLA4⁺CD25⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA SIINFEKL. (B) Pourcentage de la population CTLA4⁺CD25⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA Q4. (C) Pourcentage de la population CTLA4⁺CD25⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA T4.



Annexe 5. – L'expression de la cytokine IFN γ est contrôlée par l'affinité des peptides d'OVA. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (20-30 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μ M). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). Par la suite, la production intracellulaire d'IFN γ chez les cellules CD8⁺ a été détectée par cytométrie de flux. (A) Pourcentage de la population IFN γ ⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA SIINFEKL. (B) Pourcentage de la population IFN γ ⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA Q4. (C) Pourcentage de la population IFN γ ⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA T4.



Annexe 6. – L'expression de PD1 est contrôlée par l'affinité des peptides d'OVA chez les OT1 et KOT1. Les cellules T de souris OT1 et KOT1 (20-30 semaines) ont été isolées à partir de splénocytes et activées pendant deux jours avec différentes concentrations de peptides (0 ; 0.005 ; 0.05 ; 0.5 ; 5 μ M). Les peptides suivants, ayant différentes affinités pour le récepteur T, ont été utilisés pour l'activation : SIINFEKL (haute affinité), Q4 (moyenne affinité), T4 (faible affinité). Par la suite, l'expression de PD1 à la surface des cellules CD8⁺ a été détectée par cytométrie de flux, au moyen d'un marquage de surface. (A) Pourcentage de la population PD1⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA SIINFEKL. (B) Pourcentage de la population PD1⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA Q4. (C) Pourcentage de la population PD1⁺ suivant la concentration croissante du peptide OVA T4.